

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Vivian Jordania da Silva

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E INFECÇÃO POR *Ancylostoma ceylanicum* EM
MODELO EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2017

Vivian Jordania da Silva

**RELAÇÃO ENTRE OBESIDADE E INFECCÃO POR *Ancylostoma ceylanicum* EM
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia. Área de concentração Imunoparasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Coorientadora: Dra. Silvia Regina Costa Dias

Belo Horizonte

2017

043

Silva, Vivian Jordania da.

Relação entre obesidade e infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em modelo experimental [manuscrito] / Vivian Jordania da Silva. – 2017.

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

Orientadora: Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo. Coorientadora: Dra. Silvia Regina Costa Dias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Parasitologia. 2. Ancilostomíase. 3. Obesidade. 4. Ancilostomídeos. 5. Infecção. I. Rabelo, Élide Mara Leite. II. Dias, Silvia Regina Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. Devemos promover a coragem onde há medo, promover o acordo onde existe conflito, e inspirar esperança onde há desespero”.

Nelson Mandela

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG.

À professora Élide, pela orientação e oportunidade de ingressar no ramo da pesquisa científica, pelas risadas e puxões de orelha. Obrigada pelo auxílio e dedicação.

À Silvia, pela orientação e mesmo à distância foi extremamente importante para o desenvolvimento do trabalho. Obrigada pelo auxílio e dedicação.

À Luciana Serafim, que mais do que orientar fez a diferença para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha professora de graduação, Glorinha pela oportunidade de conhecer e vivenciar a ciência. Obrigada pela oportunidade e por fazer a diferença na minha vida.

À professora Ana Caetano pelo auxílio durante a realização do experimento.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Parasitologia Sumara e Sibebe por serem sempre tão prestativas.

Aos amigos de laboratório Thayse, Fernando, Nayara, Bruna, Ceres, Luciana, William, Celi que fizeram parte da minha trajetória. Pessoas que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao William e Fernando pela ajuda na execução do projeto.

Ao Hudson pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas.

Aos meus pais, Ângela e Orlando, pelo apoio nos momentos difíceis acreditando na minha capacidade de concluir mais uma etapa de vida e suportando meus momentos de indecisão.

Aos meus avós, Nair, Antônio, Celi, que sempre estiveram ao meu lado. Principalmente ao meu avô que faleceu antes da minha defesa deixando um vazio em nossas vidas. Obrigada por me tornar uma pessoa melhor.

Ao Carlos pelo fornecimento dos animais e pelo auxílio no experimento.

À todos os meus amigos por continuarem ao meu lado mesmo com a falta de tempo e distância.

À minha família por acreditar nas minhas escolhas estando sempre ao meu lado.

Ao meu marido, Wemerson por suportar minha ausência, minha loucura, minhas dúvidas e certezas. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos importantes.

RESUMO

A obesidade e a ancilostomose são consideradas problemas de saúde pública. Enquanto a ancilostomose é prevalente em regiões tropicais e subtropicais, acometendo principalmente a população mais carente, a obesidade tem crescido de forma significativa, acometendo todas as classes sociais, e independentemente do clima. Estudos recentes têm demonstrado que a infecção por helmintos intestinais em indivíduos obesos é capaz de amenizar a desordem metabólica, melhorando a tolerância à glicose, diminuindo tanto a resistência à insulina quanto a inflamação de baixa intensidade. Esta diminuição da morbidade estaria relacionada à capacidade que alguns helmintos possuem em estimular a produção de IL-10, a proliferação de células T reguladoras e a polarização da resposta para o Th2, uma vez que a obesidade é caracterizada pelo predomínio de uma resposta inflamatória do Th1. No entanto, poucas espécies de helmintos já foram estudadas neste contexto, e alguns mecanismos de modulação ainda requerem maiores conhecimentos. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo investigar o papel da infecção experimental por *Ancylostoma ceylanicum* na modulação da resposta imunológica em modelo experimental obeso. No desenho experimental foram utilizados grupos de 06 hamsters fêmeas submetidos a uma dieta hiperlipídica e hipercalórica (HSB) capaz de induzir obesidade, infectados e não infectados, e que foram comparados aos controles normonutridos, infectados e não infectados, com 50 larvas de *A. ceylanicum*. Os parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos foram avaliados. Os animais infectados foram submetidos a exames parasitológicos e os órgãos foram coletados para quantificação de citocinas por qRT-PCR e testes imunoenzimáticos. Os resultados demonstraram que a infecção por *A. ceylanicum* acentuou a perda de peso nos animais obesos com maior intensidade em comparação aos normonutridos, agravando o quadro clínico do hospedeiro. Por outro lado a obesidade diminuiu a recuperação de vermes e a ovoposição das fêmeas, possivelmente devido à maior inflamação nos intestinos destes animais. Além disso, ambos os grupos infectados apresentaram diminuição dos níveis de hemoglobina, albumina, ferro e eritrócitos. A infecção interferiu no metabolismo de lipídeos, aumentando os níveis de colesterol total e de triglicérides no grupo obeso e causando uma diminuição nos níveis de HDL em ambos os grupos. A obesidade levou a um aumento nos níveis de glicose, e a infecção causou aumento, tanto nos grupos normonutridos como nos obesos. A inflamação foi intensificada nos animais obesos que apresentaram elevação da ativação de macrófagos e neutrófilos no tecido adiposo, aumento do baço e acúmulo de lipídeos no fígado e nas fezes. A infecção causou também diminuição nos níveis de IL-10, FoxP3 e IL-2 e a obesidade causou elevação nos níveis de IFN- γ . O presente trabalho teve como premissa a hipótese de que a infecção por *A. ceylanicum* poderia interferir com o quadro de obesidade, melhorando os parâmetros bioquímicos associados a esta patologia. Entretanto, os resultados encontrados, demonstraram uma correlação negativa, para o hospedeiro, frente às duas patologias, ou seja, a associação da obesidade com a infecção por *A. ceylanicum* agravou o quadro clínico do hospedeiro. Apesar da diminuição dos níveis de IFN- γ , a infecção não potencializou a expressão do fator de transcrição Foxp3, IL-10 e IL-2, marcadores que poderiam mediar de forma positiva, para o hospedeiro, os danos causados pela obesidade. Além disso, os parâmetros associados ao metabolismo de lipídeos e glicose foram agravados pela infecção, assim como a inflamação.

Palavras-chave: Obesidade; Ancilostomídeos; *Ancylostoma ceylanicum*; Dieta HSB; marcadores clínicos

ABSTRACT

Obesity and hookworm are considered public health problems. While ancylostomiasis is prevalent in tropical and subtropical regions, affecting mainly the poorest population, obesity has grown significantly, affecting all social classes, and regardless of the climate. Recent studies have shown that infection by intestinal helminths in obese individuals is able to ameliorate metabolic disorder by improving glucose tolerance, decreasing both, insulin resistance and low-intensity inflammation. This decrease in morbidity would be related to the ability of some helminths to stimulate IL-10 production, proliferation of regulatory T cells, and polarization of the Th2-type response, since obesity is characterized by the predominance of an inflammatory Th1 response. However, few helminth species have been studied in this context, and some modulators mechanisms still require further studies. Therefore, the present work aimed to investigate the role of the experimental infection by *Ancylostoma ceylanicum* in the modulation of the immune response in an obese experimental model. In the experimental design, groups of six female hamsters submitted to a hyperlipidic and hypercaloric diet (HSB), were used to induce obesity, both infected and uninfected, and were compared to normonourished controls, uninfected and infected with 50 larvae of *A. ceylanicum*. Biochemical, hematological and immunological parameters were evaluated. The infected animals were submitted to parasitological examinations and the organs were collected for quantification of cytokines by qRT-PCR and immunoenzymatic tests. The results showed that *A. ceylanicum* infection accentuated weight loss in obese animals with greater intensity compared to normonourished, worsening the clinical condition of the host. On the other hand, obesity decreased the recovery of worms and the ovoposition of females, possibly due to the greater inflammation in the intestines of these animals. In addition, both infected groups, had decreased levels of hemoglobin, albumin, iron and erythrocytes. The infection interfered in lipid metabolism, increasing total cholesterol and triglyceride levels in the obese group and causing a decrease in HDL levels in both groups. Obesity led to an increase in glucose levels, and the infection caused glucose increase in both, the normonourished and obese groups. Inflammation was intensified in obese animals that showed elevated macrophage and neutrophil activation in adipose tissue, enlargement of the spleen and accumulation of lipids in the liver and faeces. The infection also caused a decrease in the levels of IL-10, FoxP3 and IL-2 and obesity caused elevation in IFN- γ levels. The present work has raised the hypothesis that *A. ceylanicum* infection could interfere with the obesity situation, improving the biochemical parameters associated with this pathogenesis. However, the results showed a negative correlation between the two diseases to the host, that is, the association of obesity with *A. ceylanicum* infection worsened the clinical condition of the host. Despite the decrease in IFN- γ levels, the infection did not potentiate the expression of the transcription factor Foxp3, IL-10 and IL-2; markers that could positively mediate the damage caused by obesity to the host. In addition, parameters associated with lipid and glucose metabolism were aggravated by infection as well as inflammation.

Key words: Obesity, Hookworm; *Ancylostoma ceylanicum*; HSB diet; Clinical marker

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo evolutivo dos ancilostomídeos.....	23
Figura 2: Resposta imunológica da infecção por helmintos.....	25
Figura 3: Variação do peso dos animais ao longo do experimento. (A) Aferição do peso semanal.....	34
Figura 4: Avaliação da variação ponderal de peso e adiposidade visceral. (A) Variação ponderal de peso. (B) Índice de adiposidade visceral.....	47
Figura 5: Análise macroscópica dos tecidos e órgãos. (A) Peso do baço. (B) Peso do fígado.....	48
Figura 6: Análise macroscópica dos tecidos e órgãos. (A) Peso do linfonodo. (B) Peso do pâncreas.....	49
Figura 7: Medida do intestino delgado.....	50
Figura 8: Quantificação de <i>A. ceylanicum</i> adulto e ovoposição. (A) <i>A. ceylanicum</i> recuperados. (B) Ovoposição em 24 horas por fêmea recuperada.....	51
Figura 9: Níveis séricos de proteínas totais.....	52
Figura 10: Avaliação dos níveis séricos de albumina e ferro. (A) Albumina. (B) Ferro sérico....	53
Figura 11: Avaliação do colesterol total e triglicérides. (A) Níveis séricos de triglicérides. (B) Níveis séricos de colesterol HDL.....	54
Figura 12: Níveis séricos de colesterol total.....	55
Figura 13: Glicose jejum.....	55
Figura 14: Curva glicêmica.....	56
Figura 15: Determinação dos níveis de lipídeos e proteínas hepáticas. (A) Lipídeos hepático. (B) Triglicérides hepático. (C) Colesterol hepático. (D) Proteínas hepática.....	57
Figura 16: Determinação dos níveis de lipídeos e proteínas do conteúdo cecal. (A) Lipídeos do conteúdo cecal. (B) Triglicérides do conteúdo cecal.....	58
Figura 17: Avaliação dos eritrócitos totais, hemoglobina e volume globular. (A) Eritrócitos totais. (B) Hemoglobina. (C) Volume globular.....	59

Figura 18: Avaliação dos leucócitos totais e contagem diferencial. (A) Leucócitos totais. (B) Monócitos. (C) Neutrófilos. (D) Eosinófilos.....	60
Figura 19: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado. (B) Atividade da N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) no intestino delgado. (C) Atividade da peroxidase eosinofílica no intestino delgado.....	61
Figura 20: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido adiposo. (B) Atividade da N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) no tecido adiposo. (C) Atividade da Peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido adiposo.....	62
Figura 21: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no fígado. (B) Atividade da N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) no fígado. (C) Atividade da peroxidase eosinofílica no fígado.....	63
Figura 22: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. (A) Foxp3. (B) IL-10. (C) IL-2.....	64
Figura 23: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. IL-4.....	65
Figura 24: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. IFN- γ	65
Figura 25: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. (A) IL-6. (B) TNF- α	66
Figura 26: Resultados obtidos no presente trabalho.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas AIN-93 (controle) e HSB.....	34
Tabela 2: Porcentagem dos componentes carboidrato, proteínas e lipídeos nas dietas AIN93-M e HSB e calorias de cada dieta.....	34
Tabela 3: Valores de referência para mensuração do índice de atividade da infecção (IAI)...	37
Tabela 4: Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho, com número de acesso de referência no NCBI, temperatura de anelamento (T _m) e tamanho do produto utilizando os respectivos iniciadores desenhados para cada citocina.....	42
Tabela 5: Índice de atividade da infecção (IAI).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIN-93:** American Institute of Nutrition 93
- ApoE:** Apolipoproteína E
- BHT:** Butylated hydroxytoluene
- TCD4⁺:** Células T do grupamento de diferenciação 4
- CEUA:** Comissão de ética no uso de animais
- Ct:** Cycle threshold
- D.P.I.:** Dias pós a infecção
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético
- ES:** Produtos de excreção e secreção
- FoxP3:** Forkhead box P3
- GLUT-4:** Transportador de glicose 4
- HIF-1:** fator de transcrição induzível por hipóxia 1
- HFD:** High-fat diet
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência humana
- HPRT:** Hipoxantina fosforibosiltransferase Hsp Heat shock protein
- HSBI:** Dieta alto teor de açúcar e manteiga infectado
- HSB:** Dieta com alto teor de açúcar e manteiga
- ICB:** Instituto de Ciências Biológicas
- IFN- γ :** Interferon gama
- IgE:** Imunoglobulina E
- IgM:** Imunoglobulina M
- IgG1:** Imunoglobulina 1
- IgG4:** Imunoglobulina 4
- ILC's 2:** células linfoides inatas grupo 2
- ILC's 1:** células linfoides inatas grupo 1
- IL-2:** Interleucina 2
- IL-4:** Interleucina 4
- IL-6:** Interleucina 6

IL-9: Interleucina 9

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-25: Interleucina 25

IL-33: Interleucina 33

iNKT: células T invariantes “natural killer”

L1: Larva de primeiro estágio

L2: Larva de segundo estágio

L3: Larva de terceiro estágio

L4: Larva de quarto estágio

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LM: Linfonodo mesentérico

LLP: Lipase lipoproteica

LHS: Lipase hormônio sensível

LNFP^{III}: Pentassacarídeo Lacto-N-Fucopentose III

LTB₄: leucotrieno B₄

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1

Macrófagos M1: Macrófagos classicamente ativados

Macrófagos M2: Macrófagos alternativamente ativados

mM: Milimolar

mL: Mililitro

ng: Nanograma

MDSC: células supressoras derivadas de células mieloides

MPO: Mieloperoxidase

NAG: N-acetil-β-D-glicosaminidase

NES: Antígenos secretados e excretados por *N. brasiliensis*

NF-κB: fator de transcrição κB

NN: Normonutrido

NNI: Normonutrido infectado

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Phosphate buffer saline PP

PCR: Proteína C Reativa

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

SEA: Antígenos de ovos solúveis

STAT-6: Signal Transducer and activador of transcription 6

STZ: Streptavidina

TGF- β : Transforming growth factor beta

TSLP: Linfopoiética estromal tímica

TLR-2: Toll like receptor-2

TLR-4: Toll like receptor-4

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

Treg: Célula T reguladoras

μg : Micrograma

μL : Microlitro

μM : Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Os ancilostomídeos.....	18
1.2. A ancilostomose.....	19
1.3. Epidemiologia dos ancilostomídeos.....	20
1.4. Ciclo biológico e infecção por ancilostomídeos.....	21
1.5. Resposta imunológica da infecção por helmintos.....	23
1.6. A obesidade.....	25
1.7. Resposta imunológica em indivíduos obesos.....	27
1.8. Infecção e modulação da resposta imunológica na obesidade e diabetes.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVO GERAL.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Manutenção do parasito e obtenção de L3.....	33
4.2. Dietas específicas.....	33
4.3. Delineamento experimental.....	35
4.4. Eliminação de ovos nas fezes.....	36
4.5. Ovoposição em 24 horas.....	36
4.6. Índice de atividade da infecção.....	37
4.7. Coleta de sangue e hemograma.....	37
4.8. Eutanásia e avaliação macroscópica dos órgãos.....	38
4.9. Adiposidade.....	38

4.10. Testes bioquímicos séricos e curva glicêmica.....	39
4.11. Avaliação lipídica e proteica do tecido hepático e conteúdo cecal.....	39
4.12. Análise da expressão de genes associados à resposta celular.....	39
4.12.1. Extração de RNA total.....	40
4.12.2. Síntese cDNA.....	40
4.12.3. Alvos moleculares.....	40
4.12.3. qPCR em tempo real.....	41
4.13. Testes imunoenzimáticos.....	42
4.13.1. Atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	42
4.13.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	43
4.13.3. Atividade da peroxidase (EPO).....	43
4.14. Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> acentua a perda de peso e diminui o índice de adiposidade visceral nos animais com obesidade induzida.....	45
5.2. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> causa aumento do baço dos animais com obesidade induzida.....	47
5.3. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> aumenta a debilidade, diminui a recuperação de vermes e a ovoposição nos animais com obesidade induzida.....	49
5.4. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> agrava o quadro clínico do hospedeiro na obesidade.....	51
5.5. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> diminui os níveis de albumina e ferro e eritrócitos nos animais normonutridos e obesos.....	51

5.6. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> interfere no metabolismo de lipídeo e glicose em animais normonutridos e obesos.....	53
5.7. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> eleva o acúmulo de lipídeos hepático nos animais com obesidade induzida.....	55
5.8. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> causa uma maior perda de lipídeos através das fezes nos animais com obesidade induzida.....	56
5.9. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> diminui os níveis de hemoglobina e eritrócitos nos animais normonutridos e obesos.....	57
5.10. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> em hamsters obesos contribui para o aumento de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes, intensificando a inflamação no tecido adiposo e a ativação de macrófagos no intestino delgado.....	58
5.11. A infecção por <i>A. ceylanicum</i> em hamsters causa diminuição nos níveis de IL-10, FoxP3 e IL-2, enquanto a obesidade eleva os níveis de IFN- γ no intestino.....	61
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO.....	74
8. PERSPECTIVAS.....	75
9. REFERÊNCIAS.....	76
10. ANEXOS.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os ancilostomídeos

Os ancilostomídeos pertencem ao Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Superfamília Strongyloidea, Família Ancylostomatidae (ZHANG, 2011). As infecções em humanos ocorrem principalmente pelas espécies *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*. As infecções por *Ancylostoma ceylanicum* apresentam menor abrangência, porém devido ao caráter zoonótico da infecção, estes parasitos também, apresentam relevância epidemiológica (HOTEZ et al., 2004). A infecção por *A. ceylanicum* em humanos e animais tem sido relatada em várias regiões da Ásia, África do sul, Austrália e América do Sul (ANTEN; ZUIDEMA, 1964; HEINEMANN, 1976; SCHRAMM et al., 2007; SCHUSTER et al., 2009; PALMER et al., 2007; JIRANANKUL et al., 2011; NGUI et al., 2012; BRADBURY et al., 2017)

A diferenciação das espécies de ancilostomídeos pode ocorrer pela morfologia ou caracterização molecular. O *A. duodenale* apresenta dois pares de dentes ventrais na região interna da boca e uma par de dentes triangulares no fundo da boca, enquanto no *N. americanus* observa-se o aprofundamento da cápsula bucal margeada por duas lâminas cortantes seminulares na região subventral, duas lâminas na região dorsal e um dente longo situado no fundo da cápsula bucal. O *A. ceylanicum* diferencia-se pelo par de dentes grande e um par de denticulos, ambos na cápsula bucal (REY, 2001; NEVES, 2015).

Os ancilostomídeos apresentam corpo cilíndrico e dimorfismo sexual. As fêmeas apresentam a extremidade posterior afilada, enquanto o macho apresenta uma bolsa copuladora na extremidade posterior de fácil identificação (NEVES, 2015). Os ovos de todas as espécies de ancilostomídeos apresentam a mesma morfologia podendo ser diferenciado pela caracterização molecular (TRAUB et al., 2004; DE GRUIJTER et al., 2005; TRAUB et al., 2008; NGUI et al., 2012; GEORGE et al., 2015). Quanto à ingestão sanguínea o *N. americanus* possui a capacidade de ingerir de 0,05-0,30 mL de sangue por dia, enquanto o *A. ceylanicum* e o *A. duodenale* ingerem uma quantidade inferior de sangue (BRISCOE, 1979).

A utilização de *A. ceylanicum* como modelo de infecção para desenvolvimento da ancilostomose deve-se a facilidade de manutenção da cepa em laboratório devido ao ciclo bem definido. Além disso, a infecção por *A. ceylanicum* em hamster mimetiza o quadro clínico observado em humanos na ancilostomose, como, diarreia, desnutrição, anemia, perda de peso

e diminuição do crescimento (BUNGIRO, R D et al., 2001; BUNGIRO, RICHARD D.; ANDERSON; CAPPELLO, 2003; GHOSH et al., 2006; MENON; BHOPALE, 1985). Deste modo, hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por *A. ceylanicum* são utilizados para avaliação de diversos parâmetros relacionados à resposta imunológica, vacinação e patogenicidade (BUNGIRO, R D et al., 2001; DONDI et al., 2008; GARSIDE; BEHNKE, 1989; GHOSH et al., 2006; MENON; BHOPALE, 1985).

1.2. A ancilostomose

As geohelmintoses acometem cerca de 1,5 bilhão de indivíduos, sendo que cerca de 870 milhões de crianças em idade pré-escolar e escolar vivem em área de risco e estão expostas à infecção (WHO, 2017). Apesar da Organização Mundial de Saúde (OMS) preconizar o tratamento em massa para erradicação das geohelmintoses, a infecção é ainda bastante prevalente, principalmente entre a população mais carente (WHO, 2016; WHO, 2017). Dentre as parasitoses intestinais, a ancilostomose apresenta maior importância epidemiológica levando os indivíduos infectados ao quadro clínico de anemia ferropriva e síndrome de má absorção, cuja morbidade é mais elevada em crianças e mulheres grávidas de regiões tropicais e subtropicais (DARKE, 1959; SARAYA; TANDON, 1975; PULLAN, et al., 2014). Em crianças, a patogenicidade da infecção está relacionada ao estado nutricional, podendo interferir no crescimento, ganho de peso, aproveitamento e absorção de nutrientes (OMITOLA et al., 2016). Enquanto em mulheres, o quadro da infecção é agravado durante a gravidez com interferência no desenvolvimento do feto (BROOKER; HOTEZ; BUNDY, 2008; MUHANGI et al., 2007).

A anemia ferropriva do tipo microcítica e hipocrômica observada na infecção é desencadeada pelo hábito hematófago do parasito, o qual fixa-se na mucosa intestinal, provocando dilacerações e perda sanguínea, responsáveis pelas alterações de absorção de nutrientes pelo intestino (STOTT, 1960; DE SILVA et al., 2003; MUKAYA et al., 2009; RODRÍGUEZ-GUARDADO et al., 2013). Em alguns casos observa-se uma diminuição de ácido fólico e vitamina B12, mas a anemia megaloblástica não é observada (SARAYA; TANDON; RAMACHANDRAN, 1971). Quando a perda sanguínea se inicia, a medula aumenta a produção de reticulócitos, os quais diminuem com o decorrer da infecção devido à redução da eritropoiese ocasionada pelo decréscimo dos depósitos de ferro. No entanto, para pacientes com ingestão elevada de ferro, esta morbidade não é observada (STOTT, 1960; GOTTSTEIN; ISING; STOYE, 1991). Outros sintomas observados durante a infecção são devidos à fixação do parasito no intestino. O organismo pode apresentar aumento no trânsito e

motilidade intestinal, contração do músculo liso, proliferação das células caliciformes, produção de muco e quadro clínico de diarreia, na tentativa de eliminar o parasito (CASTRO et al., 1976; VERMILLION; COLLINS, 1988; CUNNINGHAM et al., 1991). Além disso, a diminuição nos níveis de hemoglobina está relacionada à carga parasitária e decréscimo dos depósitos de ferro, enquanto a diminuição dos níveis de albumina está relacionado à desnutrição, perda de plasma e diminuição da produção de albumina no fígado.

Outras alterações bioquímicas foram descritas na infecção por ancilostomídeos em modelo experimental e humanos. A interferência da infecção no metabolismo de lipídeos foi descrito em hamsters e humanos infectados por ancilostomídeos que apresentaram aumento nos níveis séricos de triglicérides e colesterol total, contribuindo para a diminuição dos níveis séricos de colesterol HDL (FREITAS, 1977; MUKERJEE et al., 1990; WIEDERMANN et al., 1991; RAI et al., 1998; HOTEZ et al., 1999). O mecanismo preciso de como essa lateração ocorre não é bem descrito, entretanto, acredita-se que a diminuição nos níveis séricos de colesterol HDL na infecção por ancilostomídeos está associada a uma maior morbidade, aparentemente as lesões provocadas pelo parasito no intestino delgado podem interferir na produção de HDL (FREITAS, 1977; WIEDERMANN et al., 1991; HOTEZ et al., 1999).

1.3. Epidemiologia dos ancilostomídeos

Atualmente, a infecção por ancilostomídeos acomete cerca de 439 milhões de indivíduos no mundo, resultando em uma perda econômica global de bilhões de dólares (PULLAN et al., 2014; BARTSCH et al., 2016). No continente africano, a infecção por helmintos é amplamente distribuída e está relacionada à falta de condições sanitárias adequadas. Hailegebriel (2017) relata uma prevalência de 65,5%, de infecção por helmintos intestinais entre estudantes do ensino fundamental na Etiópia, dos quais 22% estavam infectados por ancilostomídeos. Enquanto na Uganda, foi observada uma relação de maior susceptibilidade à infecção por *Necator americanus* por indivíduos adultos HIV positivos (27,6%), causando uma diminuição no número de células TCD4⁺ nestes indivíduos (MORAWSKI et al., 2017).

Na Malásia um estudo realizado com 380 indivíduos demonstrou uma prevalência de 13% para ancilostomose, das quais 9% das infecções foram ocasionadas por *N. americanus*, 2,1% por *A. duodenale* e o restante dos indivíduos apresentaram uma infecção mista por ambas as espécies (SAHIMIN et al., 2017). Na Tailândia, a prevalência da infecção por ancilostomídeos em 324 indivíduos analisados foi menor que o estudo citado anteriormente, acometendo 8% dos indivíduos (PUNSAWAD et al., 2017). Enquanto no Timor Leste de 2.194

indivíduos moradores de aldeias analisados, 60,7% estavam infectados por *N. americanus* (WARDELL et al., 2017). Não existem dados recentes de número de casos positivos para a ancilostomose no Brasil em escala nacional, porém, diferentemente dos estudos anteriores, dados de estudos locais, demonstraram uma prevalência de 5,6% entre estudantes do ensino fundamental e médio na cidade de Diamantina (PEREIRA et al., 2016). Apesar da prevalência da infecção por *N. americanus*, em algumas regiões, as infecções por *A. ceylanicum* também apresentam relevância epidemiológica, nas Ilhas Salomão a infecção por *A. ceylanicum* em humanos foi considerada a segunda espécie mais prevalente de ancilostomídeo (BRADBURY et al., 2017), resultados similares foram descritos no Camboja por Inpankaew e colaboradores (2012) demonstrando altas taxas de infecção. A infecção por *A. ceylanicum* também foi descrita em cães selvagens na Austrália por Smout e colaboradores (2013) evidenciando o caráter zoonótico da infecção. Deste modo, a infecção persiste entre a população mesmo com o tratamento em massa preconizado pela OMS. Assim vários estudos tem procurado analisar a eficácia do tratamento com anti-helmínticos em áreas de risco (CASEY et al., 2017; KEPHA et al., 2017; OSWALD et al., 2017).

No sul da Índia o tratamento com anti-helmínticos seguida de suplementação de ferro e ácido fólico, contribuiu para a diminuição da anemia, infecção grave e prevalência da infecção por *Ascaris*, *Trichuris* e ancilostomídeos em mulheres em idade fértil (CASEY et al., 2017). Enquanto no Quênia, o tratamento de crianças em idade escolar a cada 4 meses, foi mais eficaz que o tratamento anual, mas não conseguiu eliminar completamente a infecção por ancilostomídeos e *Ascaris* sp. (KEPHA et al., 2017). A erradicação destas infecções poderia ocorrer através da associação do tratamento com as melhorias nas condições sanitárias, principalmente a inclusão de saneamento básico (KEPHA et al., 2017). No entanto, na Etiópia não houve associação entre o uso de saneamento básico comunitário e diminuição da infecção (OSWALD et al., 2017).

1.4. Ciclo biológico e infecção por ancilostomídeos

A infecção ocorre através da penetração de larvas no terceiro estágio (L3) na epiderme do indivíduo, as quais são carregadas para os vasos sanguíneos ou linfáticos alcançando a circulação. A penetração da L3 na epiderme do hospedeiro é capaz de desencadear uma dermatite urticariforme (SOULSBY, 1965; FREITAS, 1977).

Após alcançar a circulação a larva é carregada para o coração, dirigindo-se para as artérias pulmonares, chegando aos pulmões, onde sofrem muda para larvas de quarto estágio (L4) (HOTEZ et al., 1999; 2004). A migração das larvas pelos pulmões é capaz de desencadear um processo inflamatório, dispneia, febre e tosse. Após a mudança para L4, as larvas dirigem-se para a traqueia com a ajuda dos cílios presentes na árvore brônquica, laringe, onde são deglutidas e instalam-se no intestino delgado, onde passam a vermes jovens e posteriormente a adultos, fixando-se na mucosa intestinal através da sua cápsula bucal característica, que facilita seu hábito alimentar hematófago (SOULSBY, 1965; HOTEZ et al., 1999).

Os ancilostomídeos apresentam dimorfismo sexual e a liberação de ovos pelas fêmeas ocorre algum tempo após a cópula. Os ovos são liberados no ambiente através das fezes, onde em condições adequadas de temperatura e umidade ocorre a eclosão das larvas L1 (rabditoide), que mudam para L2 (rabditoide) e, finalmente para L3 (filarióide), a qual possui a capacidade de penetrar na pele, com o auxílio de enzimas proteolíticas liberadas pela larva (forma infectante) (SOULSBY, 1965; BROOKER et al., 2004).

A infecção oral também pode ocorrer através da ingestão das L3, a qual perde a cutícula externa no estômago. Neste caso as larvas são capazes de penetrar na mucosa transformando-se em L4, emergindo para a luz intestinal, onde se transformam em adulto. Neste caso, não ocorre o ciclo pulmonar e a muda de L3 para L4 acontece na mucosa intestinal (HOTEZ et al., 1999; LOUKAS; PROCIV, 2001). O ciclo de vida dos ancilostomídeos está esquematicamente representado na Figura 1. A infecção por *A. ceylanicum* em hamsters é realizada por gavagem oral com larvas infectantes (L3), as quais são carregadas para o intestino delgado, onde se fixam na mucosa intestinal, transformando-se em adultos, ocasionando o quadro clínico normalmente observado na infecção (BUNGIRO, RICHARD D.; ANDERSON; CAPPELLO, 2003).

A infecção por ancilostomídeos não confere resistência à reinfecções (GANDHI et al., 2001; BETHONY et al., 2002). A alta carga parasitária está associada a maior morbidade da ancilostomose (BETHONY et al., 2002, HOTEZ et al., 2004). Nas reinfecções, a dermatite urticariforme é mais intensa (SOULSBY, 1965; FREITAS, 1977). Deste modo, estudos tem demonstrado que após o tratamento com antihelmínticos o hospedeiro consegue reestabelecer os níveis de ferro no organismo devido à eliminação da infecção, no entanto, o uso excessivo deste tratamento pode selecionar cepas resistente (QUINNELL et al., 1993; ALBONICO et al., 1995).

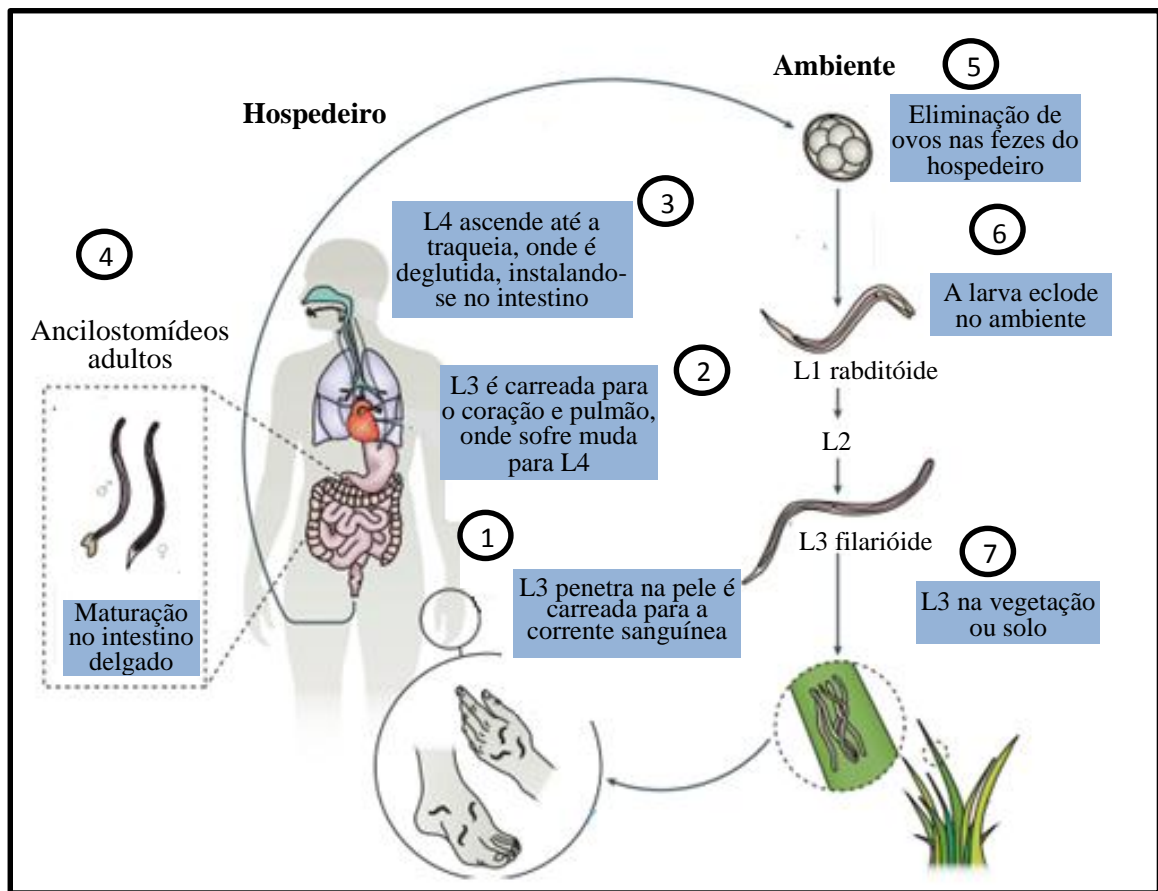


Figura 1: Ciclo evolutivo dos ancilostomídeos. Adaptado de Loukas et al., 2016.

1.5. Resposta imunológica da infecção por helmintos

Na ancilostomose, após a penetração das L3 na epiderme do hospedeiro é desencadeada uma resposta imune inata, com participação do sistema do complemento e receptores do tipo TLRs (Toll like receptors). No entanto, algumas larvas conseguem evadir desta resposta e continuam a migração até o intestino delgado, transformando-se em adultos. A migração resulta em um aumento de eosinófilos, os quais podem estar envolvidos na eliminação das larvas (MEESEN; BALIC, 2000; LOUKAS; PROCIV, 2001). Na infecção há predominância da resposta Th2, resultando no aumento das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (ABU-GHAZALEH et al., 1989; UNDERDOWN; SCHIFF, 1986; LOUKAS; PROCIV, 2001). Indivíduos infectados apresentam também uma alta produção de anticorpos do tipo IgE, IgG e IgM (GANGULY et al., 1988; BUNGIRO et al., 2008). No entanto, estes anticorpos também, não são capazes de gerar resistência à reinfecção, enquanto, a elevação dos níveis de IgE é resultado do aumento de IL-4 e da presença de produtos antigênicos do parasito (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Na infecção por helmintos, há predominância da resposta Th2, conforme esquematizado na Figura 2, resultando no aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9 (UNDERDOWN; SCHIFF, 1986; ABU-GHAZALEH et al., 1989; LOUKAS, A; PROCIV, 2001; LICONA-LIMÓN et al., 2013). Indivíduos infectados apresentam também uma alta produção de anticorpos do tipo IgE, IgG e IgM (GANGULY et al., 1988; BUNGIRO et al., 2008). No entanto, estes anticorpos, não são capazes de gerar resistência à reinfecção (LOUKAS, ALEX et al., 2016).

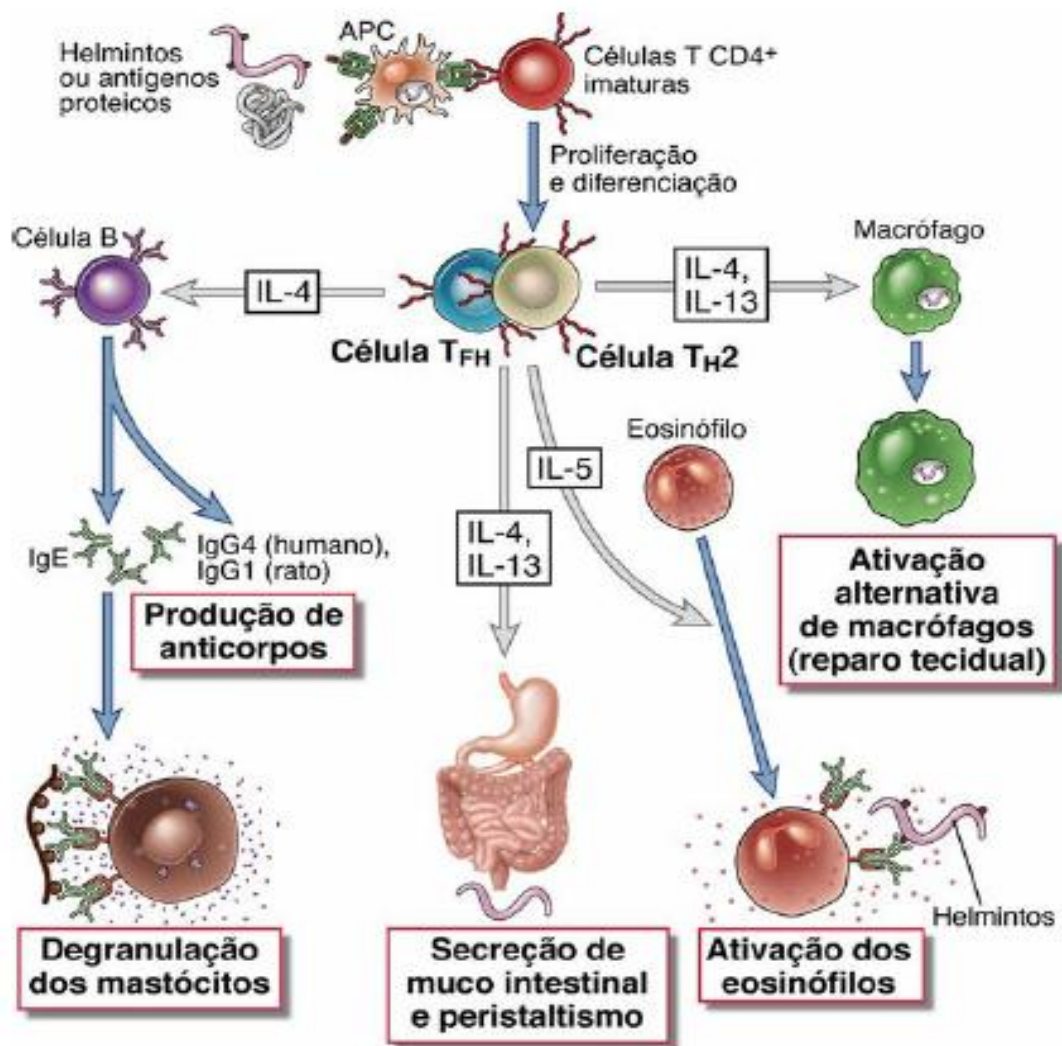


Figura 2: Resposta imunológica da infecção por helmintos. A infecção por helmintos estimula uma resposta do tipo Th2 aumentando a produção de citocinas IL-4, IL-13 e IL-5. A IL-4 estimula as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG provocando a desgranulação dos mastócitos. A ativação dos macrófagos M2, o aumento do peristaltismo intestinal e a produção de muco são intensificados pela IL-13 e IL-4. A elevação de IL-5 ativa eosinófilos que são efetivos na destruição das larvas. Fonte: ABBAS, 2015.

A IL-4 possui a capacidade de ativar os fatores de transcrição GATA-3 e STAT-6, inibindo as respostas Th1/Th17 e estimulando a diferenciação das células TCD4⁺ imaturas em Th2, elevando a produção de anticorpos do tipo IgG e IgE por células B (CHAKIR et al., 2003; FISH et al., 2005). O aumento no peristaltismo do intestino, produção de muco e macrófagos (M2) são estimulados pela IL-4 (HAO et al., 2017; WANG, YI et al., 2017). No entanto, a IL-4 não atua sozinha, juntamente com a IL-13, essas citocinas ativam diversos mecanismos protetores, enquanto, a IL-5 é capaz de estimular a ativação, diferenciação e proliferação dos eosinófilos (CHOI et al., 2003; WILSON, SHONA et al., 2013). Outras citocinas importantes na modulação da resposta imunológica apresentam elevação nos casos de infecção, como a IL-10 e TGF- β , as quais são produzidas por macrófagos M2 e células T reguladoras (Treg) (WILSON, MARK S; MAIZELS, 2006; ZACCONI et al., 2009; NAVARRO et al., 2016) . O aumento de IL-9 na infecção intensifica a resposta Th2, elevando os níveis de citocinas, contribuindo para proliferação de eosinófilos, basófilos e mastócitos e diminuindo a carga parasitária (CHANG, HUA-CHEN et al., 2010; LICONA-LIMÓN et al., 2013).

Na infecção, eosinófilos liberam grânulos citotóxicos na tentativa de eliminar o parasito (BUTTERWORTH, 1984; RAINBIRD; MACMILLAN; MEEUSEN, 1998) desempenhando um papel importante na resposta Th2 (DARLAN et al., 2017; YANG, BO-GIE; SEOH; JANG, 2017). Os eosinófilos são capazes de inibir a resposta Th1 e Th17 no intestino (SUGAWARA et al., 2016) e de produzir IL-4, contribuindo para a proliferação de macrófagos M2, importantes no reparo tecidual e na produção de citocinas (VAN DEN BERG et al., 2016).

Os basófilos são importantes na resposta protetora contra a infecção por helmintos. O aumento destas células deve-se tanto à infecção por helmintos quanto ao processo de alergias, quando migram para os tecidos, liberando proteases, histamina, quimiocinas, citocinas e mediadores lipídicos, colaborando para reações de hipersensibilidade (SOBOTKA et al., 1978; MIROLI; SPITZ, 1987; MUKAI et al., 2017).

1.6. A obesidade

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, cosmopolita e independe de clima ou classe social (DA LUZ et al., 2017; RACHMI; LI; ALISON BAUR, 2017). De acordo com a organização mundial de saúde (2017), a obesidade acomete cerca de 600 milhões de adultos, 48 milhões de crianças e cerca de 1,9 milhões de indivíduos apresentam sobrepeso, cujo crescimento deve-se à mudança nos hábitos alimentares e sedentarismo da população

(VILCHIS-GIL et al., 2015; KEANE et al., 2017; MENTZEL et al., 2017; PENG; GOLDSMITH; BERRY, 2017).

O consumo de dietas ricas em carboidratos simples e gordura proporcionam o ganho de peso, expansão do tecido adiposo e hipertrofia dos adipócitos, os quais entram em estado de hipóxia desencadeando um quadro clínico de inflamação de baixa intensidade e desequilíbrio metabólico (HOTAMISLIGIL, 2006; KROTKIEWSKI; BILLING-MARCZAK, 2014; PETRANGELI et al., 2016; JORDANIA DA SILVA et al., 2017). Neste quadro clínico são observadas diversas alterações fisiológicas, responsáveis pela perda da homeostase do organismo, promovendo o desequilíbrio metabólico capaz de desencadear dislipidemias, câncer, diabetes do tipo 2, doenças renais, pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas, psicossociais e disfunções endócrinas (NAMMI et al., 2004; BESSESEN, 2008; KAILA; RAMAN, 2008; OSBORN; OLEFSKY, 2012; TATEYA; KIM; TAMORI, 2013; GAROUFI et al., 2017). O quadro clínico observado em indivíduos obesos ocorre de forma lenta e prolongada e está relacionado ao desequilíbrio energético e alteração na produção de hormônios e citocinas no tecido adiposo como omentina, resistina, visfatina, adiponectina, leptina, apelina e TNF- α capazes de provocar alterações sistêmicas (OSBORN; OLEFSKY, 2012; AL-SUHAIMI; SHEHZAD, 2013).

Diversos trabalhos relatam alterações de parâmetros bioquímicos ocasionado pelo consumo de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas, a qual ocasiona o ganho de peso, interferindo na homeostase do organismo (BHATHENA et al., 2011; CHANG et al., 2014; LEE et al., 2014; GAO; MA; LIU, 2015). Sabe-se que indivíduos obesos apresentam alterações nos níveis plasmáticos de triglicérides, colesterol total e glicose, diminuindo os níveis de colesterol HDL (KIM et al., 2014a). Além disso, a diminuição dos níveis plasmáticos de albumina em obesos mórbidos está associada ao aumento da mortalidade (NELSON et al., 2015).

A obesidade é capaz de provocar alterações em diversos órgãos e tecidos, no fígado induz a esteatose hepática, promovendo o acúmulo de gordura ectópica no músculo, alterando o metabolismo de glicose e promovendo a resistência à insulina. No pâncreas ocorre a elevação de citocinas inflamatórias contribuindo para a resistência à insulina, enquanto no intestino, a modificação da microbiota é capaz de aumentar a permeabilidade intestinal, facilitando a passagem de endotoxinas para o plasma, contribuindo com o quadro clínico de inflamação. Além disso, a mudança na alimentação associada à obesidade é capaz de contribuir para o aumento de tamanho do intestino delgado, causando pouca ou nenhuma absorção de nutrientes

na região distal deste órgão, impedindo a atuação de fatores endócrinos que atuam na liberação de insulina e saciedade (WEAVER; AUSTIN; COLE, 1991).

Indivíduos obesos apresentam quadro clínico de anemia devido ao aumento nas concentrações de IL-6, que leva ao aumento da expressão de hepcidina pelo fígado, ocasionando a inibição na absorção de ferro da dieta (HINTZE et al., 2011). A secreção deste peptídeo ocorre pelos hepatócitos, tecido adiposo, macrófagos e células das ilhotas pancreáticas em resposta a hipóxia, inflamação e anemia, exercendo um papel fundamental na homeostase de ferro (NICOLAS et al., 2002).

1.7. Resposta imunológica em indivíduos obesos

Em indivíduos não obesos o tecido adiposo encontra-se em estado de homeostase favorecendo a sensibilidade à insulina e o equilíbrio metabólico. Neste caso, várias células contribuem para a manutenção da homeostase, como, eosinófilos, células linfóides inatas 2 (ILC2), macrófagos M2 e células T reguladoras. O ambiente observado no tecido adiposo destes indivíduos possui uma resposta do tipo Th2 com participação de citocinas IL-10, IL-4 e IL-13 (FEUERER et al., 2009; LYNCH et al., 2009; WU et al., 2011; LYNCH et al., 2012; OSBORN; OLEFSKY, 2012; BRESTOFF et al., 2015; BOULENOUAR et al., 2017).

Em humanos as células T invariantes “natural killer” (iNKT) estão envolvidas na homeostase do tecido adiposo e são inversamente proporcionais ao número de macrófagos classicamente ativados (M1), comuns na obesidade (RAKHSHANDEHROO; KALKHOVEN; BOES, 2013; LYNCH et al., 2012; LYNCH, 2014; MAGALHAES; KIAF; LEHUEN, 2015; LYNCH, 2016). À medida que este ambiente vai se modificando pela expansão do tecido adiposo, hipertrofia e hipóxia dos adipócitos; ocorre a transcrição de mediadores inflamatórios e a alteração da resposta para o tipo Th1 (TILG; MOSCHEN, 2006; ITO et al., 2007).

Durante a expansão do tecido adiposo, os adipócitos se afastam dos vasos, e consequentemente há uma diminuição de oxigênio disponível para estas células, levando à ativação do fator de transcrição induzível por hipóxia 1 (HIF-1), capaz de estimular vários genes relacionados à inflamação, resistência à insulina e angiogênese (LOLMÈDE et al., 2003; NEELS; OLEFSKY, 2006; WOOD et al., 2009; PAZ-FILHO et al., 2012; FOTI; BRUNETTI, 2017; MURPHY et al., 2017). Deste modo, a quimiocina MCP-1 (Proteína quimiotática de monócitos-1) estimulada por citocinas inflamatórias e ILC's do grupo 1 (TILG; MOSCHEN,

2006; ITO et al., 2007; O'SULLIVAN et al., 2016), juntamente com o mediador inflamatório leucotrieno B4 (LTB4), participa do processo de inflamação através da quimiotaxia de monócitos para o tecido adiposo, os quais passam a apresentar fenótipo M1 (SPITE et al., 2011; HIRATA et al., 2013; LI, PINGPING et al., 2015; YING et al., 2017).

Em indivíduos obesos, o aumento de ácidos graxos livres (AGL) no plasma é capaz de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios, devido à capacidade dos AGL de se ligarem aos Toll Like Receptor 4 (TLR-4) (SHI et al., 2006). A ativação de TLR-4 aumenta a expressão do fator de transcrição kB (NF-kB), o qual se liga ao DNA presente no núcleo da célula, ativando a transcrição gênica de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (BARMA et al., 2009). A elevação de TNF α no tecido adiposo interfere na expressão e regulação de diversos mecanismos, diminuindo a atividade da lipase lipoproteica (LLP), elevando os níveis da lipase hormônio sensível (LHS) e ocasionado o aumento dos níveis de ácidos graxos livres (PATTON et al., 1986; ASSMANN et al., 1991; KERN et al., 2001). Deste modo, ocorre a diminuição da lipogênese devido à inibição das vias de expressão de LLP; do transportador de glicose 4 (GLUT-4) e da acetil Coa sintetase (ARNER, 1995; WARNE, 2003). A IL-6 inibe a expressão de LLP e GLUT-4, elevando os níveis de ácidos graxos livres e estimulando a produção de Proteína C Reativa (PCR) (LYON; LAW; HSUEH, 2003; REXRODE et al., 2003), no entanto, o papel desta citocina, na obesidade, ainda é contraditório. Estudos atuais têm demonstrado que a IL-6 influencia na polarização de macrófagos M2, contribuindo para a sensibilidade à insulina e homeostase do tecido adiposo (WUNDERLICH et al., 2010; SADAGURSKI et al., 2010; MAUER et al., 2014; MA et al., 2015; BRAUNE et al., 2017).

A diferenciação das células T helper 1 (Th1) no tecido adiposo é estimulada pela IL-12, desencadeando o processo inflamatório e diminuindo a sensibilidade à insulina (TRINCHIERI, 2003; SUÁREZ-ÁLVAREZ et al., 2013). Aparentemente esta citocina é estimulada pela resistina (SILSWAL et al., 2005) por mecanismos não elucidados. O interferon gamma (IFN- γ) participa do processo de inflamação, através da inibição das ILCs do grupo 2 e da resposta do tipo Th2, causando diminuição das células T reguladoras (MOLOFSKY et al., 2015), enquanto a IL-1 é capaz de inibir as células β pancreáticas, contribuindo para a resistência à insulina e desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (MANDRUP-POULSEN, 1996; DONATH et al., 2008; DINARELLO; DONATH; MANDRUP-POULSEN, 2010; DONATH et al., 2013).

O processo inflamatório também é influenciado pela alteração nos níveis das adipocinas (proteínas sintetizadas e secretadas pelo tecido adiposo) como, omentina, resistina, visfatina, adiponectina, leptina e apelina. Destas, a mais conhecida é a leptina que atua na redução do apetite, ocasionando a saciedade e ocasionando o aumento da taxa metabólica (ROBBINS, 2001). No entanto, na obesidade os níveis de leptina encontram-se elevados, mas esta adipocina não é capaz de induzir a saciedade devido ao desenvolvimento da resistência ocasionado pela possível alteração no transporte até o cérebro ou pela diminuição da resposta dos receptores (MÜNZBERG; FLIER; BJØRBAEK, 2004; BANKS; DIPALMA; FARRELL, 1999; ENRIORI et al., 2011; PAZ-FILHO et al., 2012). A leptina é capaz de interferir em mecanismos imunológicos influenciando na atividade e função dos mastócitos, neutrófilos e macrófagos, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ e MCP-1 (MATTIOLI et al., 2005; SUN et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

1.8. Infecção e modulação da resposta imunológica na obesidade e diabetes

A infecção por helmintos tem proporcionado a melhoria de alguns parâmetros relacionados à obesidade. O aumento de eosinófilos na infecção é capaz de ativar macrófagos M2 no tecido adiposo e de induzir a termogênese proporcionando atenuação da morbidade em indivíduos obesos (WU et al., 2011; LEE, STEPHEN D.; TONTONOZ, 2014; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014), contribuindo assim para a homeostase do tecido adiposo.

Em camundongos RIP2-Opa1KO, modelo que apresenta ganho de peso, intolerância à glicose e hiperglicemia, a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* atenuou o ganho de peso e melhorou a homeostase de glicose (YANG, ZHONGHAN et al., 2013). Resultados similares foram demonstrados em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (HFD) (YANG, ZHONGHAN et al., 2013). Neste mesmo estudo, a infecção levou à diminuição da lipogênese, melhoria na esteatose hepática dependente de IL-13/STAT6, ativação e proliferação de macrófagos M2 (YANG, ZHONGHAN et al., 2013). Enquanto a via de sinalização IL-4/STAT6 potencializou a ação da insulina, diminuindo a intolerância à glicose e atenuando danos hepáticos (RICARDO-GONZALEZ et al., 2010). A melhoria dos parâmetros relacionados à ação da insulina e tolerância à glicose também foi demonstrada na infecção crônica por *Schistosoma mansoni* em camundongos C57BL/6 (HUSSAARTS et al., 2015), e resultados semelhantes reproduzido em humanos obesos infectados com *Schistosoma japonicum* (SHEN et al., 2015).

Como citado anteriormente, a obesidade aumenta os fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, dentre elas, a aterosclerose caracterizada pelo acúmulo de lipídeos nas artérias, perda da resistência, elasticidade das artérias e inflamação. Camundongos C57BL/6 deficientes para a Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) apresentaram diminuição do colesterol total, do tipo LDL (lipoproteína de baixa densidade) e aumento da reposta Th2 quando infectados por *S. mansoni*, não havendo, entretanto, interferência na lesão arterosclerótica (LA FLAMME et al., 2007). No entanto, o trabalho realizado por Doenhoff et al. (2002) demonstrou que a infecção por *S. mansoni* preveniu o desenvolvimento da aterosclerose e interferiu no metabolismo de lipídeos. Resultados similares foram apresentados por Stanley et al. (2009). Estudos em humanos demonstraram que a infecção por *S. japonicum* influenciou no metabolismo de lipídeos (SHEN et al., 2015).

A infecção crônica por *Strongyloides stercoralis* em humanos, diminuiu o risco de desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (HAYS et al., 2015, 2016). Enquanto em camundongos C57BL/6 com diabetes do tipo 1, induzida por streptavidina (STZ), o tratamento prévio com antígenos solúveis e a infecção por *S. venezuelensis* causaram a elevação da produção de insulina pelo pâncreas, melhorando a tolerância à glicose e proporcionando o aumento de citocinas IL-10 e IL-5 (PERES et al., 2013).

Existem indícios de que a infecção por ancilostomídeos contribuiria para diminuição dos sintomas de indivíduos com doença celíaca e com doença de Crohn. Aparentemente a infecção diminui a intolerância ao glúten, característica que pode estar associada à modificação da microbiota intestinal (DAVESON et al., 2011; CROESE et al., 2015). Outros estudos demonstraram que pacientes com doença de Crohn apresentaram menor ativação das células T, quando tratados com antígenos de ancilostomídeos (KABEERDOSS et al., 2011). No entanto, não existem, até o momento, estudos associando a obesidade com a infecção por ancilostomídeos, descritos na literatura.

2. JUSTIFICATIVA

Compreender os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro na condição clínica de obesidade torna-se necessário, uma vez que a obesidade se tornou epidêmica no mundo atual e independe do clima de um país ou condição social de uma população. Por outro lado, apesar das tentativas da Organização Mundial da Saúde para erradicar as helmintoses através do tratamento em massa, essas infecções persistem, especialmente, na população mais carente de países em desenvolvimento. Dessa forma, o comprometimento do fator nutricional do hospedeiro em infecções parasitárias pode influenciar na patogenia causada pelo parasito e de forma inversa, as modulações da resposta imunológica causadas pelo parasito, podem interferir no quadro de obesidade. Embora existam relatos na literatura associando infecções por helmintos e obesidade, poucas espécies de parasitos foram estudadas e ainda faltam dados associados aos efeitos ocasionados pela infecção em indivíduos obesos. No que diz respeito às infecções por ancilostomídeos, um bom modelo para a avaliação de parâmetros associados ao parasitismo é a infecção por *A. ceylanicum* em hamsters, um modelo experimental já estabelecido, que reproduz bem o quadro de infecção em humanos, como perda de peso, diminuição no ritmo de crescimento e anemia.

Partindo da hipótese que a resposta Th2 e a produção de citocinas regulatórias proveniente da infecção por helmintos intestinais contribuiriam para a diminuição da morbidade em indivíduos obesos, atenuando o quadro clínico de inflamação, melhorando a intolerância à glicose e aumentando a sensibilidade à insulina, o presente trabalho visa investigar se ocorre uma atenuação na patogenia e modulação da resposta imunológica, em modelo experimental obeso, decorrente da infecção por *A. ceylanicum*.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar se a infecção por *A. ceylanicum* em animais experimentais obesos, poderia atenuar a resposta inflamatória no hospedeiro, causada pelo quadro de obesidade.

3.1. Objetivos específicos:

- Estabelecer o modelo de obesidade em hamster;
- Avaliar parâmetros parasitológicos de hamsters obesos infectados em comparação a animais normonutridos controles e infectados com *A. ceylanicum*;
- Avaliar parâmetros bioquímicos de hamsters obesos infectados em comparação a animais normonutridos controles e infectados com *A. ceylanicum*;
- Avaliar parâmetros hematológicos de hamsters obesos infectados em comparação a animais normonutridos controles e infectados com *A. ceylanicum*;
- Comparar a resposta imunológica de hamsters obesos infectados a animais normonutridos controles e infectados com *A. ceylanicum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção do parasito e obtenção de L3

A cepa de *A. ceylanicum* é mantida em hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com 100 L3 por gavage oral, conforme projeto aprovado sob o número 385/2016. A eliminação de ovos nas fezes dos animais infectados inicia-se com 16 dias e a coprocultura das fezes dos animais para realização da infecção no presente experimento foi realizada após 20 dias. As larvas L3 utilizadas para infecção foram obtidas através da coprocultura das fezes de hamsters infectados por *A. ceylanicum*. Os animais foram mantidos em gaiolas próprias para coleta de fezes no período noturno por 12 horas. No dia seguinte as fezes foram transferidas para copos de plásticos de 300 mL contendo água para que essas se tornassem menos densas, Quando a mistura de fezes e água tornou-se homogênea houve a adição de vermiculita para manter a umidade da mistura, a qual foi coberta com papel alumínio contendo alguns orifícios para oxigenação. Os copos contendo a mistura foram mantidos em estufa a 27°C por sete dias para desenvolvimento das larvas, após este período foi realizado a técnica de Baermann & Moraes com a coprocultura exposta por 24 horas para obtenção das L3. As larvas obtidas neste processo foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e adicionado água destilada. Após esta etapa 100 µL da mistura foi transferida para placa de Petri e levada a lupa para avaliar a motilidade e viabilidade das larvas obtidas e após esta análise as larvas foram quantificadas para infecção.

4.2. Dietas específicas

A obesidade é proporcionada pelo aumento da ingestão calórica, fornecida, especialmente, pelo consumo de gordura e açúcar. Por este motivo, a utilização de dietas com este perfil em modelos experimentais mimetiza a morbidade observada em humanos. Assim, a dieta AIN-93 M desenvolvida para suprir as necessidades diárias de roedores permite a modificação dos ingredientes e possibilita avaliar o estado nutricional em modelos experimentais. O acréscimo de manteiga e açúcar (HSB) na dieta AIN-93 M altera a composição lipídica e calórica, promovendo o desenvolvimento da obesidade em hamsters. Sendo assim, a dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB), desenvolvida por Maioli e colaboradores para camundongos (2016) e usada para a obtenção de obesidade em hamsters pelo nosso grupo (JORDANIA DA SILVA et al., 2017) foi utilizada para indução de obesidade, enquanto a dieta AIN-93 padronizada para roedores foi consumida pelos animais normonutridos. A Tabela 1 mostra a composição das duas dietas e a Tabela 2 mostra a porcentagem dos componentes, carboidrato, proteínas e lipídeos nas dietas AIN93-M e HSB e

as calorias de cada dieta.

Toda a metodologia e resultados sobre a padronização para a obtenção de hamsters obesos, utilizando a dieta HSB, foi publicada (JORDANIA DA SILVA et al., 2017) e se encontra no Anexo I deste trabalho.

Tabela 1: Composição das dietas AIN-93 (controle) e HSB.

Ingredientes	Dieta g/kg	
	Dieta AIN-93 M*	Dieta HSB
Amido de milho	466	266
Caseína (>85% proteína)	140	140
Amido dextrinizado	155	-
Açúcar	100	265
Óleo de soja	40	40
Fibra (celulose)	50	50
Mix Mineral (AIN-93 M-MX)	35	35
Mix vitamina (AIN-93-VX)	10	10
L-cisteína	1.8	1.8
Bitartarato de colina	2.5	2.5
BHT	0,008	0,008
Manteiga sem sal	-	190
Total	996	996

Tabela 2: Porcentagem dos componentes carboidrato, proteínas e lipídeos nas dietas AIN93-M e HSB e calorias de cada dieta

	AIN93-M	HSB
Carboidrato (%)	76	45
Proteína (%)	15	12
Lipídeos (%)	9	44
Calorias por grama de dieta (kcal/ g)	3,80	4,80

4.3. Delineamento experimental

Considerando a obra de Sampaio (1998), que trata sobre o cálculo amostral de experimentos biológicos, foram utilizados vinte e quatro hamsters (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com quatro a seis semanas de idade, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram divididos em quatro grupos com 6 animais cada: grupo normonutrido (NN), grupo normonutrido infectado (NI), grupo recebendo dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB) e grupo recebendo dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI), os quais consumiram respectivamente a dieta AIN-93 M e HSB (dieta com alto teor de açúcar e manteiga) (Tabela 1). A constatação da obesidade foi dada pela alteração de peso e perfil bioquímico, sendo considerados obesos os animais que atingiram o peso 50% maior que o grupo normonutrido e apresentavam elevação de algum dos seguintes parâmetros bioquímicos: triglicérides e/ou colesterol total e/ou glicose. Todos os grupos foram alimentados *ad libitum* e permaneceram com suas respectivas dietas até o término do experimento.

Os hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram mantidos em gaiolas plásticas contendo seis animais cada, em ambiente climatizado. A temperatura do ambiente foi monitorada e mantida entre 29°C a 31°C, umidade acima de 50% e fotoperíodo de 12 horas. Para eliminar outras possíveis infecções parasitárias, após a ambientação dos animais no biotério, ocorreu o tratamento com albendazol (Nova Química, Brasil), 40mg/Kg/animal, por via oral. Após o tratamento com antihelmintico de largo espectro, o peso da ração a ser fornecida aos animais e o peso dos animais foram aferidos, e esse procedimento foi realizado semanalmente. No dia 0 foi realizada a coleta de sangue via sublingual. Posteriormente, a dieta foi oferecida a ambos os grupos: controle normonutrido (NN) – dieta AIN-93 – ou dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB) e o peso foi aferido semanalmente. A coleta de sangue foi realizada a cada 30 dias e, no caso de constatação da diferença de peso de 50 % do grupo HSB em relação ao NN, a coleta também foi realizada.

Os animais foram observados diariamente para verificar o comportamento, envolvendo hierarquia de dominância, brigas e canibalismo dos animais mortos, situações comuns em grupo de hamsters e para a necessidade de complementação de alimento e água, o que tem como objetivo diminuir problemas de estresse. Tais procedimentos são uma prática rotineira no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFMG e tem sido realizado em todos os experimentos do grupo.

Assim que a indução da obesidade foi detectada (após 10 semanas do início da dieta) os animais foram infectados com 50 L3 de *A. ceylanicum* obtidas na fase aguda da infecção (20 dias após a infecção) da coprocultura das fezes de hamsters utilizados para a manutenção da cepa. As larvas foram inoculadas via oral, com auxílio de gavagem, no tubo digestivo superior dos hamsters. A patência da infecção foi realizada pela contagem de ovos eliminados nas fezes dos grupos infectados por exames de fezes realizados 10 dias após a infecção e realizados a cada 2 dias. Aos 20 dias de infecção foi realizada a coleta de sangue e os animais foram eutanasiados para recuperação dos vermes adultos e retirada de órgãos que foram utilizados para avaliar a resposta do animal à infecção e/ou obesidade, conforme descrito a seguir.

Todos os procedimentos relativos à manipulação, infecção e eutanásia dos hamsters seguiram as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), e em acordo com a normativa CONCEA nº 12 de setembro de 2013, conforme projeto aprovado sob o número de protocolo 239/2014.

4.4. Eliminação de ovos nas fezes

Dez dias após a infecção foi iniciada a coleta de fezes para realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), em câmara de McMaster. Resumidamente, quatro gramas de fezes foram coletadas da gaiola e solubilizadas em 30 mL de água. Após homogeneização, foram acrescentados 30 mL de solução saturada de sal, seguida de agitação constante. Em seguida, uma alíquota foi retirada e depositada na câmara de McMaster até seu completo preenchimento. A câmara permaneceu em repouso por 5 minutos e a leitura foi realizada em microscópio óptico (aumento = 100X). O número total de ovos foi multiplicado pelo fator de correção da câmara.

4.5. Ovoposição em 24 horas

O método foi adaptado de Barth et al.(1996) e consiste em avaliar, *in vitro*, durante 24 horas, o número de ovos eliminados por fêmeas adultas recuperadas diretamente do intestino dos animais após a eutanásia. Para isso, foram utilizadas placas de 12 poços contendo solução de PBS 1x e, em cada poço, foram colocados os vermes, os quais foram incubados por 24 horas, a 37°C. Após este período, os vermes foram retirados, machos e fêmeas separados e contabilizados para cálculo posterior. O líquido da placa foi retirado, centrifugado a 10.000 g,

por 5 minutos e o sedimento foi conservado em 1 mL de formol, para posterior contagem dos ovos em microscópio óptico.

4.6. Índice de atividade da infecção

O índice de atividade da doença sugerido por McHenga et al. (2008) para colite foi adaptado inicialmente pelo grupo da Professora Ana Maria Caetano de Faria do Departamento de Bioquímica-Imunologia da UFMG, para patogenias em camundongos e nos foi gentilmente cedido para ser usado na infecção por *A. ceylanicum* em hamster. Nesse índice é avaliado o peso do animal, consistência e a presença de sangue nas fezes, conforme estabelecido na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de referência para mensuração do índice de atividade da infecção (IAI)

Score	Perda de peso	Consistência das fezes	Sangue nas fezes	Avaliação
0	Nenhum	Normal	Ausente	Normal
1	10-20%	Pouco perdida	Pouco	Leve
2	20-30%	Perdida	Presente	Moderada
3	>30%	Diarreica	Presente	Grave

*Consistência das fezes: Normal: fezes com aparência de bem formada; Pouco perdida: ligeira perda do formato; Perdida: pastosa, Semi-formada, amolecida, mas não adere ao ânus; Diarreicas: fezes líquidas que aderem ao ânus. Sangue nas fezes: Visivelmente presente: sangue visível aderindo na região anal.

4.7. Coleta de sangue e hemograma

Para realização da coleta de sangue via sublingual, cada animal foi anestesiado (15 mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 80 mg/kg de ketamina), via intraperitoneal. O hamster foi contido pela pele do pescoço, no intuito de possibilitar o acesso parcial da jugular e veias linguais. Os animais foram colocados na posição supina e a língua foi estendida por outra pessoa, com o auxílio do polegar e de um cotonete. A parte caudal esquerda da língua ficou evidente e as veias sublinguais foram puncionadas com agulha hipodérmica 25 x 0,55, alterando a posição do animal para ventral. O volume total de sangue obtido por coleta foi de aproximadamente 500 µL/ hamster.

Uma alíquota foi utilizada para realização da contagem de eritrócitos e leucócitos totais em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, cerca de 3 µL de sangue foram preparados para realização do esfregaço que foi corado utilizando o kit Panótico rápido e a

contagem das células foi realizada em microscópio óptico (Olympus BH2 - Japan). Os valores utilizados como parâmetros fisiológicos para hamsters no hemograma e leucograma foram obtidos de Mitruka e Rawnsley (1981). O restante da amostra de sangue foi submetido à centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente, para a recuperação do plasma, que foi armazenado, em alíquotas, a -20 °C, para a realização posterior dos ensaios bioquímicos e imunológicos.

4.8. Eutanásia e avaliação macroscópica dos órgãos

Após vinte dias de infecção e em jejum de 12h (noturno), os animais foram pesados em balança semi-analítica para aferir o peso corporal final e sacrificados com sobredose de anestésico (45 mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 300 mg/kg de ketamina), via intraperitoneal. Confirmada a morte, os animais foram colocados de decúbito dorsal e a cavidade abdominal foi aberta, o intestino delgado foi retirado e aberto em placa de Petri contendo PBS para recuperação dos vermes adultos diretamente da mucosa intestinal. Os vermes foram separados por sexo, e contados.

Após a abertura da cavidade abdominal, todo o tecido adiposo visceral foi retirado e separado para cálculo do índice de adiposidade (descrito a seguir). O fígado, baço, gânglio central da cadeia de linfonodos mesentéricos, pâncreas e intestino delgado foram observados e removidos cuidadosamente, para evitar lesões. Estes órgãos foram utilizados em outras análises (descritas posteriormente) mas, antes, foram pesados em balança analítica de alta precisão e o intestino delgado foi medido com régua milimetrada.

4.9. Adiposidade

No dia anterior a eutanásia os animais foram pesados em balança semi-analítica para aferir o peso corporal final. A variação ponderal foi calculada através do peso da semana atual subtraído da semana anterior. O tecido adiposo visceral (mesentérico) foi retirado e pesado após a eutanásia. Para o cálculo da adiposidade foi utilizada a fórmula, conforme descrito por Pacanaro e colaboradores (2014):

$$\text{Adiposidade} = \frac{\text{Peso do tecido adiposo} \times 100}{\text{Peso corporal final}}$$

4.10. Testes bioquímicos séricos e curva glicêmica

A partir do plasma sanguíneo obtido no dia da eutanásia, foram determinadas as concentrações dos seguintes componentes/parâmetros: triglicérides, colesterol total, glicose, proteínas totais, albumina, ferro sérico. Para isso, foram utilizados kits comerciais Doles Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

Para realização da curva glicêmica, foi administrado a solução de Dextrose (1,75g/Kg NEWPROV, Brasil) por gavagem oral. O teste foi realizado nos intervalos de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose no aparelho Accu-Chek Performa.

4.11. Avaliação lipídica e proteica do tecido hepático e conteúdo cecal

Para obtenção de lipídios hepáticos e fecais foi empregado o método de Folch e colaboradores (1957). Para realização do procedimento foi utilizado 100 mg de tecido hepático ou fezes obtidas do intestino grosso, os quais foram inseridos em tubos de vidro. As amostras foram homogeneizadas por três minutos em 1.900 µL de solução de clorofórmio:metanol na proporção de 2:1. Após este procedimento, foi adicionado 400 µL de metanol, seguido de centrifugação por 10 minutos, a 3000 g. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro previamente pesado e 800 µL de clorofórmio foi acrescentado. Posteriormente, foi adicionado 640 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl 0,73%), seguido de centrifugação, por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi desprezado e o material lipídico preso na parede do tubo foi lavado com 600 µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%) e o tubo colocado na estufa a 37°C para secagem. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a secagem os lipídios presentes no tubo foram ressuspensos em 500 µL de isopropanol utilizando aparelho vórtex. A dosagem de triglicérides, colesterol e proteínas totais foram realizados pelo kit comercial Doles Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil), conforme orientação do fabricante.

4.12. Análise da expressão de genes associados à resposta celular

A resposta celular foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real através da quantificação relativa. Para realização da técnica foi realizada a extração de RNA das amostras a serem analisadas e a síntese dos cDNA a partir dos RNA, para a amplificação dos genes alvos.

4.12.1. Extração de RNA total

Amostras de linfonodo mesentérico, retirado após a eutanásia dos animais e imediatamente conservadas em RNA later (Thermo Fisher Scientific) foram homogeneizadas para obtenção do RNA total utilizando a solução TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente: após o descongelamento da amostra, foi adicionado 1mL de TRIzol e o tecido (aproximadamente 100mg) foi homogeneizado utilizando homogeneizador tecidual Omni TM125. Após este procedimento as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, 10 minutos, 4°C. Nesta etapa, o RNA (sobrenadante) foi transferido para outro tubo e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1mL de TRIzol foi adicionado 200 µL de clorofórmio, e a fase superior foi transferida para outro tubo. 500 µL de isopropanol foram adicionados ao novo tubo, e a amostra foi incubada por 10 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 g, 10 minutos, 4°C. O RNA formou um pellet, que foi lavado com 1 mL de etanol 75%, o tubo foi centrifugado por 5 minutos nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi descartado. O RNA foi ressuscitado em 50 µL de H₂O_{DEPC}. A quantificação e qualidade do RNA foram avaliadas pela relação 260/280 por leitura no espectrofotômetro Epoch e em gel de agarose 1%. O RNA produzido foi estocado a -80°C até o momento de sua utilização.

4.12.2. Síntese cDNA

As amostras de RNA foram submetidas a tratamento com DNase usando o kit TURBO DNA-free™ (Ambion®), segundo instruções do fabricante. Após o tratamento com DNase, 2µg de RNA total foram utilizados como molde para a síntese de cDNA, usando um volume final de 20 µl contendo 25 ng/µl de oligohexâmeros, 500 µM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM de DTT e 200 unidades da transcriptase reversa usando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription*™ (Applied Biosystems), com incubação a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, seguidos de 85°C por 5 minutos. Simultaneamente, foram preparados controles de transcrição sem adição da enzima transcriptase reversa para atuarem como controle negativo (RT-), demonstrando a ausência de DNA genômico.

4.12.3. Alvos moleculares

Foi determinado o perfil de expressão dos genes de IL-10, IL-4, IL-6, IL-2, TNFα, IFN-γ, FoxP3 através do método de quantificação relativa por Ct comparativo, ou 2^{-ΔΔCt}

(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) utilizando o gene da hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT) e Gamma-actina (ACT-G1) como genes de referência. A amostra de referência (calibrador) foi o grupo controle. As reações foram realizadas com 10 ng de cDNA por reação. Os experimentos foram analisados com o auxílio do *software Expression Suite v 1.0*.

As sequências obtidas após as análises *in silico* foram utilizadas nos desenhos dos iniciadores no programa Primer Express 3.0.1 (Applied Biosystem). A tabela 4 resume os dados de cada iniciador, assim como o número de acesso da sequência no NCBI e os tamanhos de cada produto esperado.

Tabela 4: Sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho, com número de acesso de referência no NCBI, temperatura de anelamento (Tm) e tamanho do produto utilizando os respectivos iniciadores desenhados para cada citocina.

Gene	Acesso NCBI		Iniciadores qPCR	Tm (°C)	Produto (pb)
IL-2	NM_001281629	F	CGTGCTGGATTTGGCTCAA	59	98
		R	CAGAGCCCTTTAGTTTCACAACCTG	58	
IL-4	XM_005067769	F	CATGCACCGAGATGGTCGTA	59	59
		R	TTTCTCCGTGGAGTTCTTCCTT	58	
IL-6	XM_005087110	F	CACCATCAAACCCTAAGTCAGATC	59	73
		R	TGGGCTAGGCGTGACTATTTTATC	60	
IL-10	XM_005079860.1	F	GCAGCGCTGTCATCGATTT	59	56
		R	CCTGTTCCACAGCCTTGCTT	59	
IFN- γ	NM_001281631	F	AACAGCAGCATGGAGAACTCA	59	66
		R	CTGAAGGTCATTTACCGGAATCTT	59	
TNF- α	XM_005086799.1	F	TGAGCCATCGTGCCAATG	59	79
		R	AGCCCGTCTGCTGGTATCAC	59	
HPRT	XM_005085546.1	F	TGGAGTGATTATGGACAGGACTGA	59	64
		R	ATGGCCTCCCATCTCTTTCA	58	
ACT-G1	XM_005070180.1	F	GAAACCTTCAACACCCAGC	56.6	87
		R	CATGACAATGCCAGTGGTGC	57.2	

4.12.4. qPCR em tempo real

Foi construída uma curva de eficiência dos iniciadores para cada alvo utilizado. Para isso, o cDNA sintetizado foi diluído seriadamente na proporção de 1:5 até obter as seguintes concentrações: 50 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 2 ng/ μ L, 0,4 ng/ μ L e 0,08 ng/ μ L.

As diluições foram utilizadas nas reações de qPCR em um volume final de 10 µL utilizando *PowerUP SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), composto pelo marcador *SYBR® Green I*, *AmpliTaq Gold® DNA Polimerase*, dNTPs e tampão otimizado. Foram adicionados à reação 0,3 µM de cada iniciador, 1 µL de cDNA diluído e água DEPC para completar o volume para 10 µL. Todas as reações foram feitas em duplicata, e a reação contendo água foi usada como controle negativo.

As reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em placas de polipropileno para 96 amostras cobertas por adesivos ópticos, ambos da empresa Applied Biosystems. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos com 95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 60 segundos para anelamento dos iniciadores e extensão. Uma etapa de dissociação é adicionada ao final do programa para que as análises de amplificação específica possam ser feitas após o término das reações.

Os valores de Ct obtidos para cada amostra foram utilizados para gerar um gráfico de Ct x Quantidade de cDNA (ng). A inclinação (slope) desta reta é utilizada para calcular a eficiência de amplificação dos iniciadores de cada alvo.

4.13. Testes imunoenzimáticos

4.13.1. Atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

Para contagem indireta de macrófagos foi realizada a técnica de dosagem de NAG a partir do tecido adiposo branco da região do mesentério (100mg) extraído dos hamsters conforme protocolo de Bailey (1988). Resumidamente, este tecido foi homogeneizado com o homogeneizador tecidual Omni TM125 em 1,9 mL de solução de tampão I gelado (NaCl 0,1 M; Na₃PO₄ 0,05 M; Na₂EDTA 0,015 M) e então centrifugado a 4°C por 10 minutos a 85g. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao tubo 1,5mL de NaCl 0,2 % para lise das hemácias e após 30 segundos foi adicionado 1,5 mL de NaCl 1,6 % com glicose 5%. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 85g a 4°C por 22 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1,5 mL da solução de tampão II (Na₃PO₄ 0,05 M; HETAB 0,5%) em temperatura ambiente. Os passos descritos acima são os mesmos para NAG e MPO.

Após o procedimento descrito anteriormente, foi adicionado 2mL de Triton X-100 gelado a 750 µL da amostra, que foi homogeneizada e centrifugada a 85 g por 10 minutos. A

fase superior da amostra foi diluída em tampão citrato/fosfato na proporção de 1:2 e 100 µL transferido para a placa de 96 poços em duplicata. Foi adicionado 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida) diluído em Tampão Citrato/Fosfato (0,767/mL de tampão) em cada poço e a placa foi envolvida em papel alumínio e incubada a 37°C por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 100 µL de tampão glicina 0,2 M (Glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M; NaOH 0,8 M) e a leitura realizada a 405nm.

4.13.2. Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para contagem indireta de neutrófilos foi realizada a técnica de dosagem de MPO a partir do tecido adiposo branco da região do mesentério (100mg) extraído dos hamsters, conforme protocolo de Bailey (1988). Após os procedimentos descritos no item 4.13.1, o material foi homogeneizado e submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, para que as vesículas contendo peroxidase, fossem rompidas e em seguida o material foi centrifugado a 85 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi diluído na proporção de 1:1 até 1:5 em tampão II e 25 µL foi transferido para placa de 96 poços em duplicata. Para mensuração do branco, foi utilizado 25 µL de tampão II. Para detecção da MPO foi acrescentado em cada poço 25 µL do substrato TMB 1,6 mM (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina) diluído em DMSO (dimetilsulfóxido). A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, posteriormente foi adicionado 100 µL de H₂SO₄ (1 M) e a leitura realizada a 450 nm. A unidade obtida por este procedimento é expressa em densidade óptica (D.O.) como número relativo de neutrófilos/100 mg de tecido.

4.13.3. Atividade da peroxidase (EPO)

Para estimar o número de eosinófilos, foi medida a atividade da peroxidase (EPO) conforme STRATH (1985). Neste procedimento, 100 mg de tecido adiposo foi homogeneizado em 1,9 mL de PBS, centrifugado a 85 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As hemácias presentes no sedimento foram lisadas pela solução hipotônica, acrescentada à mistura na proporção de 1,5mLde solução de NaCl a 0,2 %, após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de igual volume (1.5 mL) de solução de cloreto de sódio 1,6 % contendo 5 % de glicose. Para lise das membranas celulares, após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em tampão fosfato contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HETAB), pH 7,4. Com o objetivo de romper as vesículas que contém peroxidase, o material foi homogeneizado e submetido a três ciclos de congelamento e

descongelamento em nitrogênio líquido, seguido de centrifugação a 85 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado na realização do ensaio enzimático em placas de 96 poços. Para isso, foi adicionado 75 μ L de cada amostra a 75 μ L de uma solução contendo peróxido de hidrogênio (O-phenylenediaminadihydrochloride, OPD – 1,5 mM, em tampão Tris-HCl – 75 mM, pH 8 suplementado com H₂O₂ –6,6 mM). A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sendo a intensidade da cor aferida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 492nm e o resultado foi expresso em densidade óptica (D.O.).

4.14. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados foi utilizado o software GraphPad Prism 5. As análises entre dois grupos foram realizadas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não-pareado (dados paramétricos) e Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney (dados não-paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA ou Reapeated Measures ANOVA seguido do de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do teste de Dunns (dados não-paramétricos). Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A infecção por *A. ceylanicum* acentua a perda de peso e diminui o índice de adiposidade visceral nos animais com obesidade induzida.

Durante a indução de obesidade os animais que consumiram a dieta HSB apresentaram diarreia após três semanas de experimento, devido ao aumento do consumo de gordura. Após a adaptação à nova alimentação os animais se recuperaram e com seis semanas começaram a ganhar peso (figura 3A). A obesidade foi constatada após 10 semanas levando em consideração o peso dos animais, alterações bioquímicas e hematológicas, ocorrendo a infecção nesta mesma data e eutanásia após 13 semanas de experimento e com 3 semanas após a infecção.

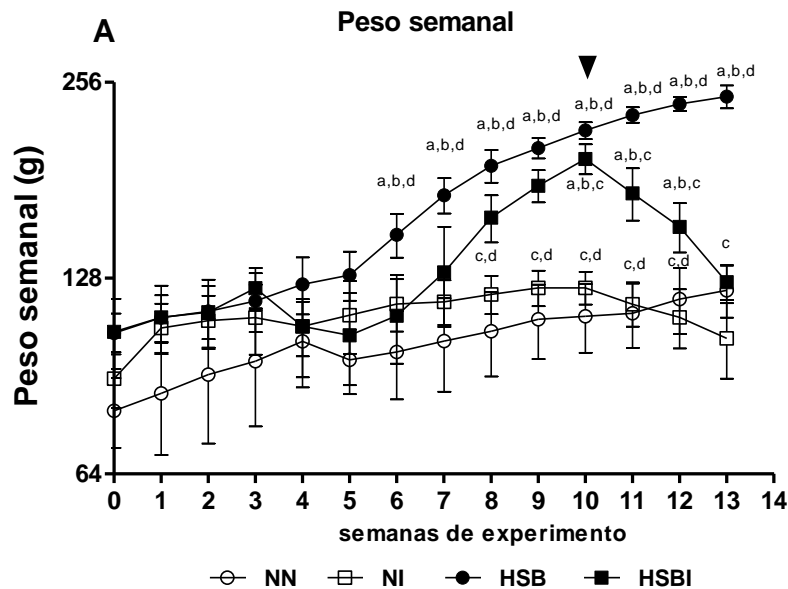


Figura 3: Variação do peso dos animais ao longo do experimento. (A) Aferição do peso semanal. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). **= $p < 0,05$; ***= $p < 0,01$; ****= $p < 0,001$. ▼ Valores representados em média \pm desvio padrão. Data da Infecção. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

A variação ponderal de peso demonstrou que entre 6 e 10 semanas, os animais dos grupos HSB e HSBI apresentaram um ganho de peso considerável (Figura 4A). Diferentemente do grupo HSB, o grupo HSBI apresentou uma drástica perda de peso, ocasionada pela infecção, causando maior debilidade dos animais com diarreia intensa e antecipação da eutanásia para 21 dias após a infecção (Figura 4A).

A análise da adiposidade visceral demonstrou que os animais dos grupos HSB e HSBI apresentaram um maior acúmulo de tecido adiposo na cavidade abdominal (Figura 4B). Não houve diferença significativa no consumo de ração e água. Entretanto, a ingestão calórica dos animais obesos foi maior devido à quantidade de Kcal da dieta HSB, induzindo a obesidade conforme descrito por Jordania da Silva e colaboradores (2017).

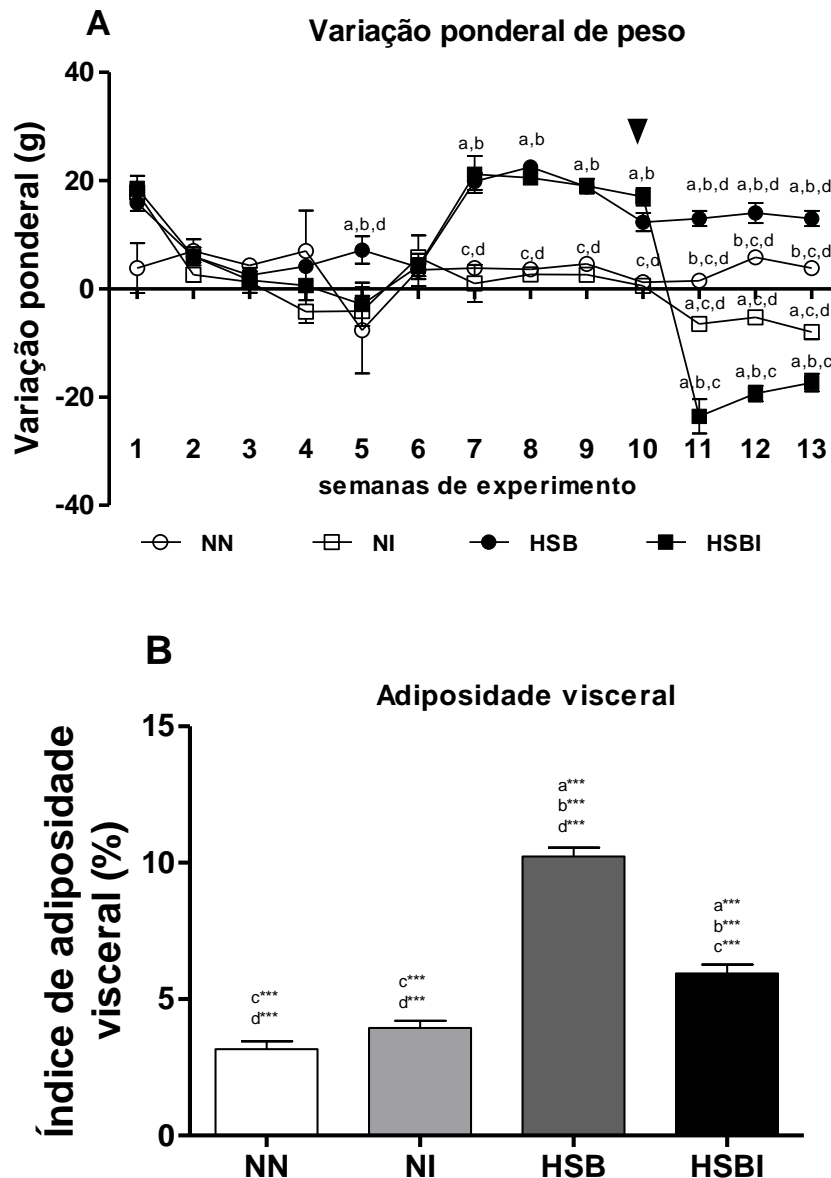


Figura 4: Avaliação da variação ponderal de peso e adiposidade visceral. (A) Variação ponderal de peso. (B) Índice de adiposidade visceral. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). **= $p < 0,05$; ***= $p < 0,01$; ****= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns. ▼ Data da Infecção.

5.2. A infecção por *A. ceylanicum* causa aumento do baço dos animais com obesidade induzida

A análise macroscópica dos órgãos e tecidos demonstrou que a infecção associada à obesidade levou ao aumento do baço no grupo HSBI (Figura 5A). Enquanto os animais dos grupos HSB e HSBI apresentaram aumento do fígado, de forma mais acentuada no grupo HSB (Figura 5B).

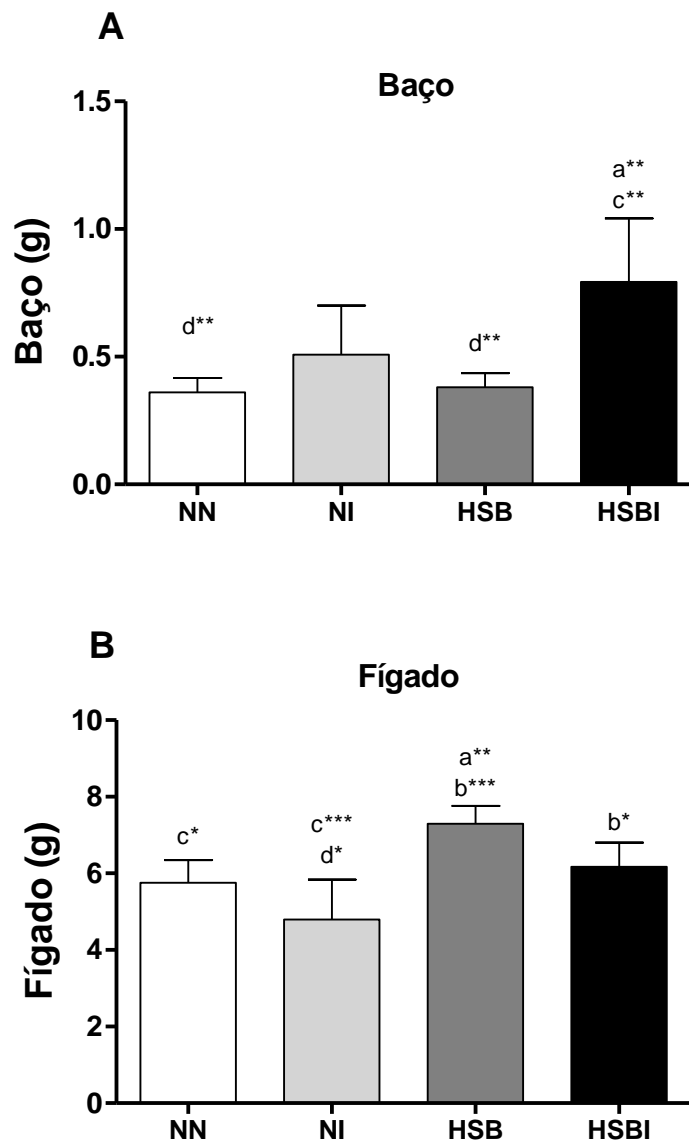


Figura 5: Análise macroscópica dos tecidos e órgãos. (A) Peso do baço. (B) Peso do fígado. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

O massa do linfonodo mesentérico em ambos os grupos infectados, HSBI e NI (Figura 6A). Enquanto a obesidade causou alterações no massa do pâncreas, como demonstrado nos grupos HSB e HSBI (Figura 6B).

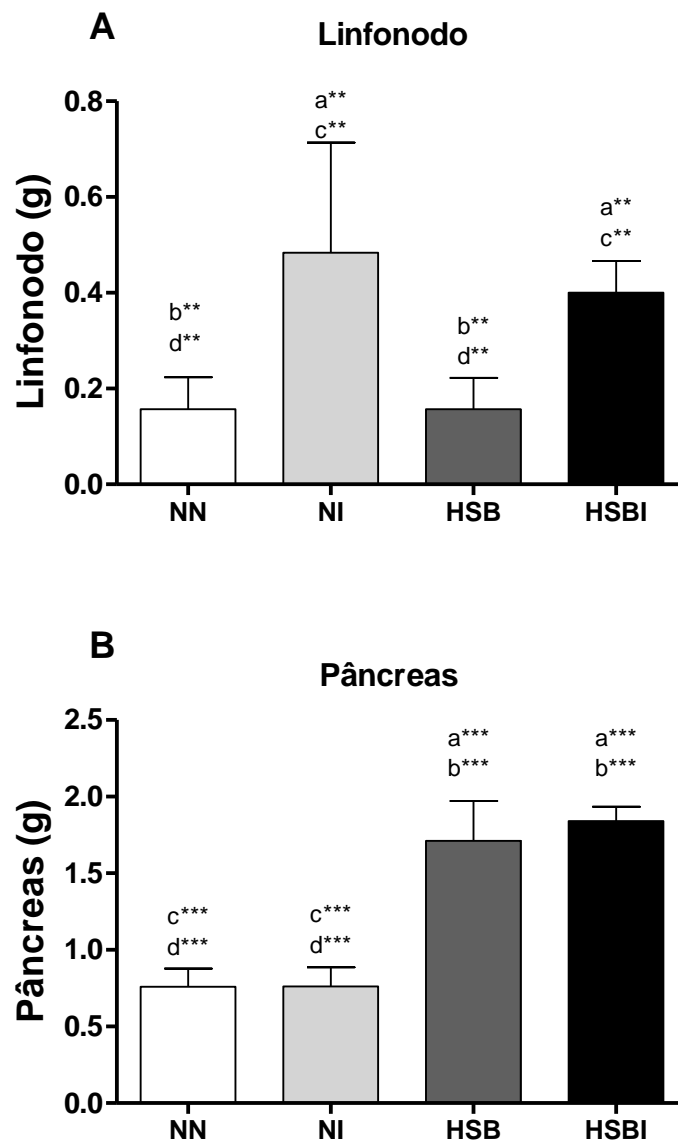


Figura 6: Análise macroscópica dos tecidos e órgãos. (A) Peso do linfonodo. (B) Peso do pâncreas. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Os animais do grupo HSB apresentaram aumento do comprimento do intestino delgado, o qual foi diminuído pela infecção (Figura 7).

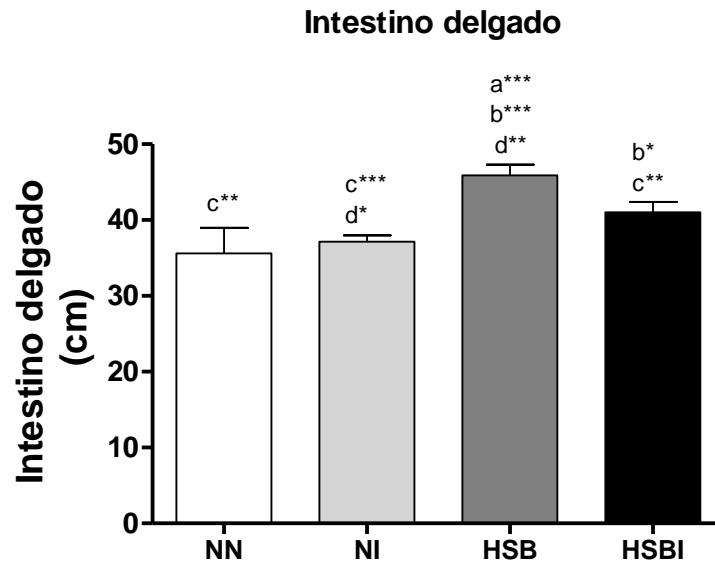


Figura 7: Medida do intestino delgado. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.3. A infecção por *A. ceylanicum* aumenta a debilidade, diminui a recuperação de vermes e a ovoposição nos animais com obesidade induzida

A patência ocorreu com 19 dias de infecção e devido a alta concentração de amido nas fezes dos animais, em função da dieta, a visualização dos ovos pelo OPG ficou comprometida, interferindo na confiabilidade dos resultados. Na tentativa de melhorar a visualização dos ovos pelo OPG foi adicionado lugol à solução, o qual reagiu com o amido dificultando ainda mais a visualização dos ovos. Por isso, foi realizado o método de ovoposição em 24 horas para avaliação da fertilidade das fêmeas coletadas do intestino delgado dos animais (Figura 8A). Esta análise demonstrou que tanto a recuperação de vermes quanto a fertilidade das fêmeas foi menor no grupo HSBI (Figura 8A; 8B).

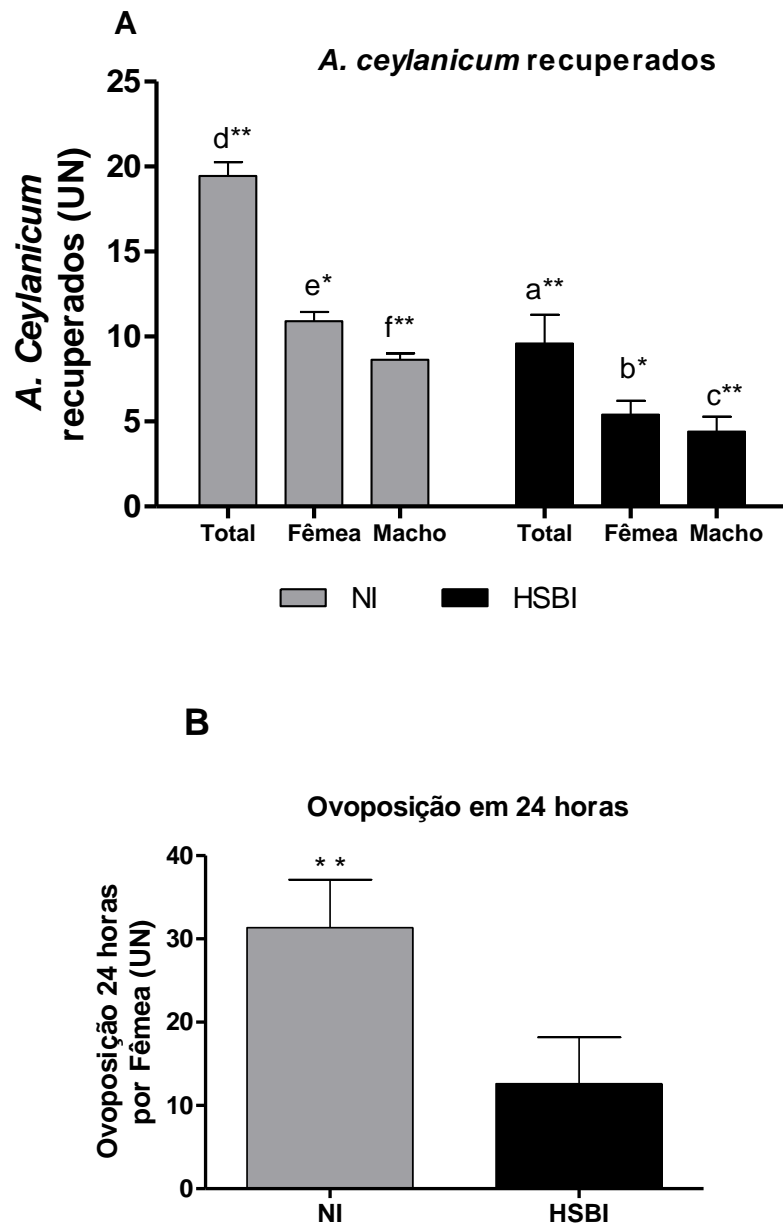


Figura 8: Quantificação de *A. ceylanicum* adulto e ovoposição. (A) *A. ceylanicum* recuperados. (B) Ovoposição em 24 horas por fêmea recuperada. Grupos: (a,b,c) normonutrido infectado (NI, n=6), (d,e,f) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico Mann-Whitney.

5.4. A infecção por *A. ceylanicum* agrava o quadro clínico do hospedeiro na obesidade

De acordo com os parâmetros do índice de atividade da infecção, o grupo HSBI, apresentou uma infecção grave (Tabela 5). Enquanto o grupo NI apresentou uma infecção moderada (Tabela 5). Apesar da perda de consistência das fezes do grupo HSB devido à

alimentação modificada, o grupo foi classificado como índice normal.

Tabela 5: Índice de atividade da infecção (IAI).

Grupo	Perda de peso	Consistência das fezes	Sangue nas fezes	Mediana	IAI
NN	0	0	0	0,0	Normal
NI	2	3	2	2	Moderada
HSB	0	1	0	1	Normal
HSBI	3	3	3	3,0	Grave

5.5. A infecção por *A. ceylanicum* diminui os níveis de albumina e ferro e eritrócitos nos animais normonutridos e obesos

A infecção não interferiu nos níveis séricos que proteínas totais, como demonstrado na figura 9.

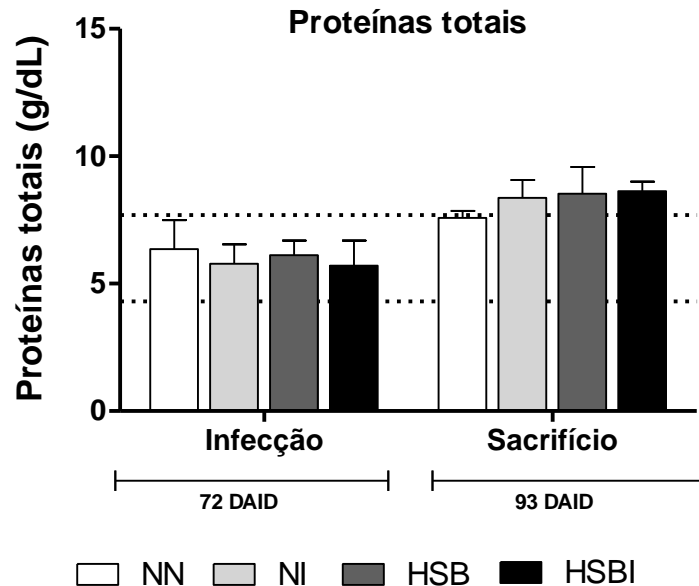


Figura 9: Níveis séricos de proteínas totais. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

A infecção causou a diminuição dos níveis séricos de albumina nos grupos HSBI e NI. Enquanto o grupo HSB apresentou diminuição dos níveis séricos de albumina relacionado com a obesidade (Figura 10A). A infecção também ocasionou diminuição nos níveis séricos de ferro sérico nos grupos NI e HSBI (Figura 10B).

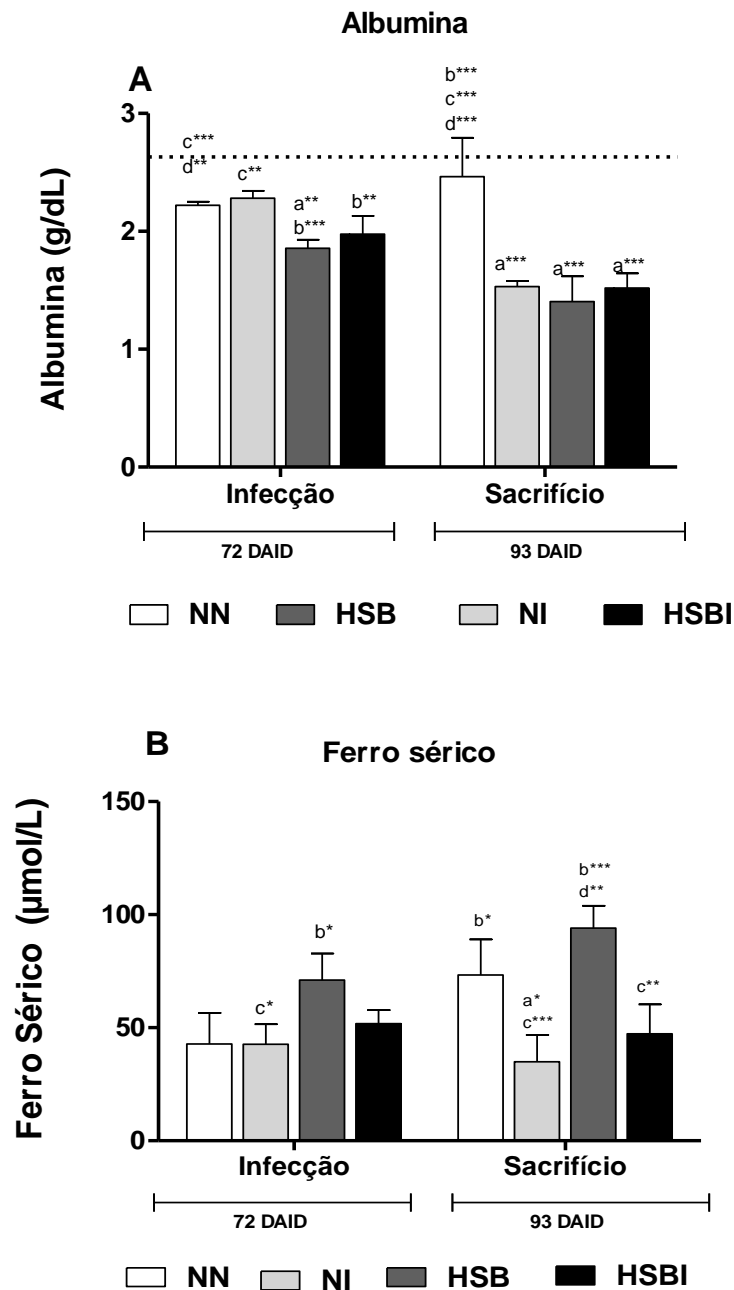


Figura 10: Avaliação dos níveis séricos de albumina e ferro. (A) Albumina. (B) Ferro sérico. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.6. A infecção por *A. ceylanicum* interfere no metabolismo de lipídeo e glicose em animais normonutridos e obesos

Os dados mostram que a infecção interferiu no metabolismo de lipídeos, elevando os níveis séricos de triglicérides no grupo HSBI (Figura 11A). A diminuição nos níveis séricos de HDL foi observada nos grupos HSB, HBI e NI (Figura 11B).

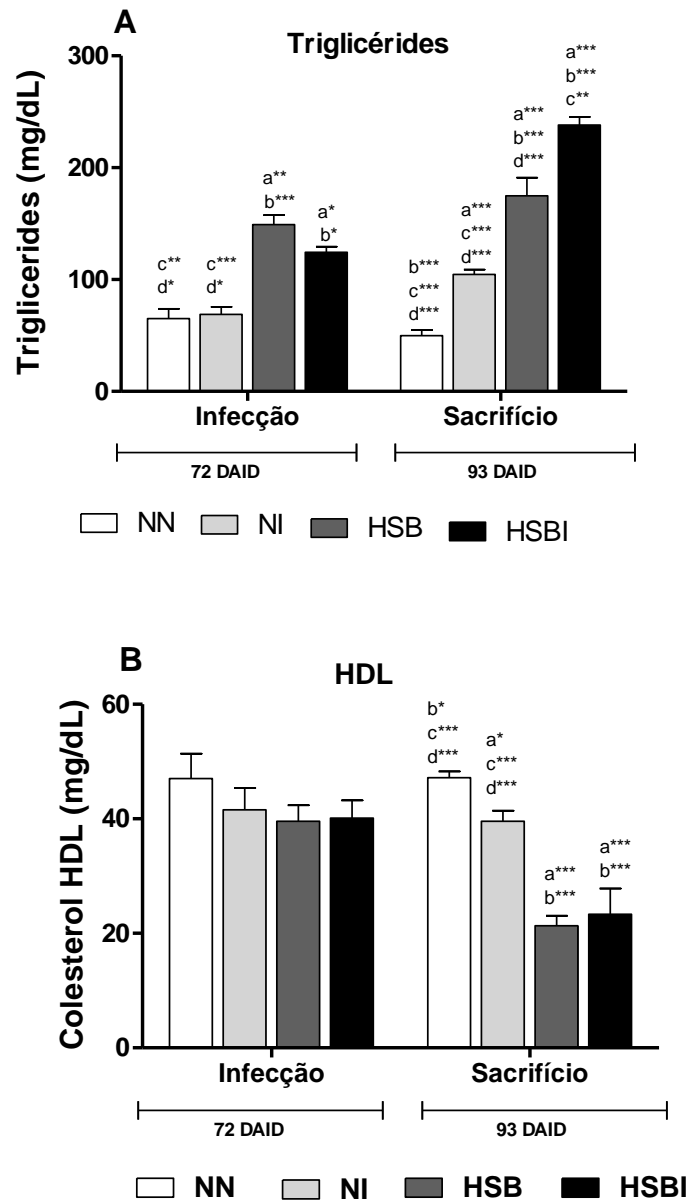


Figura 11: Avaliação do colesterol total e triglicérides. (A) Níveis séricos de triglicérides. (B) Níveis séricos de colesterol HDL. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Os níveis séricos de colesterol total foram aumentados nos grupos HSB e HSBI (Figura 12).

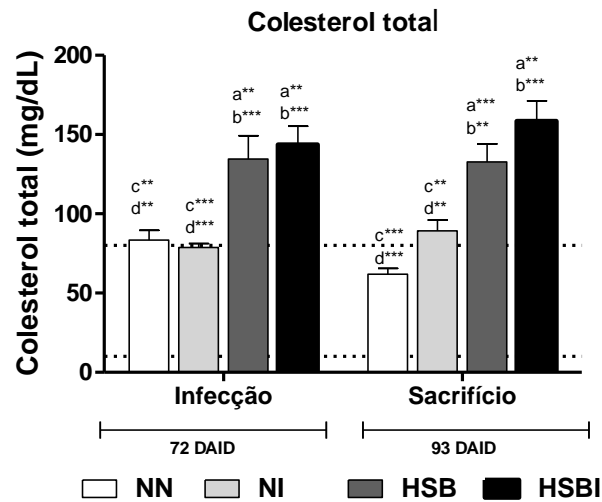


Figura 12: Níveis séricos de colesterol total. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

A obesidade causou elevação dos níveis séricos de glicose jejum nos grupos HSB e HSBI (Figura 13).

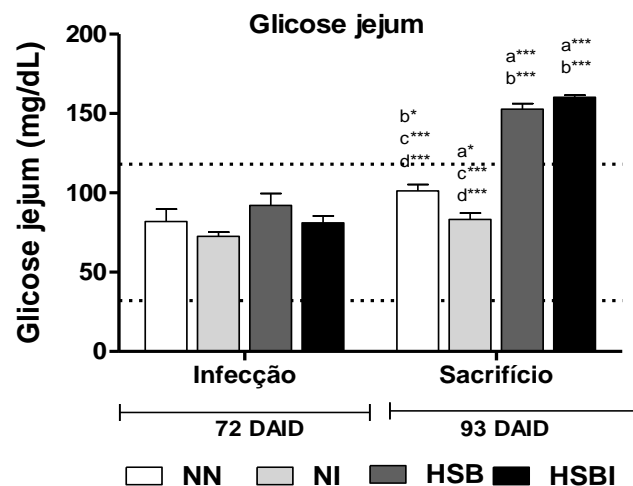


Figura 13: Glicose jejum. (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

A curva glicêmica, realizada dois dias antes do sacrifício, demonstrou que a infecção interferiu na absorção de glicose, que se mostrou aumentada nos grupos infectados HSBI e NI (Figura 14). Resultados similares foram observados no grupo HSB, demonstrando que, assim como a infecção, a obesidade causa diminuição da absorção de glicose em indivíduos obesos (Figura 14).

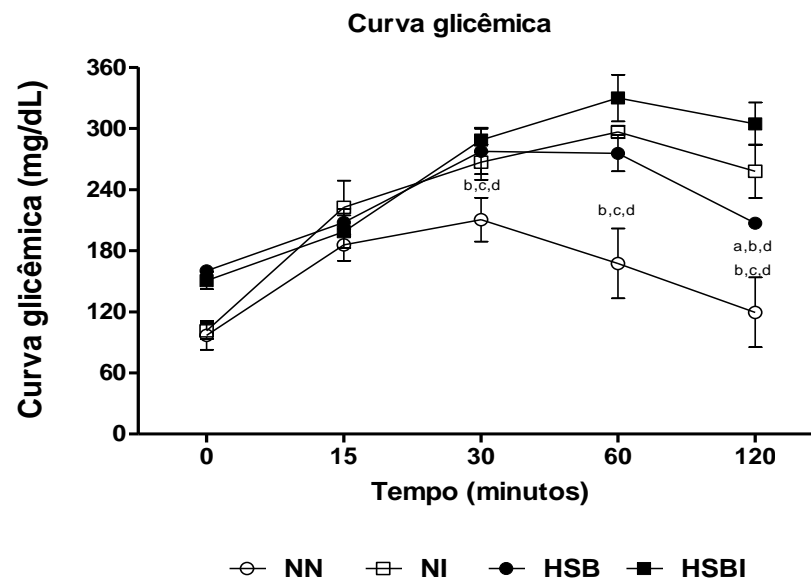


Figura 14: Curva glicêmica. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.7. A infecção por *A. ceylanicum* eleva o acúmulo de lipídeos hepático nos animais com obesidade induzida

O grupo HSBI apresentou elevação dos lipídeos, colesterol, proteínas e triglicérides hepáticos (Figura 15A; 15B; 15C; 15D). Estes parâmetros também se mostraram elevados no grupo HSB, no entanto, a infecção causou um aumento mais intenso, como demonstrado no grupo HSBI. O acúmulo dos lipídeos podem ter interferido no massa do fígado como demonstrado anteriormente.

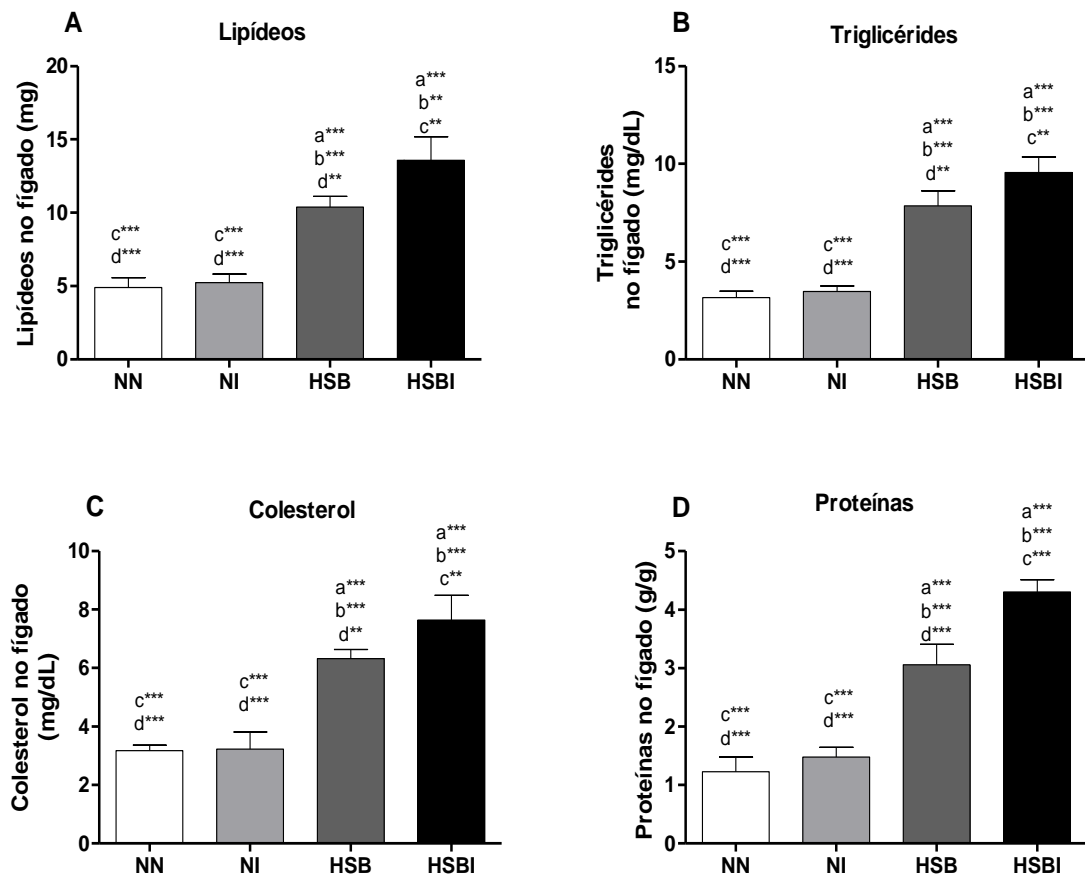


Figura 15: Determinação dos níveis de lipídeos e proteínas hepáticas. (A) Lipídeos hepático. (B) Triglicérides hepático. (C) Colesterol hepático. (D) Proteínas hepática. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.8. A infecção por *A. ceylanicum* causa uma maior perda de lipídeos através das fezes nos animais com obesidade induzida

A perda de gordura nas fezes é descrita na infecção por ancilostomídeos e foi intensificada pela obesidade. Assim, o grupo HSBI apresentou maior quantidade de lipídeos, triglicérides, colesterol e proteínas no conteúdo cecal (Figura 16A; 16B; 16C; 16D), resultados similares aos descritos para o fígado dos animais do grupo HSB. O acúmulo de lipídeos no fígado pode ter interferido na massa do fígado dos animais obesos como demonstrado anteriormente.

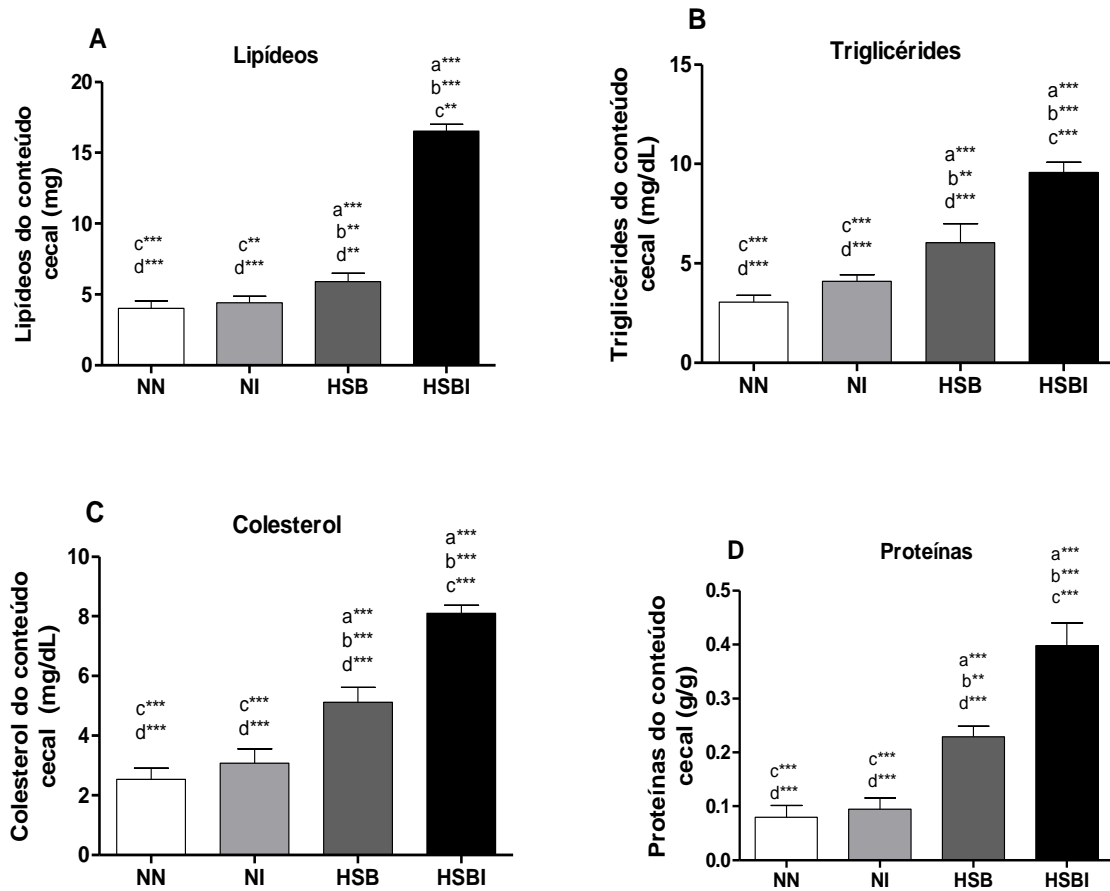


Figura 16: Determinação dos níveis de lipídeos e proteínas do conteúdo cecal. (A) Lipídeos do conteúdo cecal. (B) Triglicérides do conteúdo cecal. (C) Colesterol do conteúdo cecal. (D) Proteínas do conteúdo cecal. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.9. A infecção por *A. ceylanicum* diminui os níveis de hemoglobina e eritrócitos nos animais normonutridos e obesos

Os grupos HSBI e NI apresentaram diminuição dos níveis de hemoglobina e eritrócitos ocasionados pela infecção (Figura 17A; 17B). Diferentemente dos resultados dos grupos infectados, ocorreu a elevação dos níveis de hemoglobina nos animais do grupo HSB (Figura 17B). A análise do volume globular não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 17C). A diminuição de hemoglobina e eritrócitos são descritos na infecção por ancilostomídeos e estão associados ao quadro clínico de anemia ferropriva ocasionado pelo hábito hematófago do parasito.

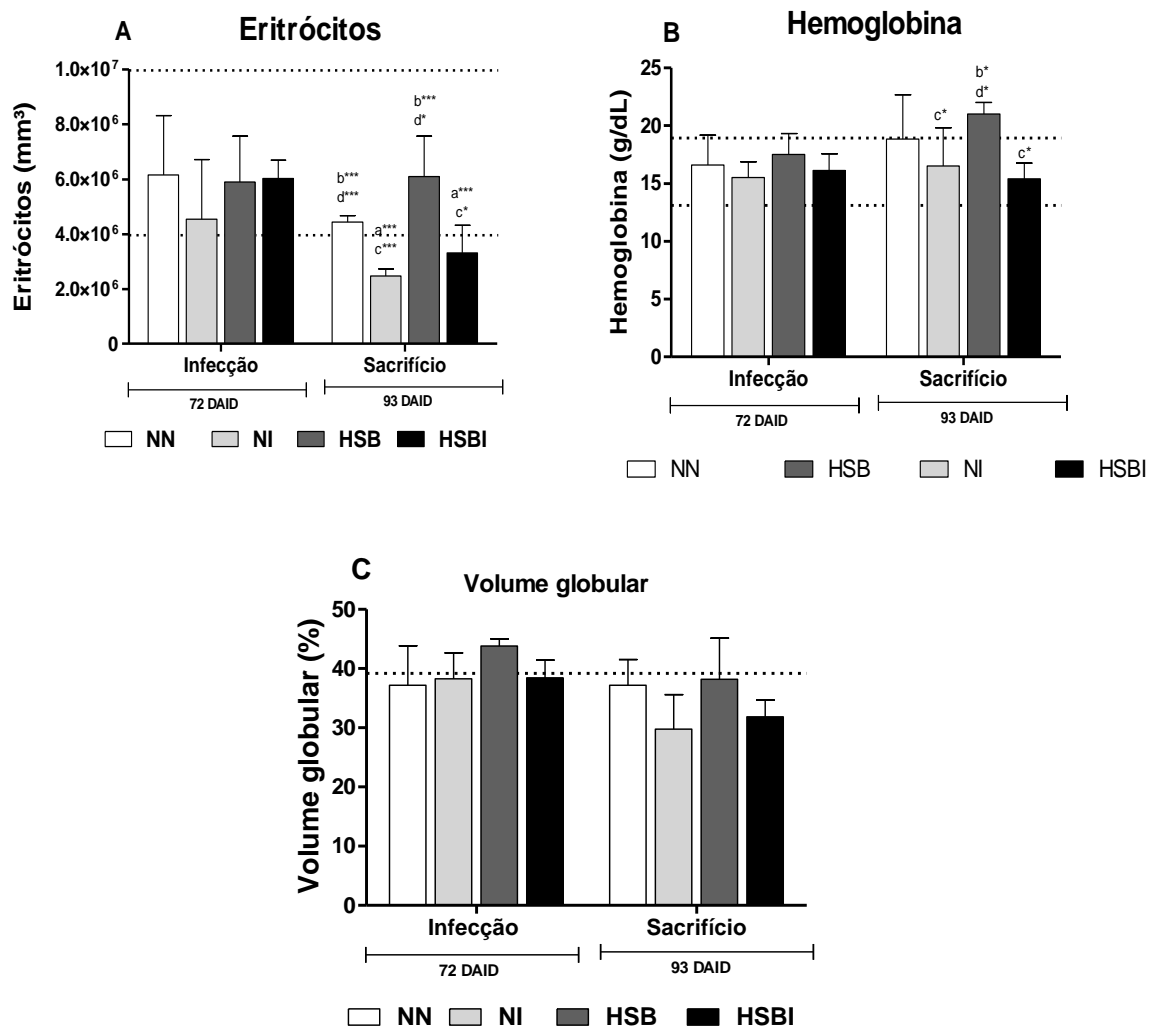


Figura 17: Avaliação dos eritrócitos totais, hemoglobina e volume globular. (A) Eritrócitos totais. (B) Hemoglobina. (C) Volume globular. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.10. A infecção por *A. ceylanicum* em hamsters obesos contribui para o aumento de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes, intensificando a inflamação no tecido adiposo e a ativação de macrófagos no intestino delgado

A infecção causou elevação dos leucócitos totais no grupo HSBI e NI (Figura 18A). Essa elevação no número de leucócitos foi mais intensa no grupo HSBI, demonstrando a intensificação da inflamação pela infecção. A elevação dos leucócitos foi relacionado a elevação de monócitos e neutrófilos circulantes (Figura 18B; 18C), enquanto o número de eosinófilos não foi alterado com a infecção (Figura 18D).

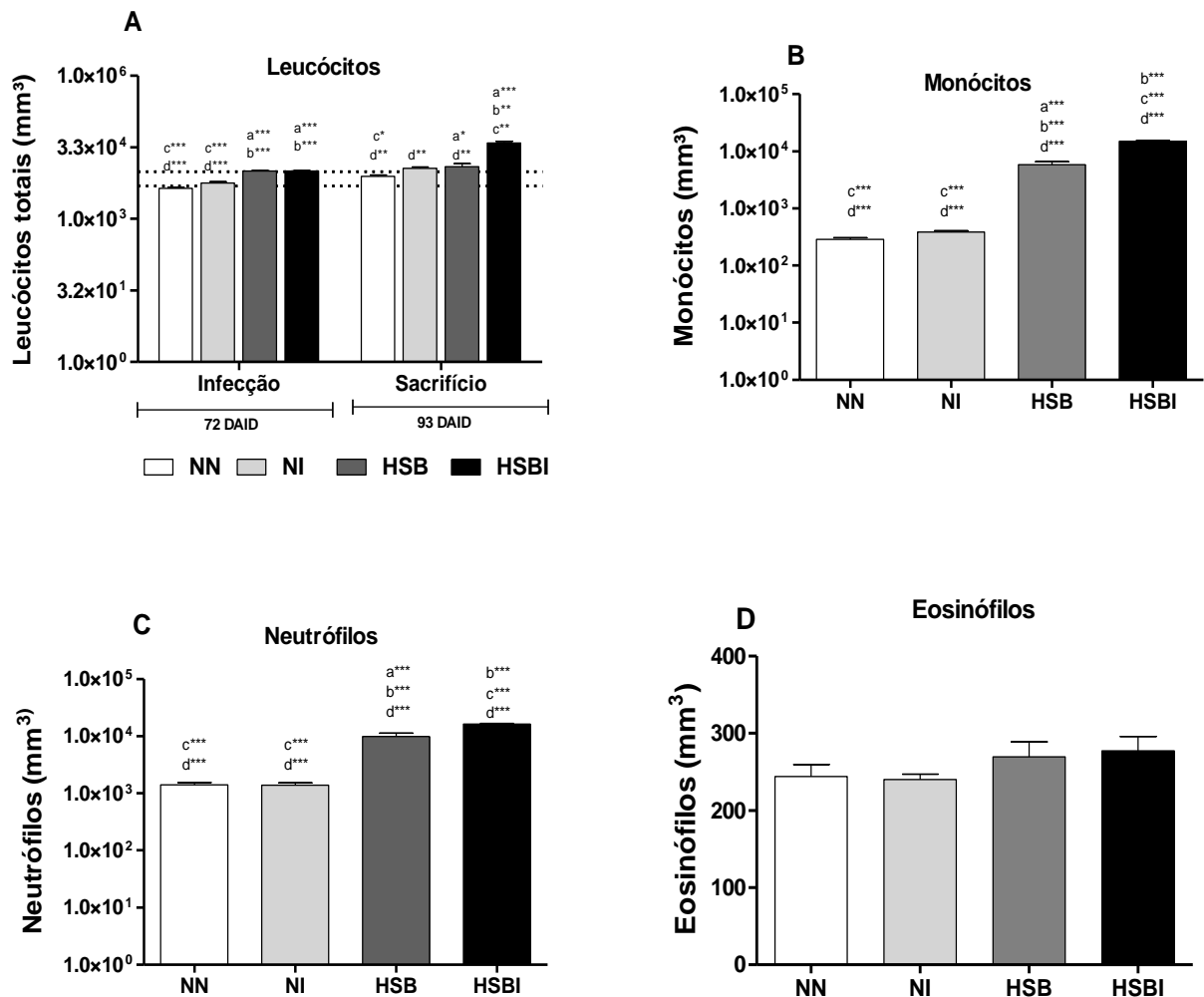


Figura 18: Avaliação dos leucócitos totais e contagem diferencial. (A) Leucócitos totais. (B) Monócitos. (C) Neutrófilos. (D) Eosinófilos. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Dias após o início da dieta (DAID). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. (----) Valores de referência Gad (1990). Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Através da dosagem de MPO, foi possível observar que o grupo HSBI apresentou elevação dos neutrófilos ativados no intestino delgado quando comparado o grupo NN (Figura 19A). Diferentemente dos grupos HSB e NI que não apresentaram diferença neste parâmetro. Já a ativação de macrófagos no intestino, demonstrada pela dosagem de NAG foi intensificada pela associação da obesidade e infecção, como demonstrado no grupo HSBI (Figura 19B). Enquanto a ativação de eosinófilos não apresentou diferença entre os grupos (Figura 19C).

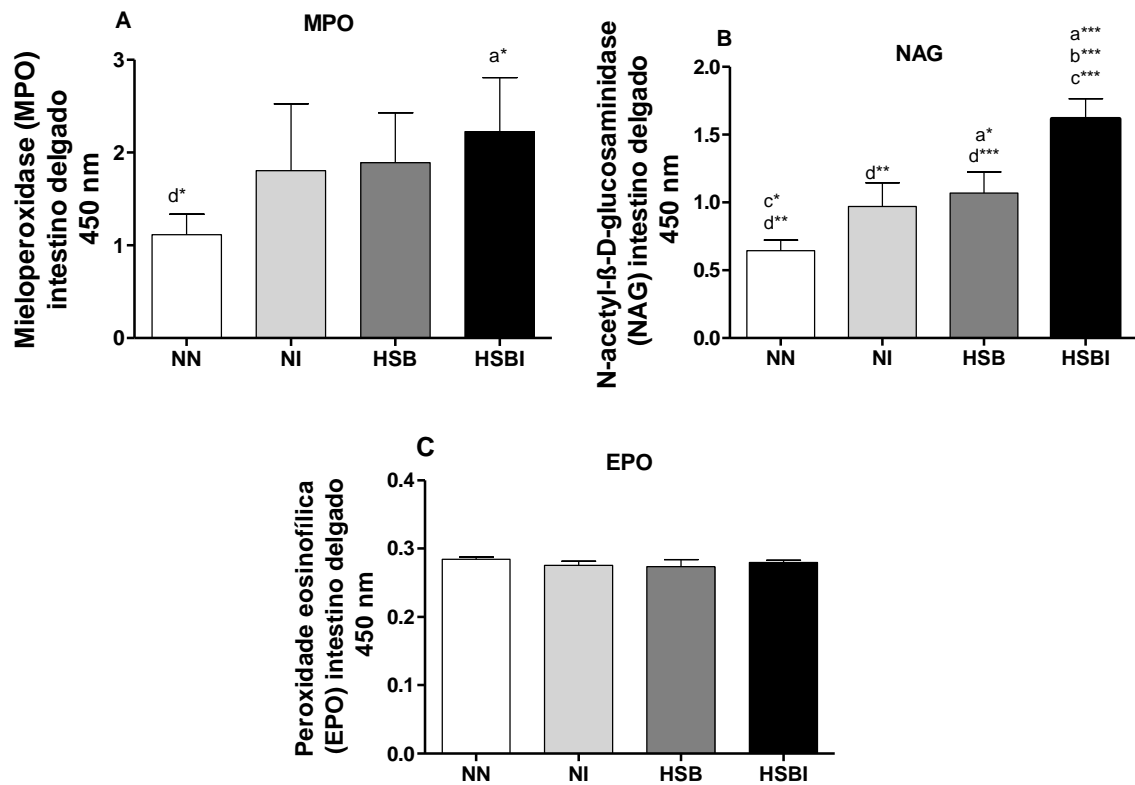


Figura 19: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado. (B) Atividade da N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) no intestino delgado. (C) Atividade da peroxidase eosinofílica no intestino delgado. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Como descrito na obesidade, o tecido adiposo apresentou elevação de macrófagos e neutrófilos ativados, como demonstrado nos grupos HSB e HSBI (Figura 20A; 20B). A infecção não interferiu na ativação de neutrófilos e macrófagos no tecido adiposo, uma vez que os grupos HSB e HSBI não apresentaram diferença significativa. Ao contrário do que foi descrito em algumas infecções por helmintos, a ativação de eosinófilos não apresentou diferença no tecido adiposo (Figura 20C). Os eosinófilos não apresentaram elevação no plasma e no intestino delgado. Ao contrário deste resultado, houve elevação dos monócitos no plasma e dos macrófagos no intestino delgado e tecido adiposo, apontando um quadro clínico de inflamação.

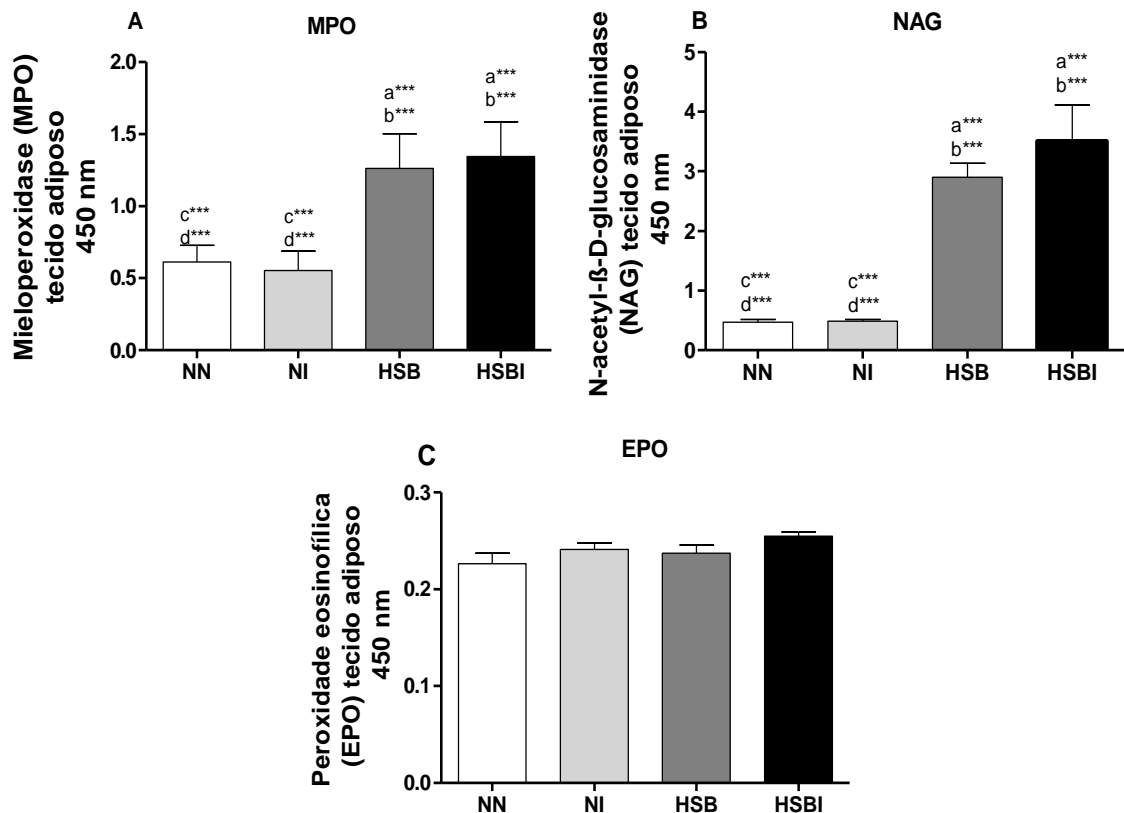


Figura 20: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido adiposo. (B) Atividade da N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) no tecido adiposo. (C) Atividade da Peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido adiposo. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

A infecção elevou o acúmulo de lipídeos no fígado dos animais obesos, interferindo no massa deste órgão. Apesar da interferência nestes parâmetros, não houve diferença na ativação de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Figura 21A; 21B; 21C). Deste modo, este órgão não apresentou inflamação como demonstrado nos gráficos. A inflamação é descrita no fígado de obesos está associada à esteatose hepática, a qual deve-se ao acúmulo de lipídeos hepáticos. O aumento do massa do fígado é descrito na esteatose como mostrado nos resultados obtidos.

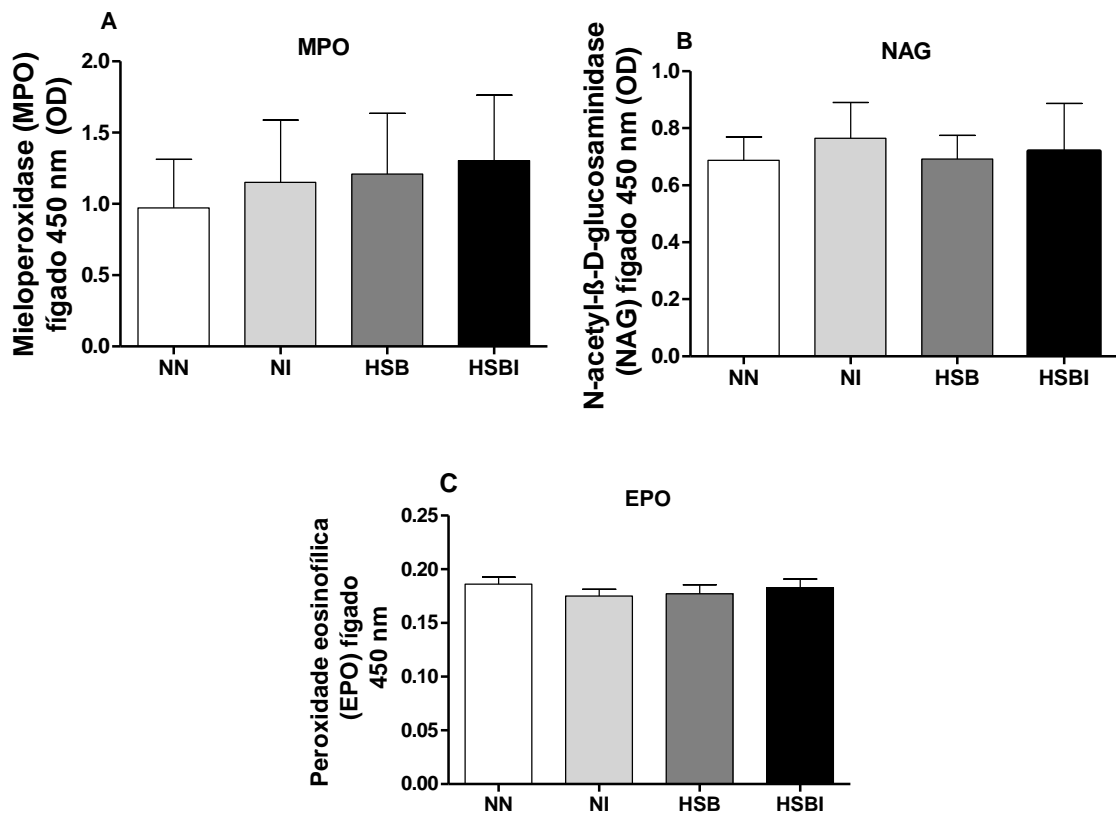


Figura 21: Testes imunoenzimáticos. (A) Atividade da mieloperoxidase (MPO) no fígado. (B) Atividade da N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) no fígado. (C) Atividade da peroxidase eosinofílica no fígado. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). Valores representados em média ± desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

5.11. A infecção por *A. ceylanicum* em hamsters causa diminuição nos níveis de IL-10, FoxP3 e IL-2, enquanto a obesidade eleva os níveis de IFN-γ no intestino

Em hamster a infecção aguda (21 dias) por *A. ceylanicum* não causou aumento na expressão do fator de transcrição Foxp3, IL-10 e IL-2 (Figura 22A; 22B; 22C). A elevação de IL-10 é descrita na infecção por vários helmintos intestinais e esta associada à diminuição da morbidade em indivíduos obesos. Os resultados obtidos demonstraram diminuição desta citocina nos animais infectados. A expressão de Foxp3 foi diminuída nos animais infectados, assim como o fator de proliferação das células T, IL-2. Apesar do fator de transcrição Foxp3 não ser exclusivo das células T reguladoras, sua expressão pode ser associada à presença destas células.

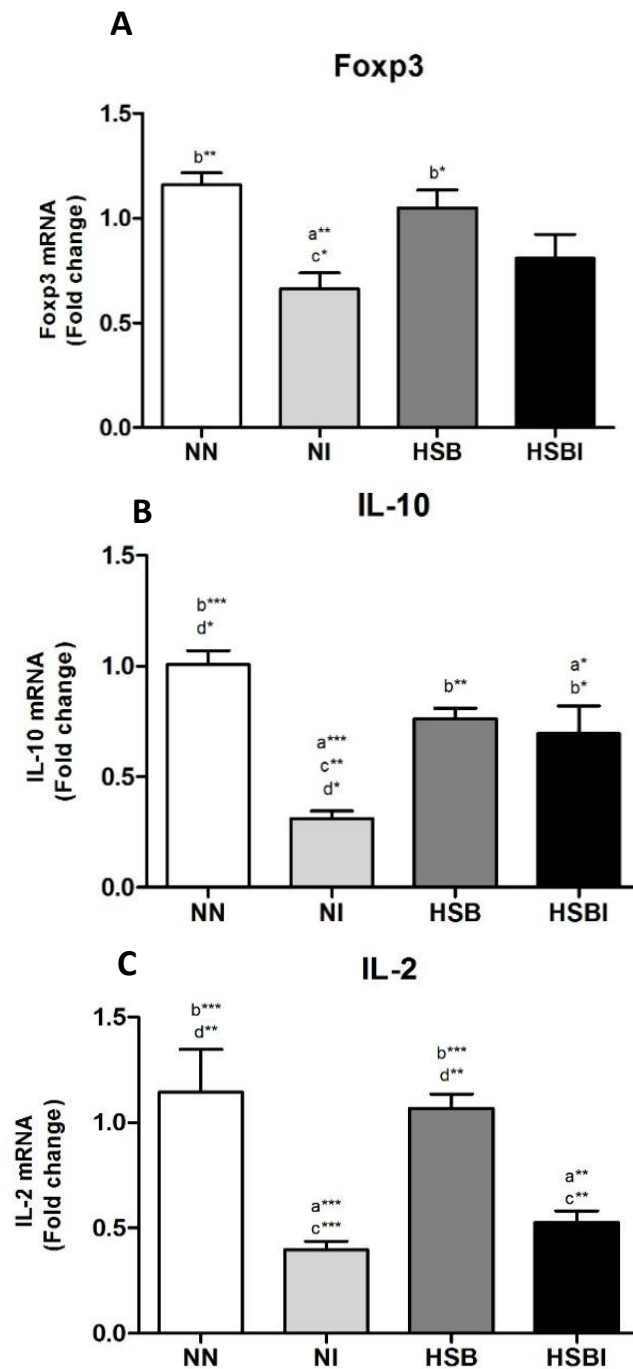


Figura 22: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. (A) Fcpx3. (B) IL-10. (C) IL-2. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Como descrito na infecção por ancilostomídeos, os níveis de IL-4 foram elevados nos grupos NI e HSBI (Figura 23). A IL-4 está relacionada à resposta Th2.

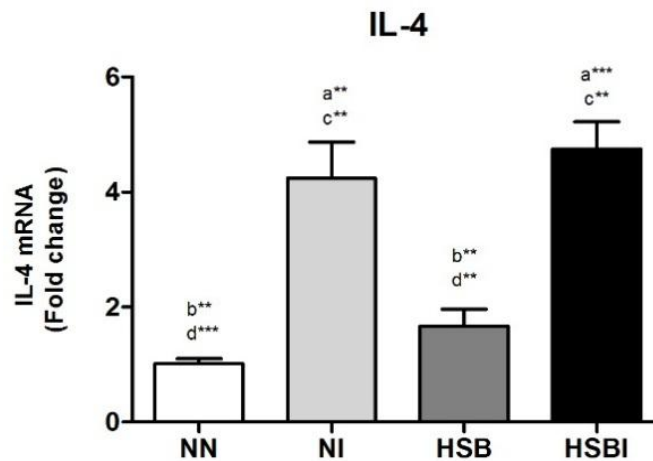


Figura 23: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. IL-4. Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

O grupo HSB apresentou aumento nos níveis de IFN- γ (Figura 24). A diminuição da expressão desta citocina nos grupos infectados NI e HSBI (Figura 24) pode ser relacionada ao aumento de IL-4.

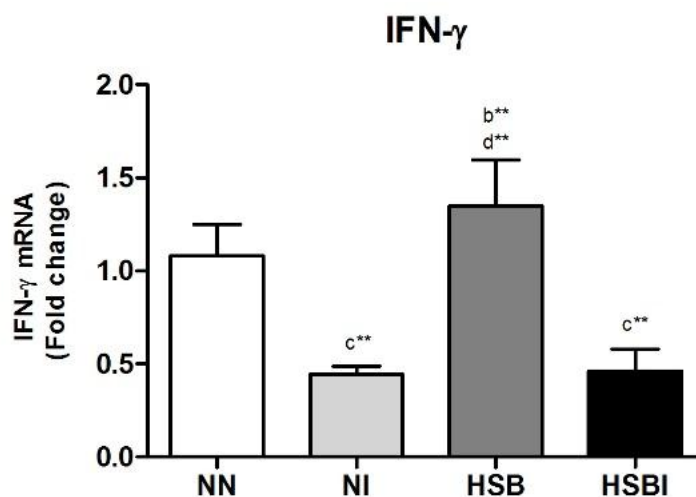


Figura 24: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. IFN- γ . Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Não foram observadas diferenças na expressão de IL-6 e TNF- α (Figura 25A; 25B).

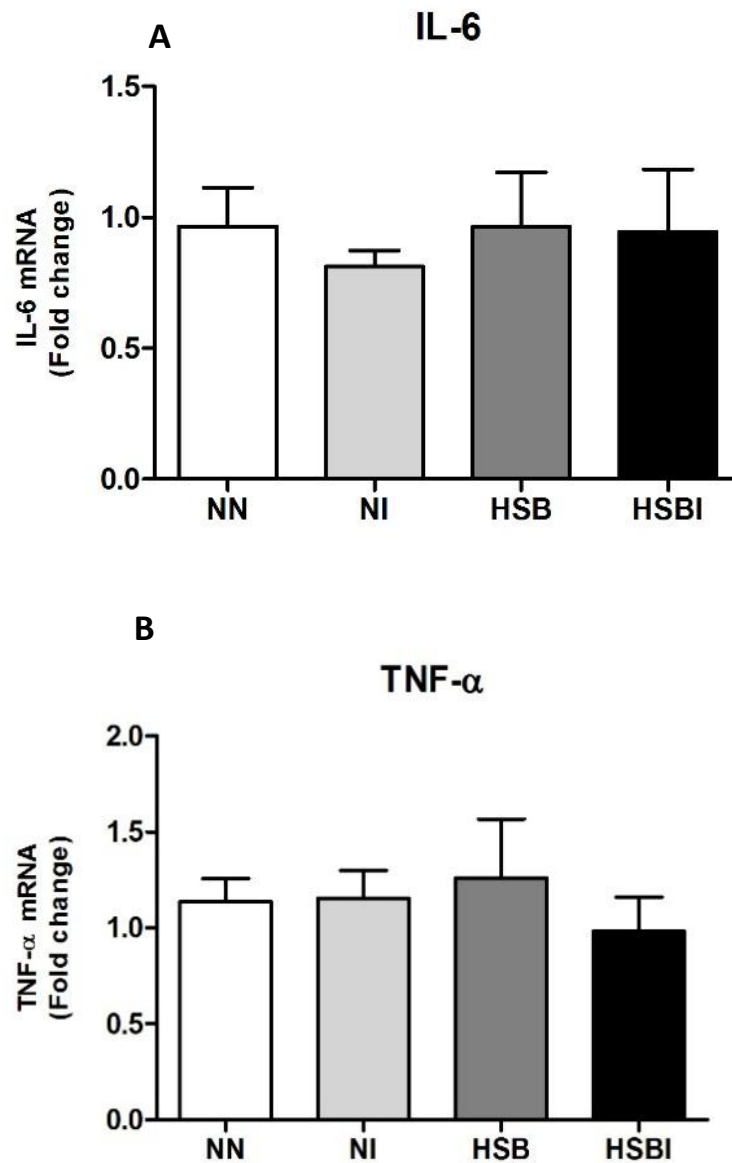


Figura 25: Quantificação da expressão gênica das citocinas por qRT-PCR utilizando o gene constitutivo HPRT. (A) IL-6. (B) TNF- α . Grupos: (a) normonutrido (NN, n=6), (b) normonutrido infectado (NI, n=6), (c) dieta com alto teor de açúcar e manteiga (HSB, n=6), (d) dieta com alto teor de açúcar e manteiga infectado (HSBI, n=5). * = p<0,05; **=p<0,01; ***=p< 0,001. Valores representados em média \pm desvio padrão. Teste estatístico: Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

6. DISCUSSÃO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública e vem crescendo de forma significativa devido à mudança nos hábitos alimentares e sedentarismo da população (KEANE et al., 2017). Na obesidade o quadro clínico de inflamação, proveniente da resposta Th1 é capaz de aumentar a predisposição para o desenvolvimento de dislipidemias, câncer, diabetes do tipo 2, doenças renais, pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas, psicossociais e disfunções endócrinas (NAMMI et al., 2004; BESSESEN, 2008; KAILA; RAMAN, 2008; OSBORN; OLEFSKY, 2012; TATEYA; KIM; TAMORI, 2013; GAROUFI et al., 2017). Em contraposição, a infecção por helmintos é capaz de polarizar uma resposta Th2 e elevar os níveis de IL-10, presente no tecido adiposo de indivíduos sensíveis à insulina (FALLON et al., 2006; BOUFFI et al., 2013). Enquanto a obesidade pode ocorrer em qualquer área do mundo independente de clima e de condição sócio econômica, a infecção por helmintos está presente em regiões tropicais e subtropicais, acometendo uma população mais carente (BARTSCH et al., 2016).

No presente trabalho foi demonstrado que a infecção por *A. ceylanicum* em hamsters obesos ocasionou uma acentuada perda de peso, disenteria e diminuição da adiposidade visceral. Por outro lado, a obesidade diminuiu a recuperação de vermes adultos e a fertilidade das fêmeas. Apesar da menor recuperação de vermes no grupo obeso, o índice de atividade da infecção demonstrou que a associação das duas patogenias agravou o quadro clínico do hospedeiro, aumentando a morbidade do hospedeiro. No entanto, o índice não leva em consideração a anemia e síndrome de má absorção, que são as principais morbidades da infecção (STOTT, 1960; DE SILVA et al., 2003; MUKAYA et al., 2009; RODRÍGUEZ-GUARDADO et al., 2013). A diminuição do peso e do IMC foram demonstrados em humanos infectados por helmintos (WIRIA et al., 2013), enquanto em hamsters desnutridos a infecção por *A. ceylanicum* ocasionou a perda de peso, aumentando a adiposidade visceral (PACANARO et al., 2014). A literatura descreve o acúmulo de gordura na região abdominal como obesidade central, considerada a forma mais danosa da doença (LEE, JANE J. et al., 2014; LIU et al., 2017), capaz de aumentar a pré-disposição para desenvolvimento de diabetes, hipertensão e dislipidemia (LI, CHAOYANG et al., 2007; MISRA; KHURANA, 2008). Em camundongos RIP2-Opa1KO, os quais apresentam hiperglicemia e intolerância à glicose, alimentados com a dieta HFD, uma dieta rica em lipídeos, a infecção por *N. brasiliensis* ocasionou a perda de peso dos animais (YANG, ZHONGHAN et al., 2013). Perda de peso também foi observada em

experimentos utilizando animais obesos após a administração de antígenos obtidos dos ovos de *S. mansoni* (HAMS et al., 2016).

A interferência da obesidade na recuperação de vermes e ovoposição das fêmeas pode estar relacionada às modificações intestinais. Ambas as patogenias apresentam modificações capazes de aumentar a permeabilidade intestinal e alterar a microbiota (FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011; MCKAY; SHUTE; LOPES, 2017). Em indivíduos obesos, esta maior permeabilidade eleva os níveis de endotoxinas no plasma, agravando o quadro clínico de inflamação (CANI et al., 2009). Nossos resultados demonstraram que a obesidade agravou o quadro clínico da infecção e interferiu na fisiologia do parasito. Aparentemente, existem duas hipóteses para explicar este fato: a primeira seria que as alterações no intestino de indivíduos obesos impediu a fixação do parasito na mucosa intestinal e a segunda que a disenteria mais grave nos animais obesos foi capaz de eliminar alguns parasitos. Outro fator influenciando a menor recuperação e ovoposição de *A. ceylanicum* nos animais obesos pode estar relacionado às alterações intestinais, observadas em indivíduos obesos, que poderia interferir na fixação do verme na mucosa intestinal, com conseqüente diminuição na ingestão de sangue, diminuindo a fertilidade das fêmeas. Para testar essa hipótese os vermes recuperados deveriam ser submetidos à análises morfométricas, as quais poderiam apontar modificações na cápsula bucal, no útero e no tamanho do parasito. Além disso, a obesidade proporciona uma diminuição das células Treg, as quais são responsáveis pela supressão da resposta imunológica (DEIULIIS et al., 2011), estas células estão envolvidas no prolongamento da infecção (RICCI et al., 2011), o que poderia justificar a menor recuperação de vermes e de ovoposição.

A diminuição dos glóbulos vermelhos e dos níveis séricos de hemoglobina, ferro e albumina são descritos na infecção por *A. ceylanicum* e estão relacionados ao desenvolvimento da anemia ferropriva e síndrome de má absorção. Após a infecção, ocorre a diminuição da eritropoiese e dos depósitos de ferro ocasionados pela hematofagia do parasito, que provoca dilacerações na mucosa, interferindo na absorção de nutrientes (STOTT, 1960; DE SILVA et al., 2003; MUKAYA et al., 2009; RODRÍGUEZ-GUARDADO et al., 2013). Deste modo, houve diminuição dos parâmetros supracitados no presente trabalho. No entanto, os valores de hemoglobina encontram-se dentro dos valores de referência para hamsters

Os animais obesos apresentaram aumento dos eritrócitos, hemoglobina, ferro sérico e diminuição dos níveis de albumina. A associação entre a obesidade, aumento dos glóbulos vermelhos e hemoglobina em gestantes foi demonstrada por Elmugabil e colaboradores (2017),

resultados similares foram obtidos em mulheres diabéticas obesas (RAO; MORGHOM, 1986). Enquanto em adolescentes o aumento do peso foi relacionado à diminuição dos níveis de hemoglobina (BAGNI; LUIZ; VEIGA, 2013). Ao contrário dos dados apresentados anteriormente, o estudo realizado por Ghadiri-Anari e colaboradores (2014) não observou associação entre o IMC e alterações nos níveis de ferro, hemoglobina, transferrina e ferritina. A elevação nos níveis de albumina está associada ao desenvolvimento da obesidade central, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (CHO et al., 2012). No presente trabalho os níveis de albumina sérica foram diminuídos pela obesidade. Em indivíduos obesos diabéticos foi descrito o aumento dos níveis de albumina na urina associada ao desenvolvimento de doenças renais (ROSSI et al., 2010). O estudo realizado por Montazerghaem e colaboradores (2014) associou os baixos níveis de albumina ao aumento da idade e diminuição do IMC. Por outro lado, Nelson e colaboradores (2015) propõem que o aumento da mortalidade de indivíduos com obesidade mórbida esteja associada aos baixos níveis de albumina (NELSON et al., 2015).

A infecção foi capaz de interferir no metabolismo de lipídeos elevando os níveis séricos de triglicérides total e diminuindo os níveis de HDL, os quais foram mais acentuados nos animais obesos. Assim como no quadro de obesidade, a elevação dos níveis séricos de triglicérides também foi demonstrada em hamsters submetidos a uma dieta hipoproteica (PACANARO et al., 2014). De acordo com Mukerjee e colaboradores (1990) a infecção por *A. ceylanicum* é capaz de ocasionar hipertrigliceridemia e hiperlipidemia em hamsters, diminuindo os níveis de HDL. A diminuição dos níveis de HDL, está relacionada às lesões intestinais provocadas pelo verme adulto, ocasionando a perda das microvilosidades, interferindo no funcionamento intestinal e produção de HDL (FREITAS, 1977; WIEDERMANN et al., 1991; HOTEZ et al., 1999). A diminuição nos níveis de HDL foi observada em humanos infectados, que ao contrário dos resultados obtidos em hamsters, apresentaram diminuição nos níveis de colesterol total (WIRIA et al., 2013). Já no estudo de Rai e colaboradores (1998), também avaliando lipídeos em humanos, não foi observada alterações nos níveis de triglicérides e colesterol total em função da infecção. Entretanto, vale ressaltar que embora, estudos em humanos sejam altamente importantes, não é possível a inclusão de controles apropriados, levando em conta todos os parâmetros.

A diabetes do tipo 2 observada em indivíduos obesos está relacionada à resistência à insulina e intolerância à glicose (BESSESEN, 2008; GAROUFI et al., 2017). Nossos dados demonstraram que a infecção por *A. ceylanicum* não foi capaz de diminuir os níveis séricos de glicose e este resultado foi refletido na curva glicêmica. Wang e colaboradores (2009)

descreveram uma diminuição nos níveis séricos de glicose e elevação de lipídeos em hamsters infectados por *N. americanus*, coincidindo com a maturação do parasito. Esta característica não foi observada na infecção por *A. ceylanicum*, uma vez que a glicose dos animais normonutridos infectados, permaneceu normal, enquanto nos animais obesos infectados, ocorreu um aumento significativo nos níveis de glicose. A interferência da infecção por *N. americanus* na absorção de glicose em hamsters infectados em comparação com hamsters anêmicos e sem infecção, foi demonstrada por Kaul e colaboradores (1982). Neste mesmo trabalho, a intolerância à glicose foi associada à anemia, ao contrário dos nossos resultados que não demonstraram anemia nos grupos infectados normonutrido (NI) e obesos (HSBI), pois apesar da diminuição dos níveis séricos de hemoglobina, estes estavam dentro dos valores de referência. No entanto, os animais infectados de ambos os grupos apresentaram alterações na absorção de glicose e este fato pode ser associado a infecção. Em contraposição, a infecção por *N. brasiliensis* em camundongos atenuou a intolerância à glicose (YANG, ZHONGHAN et al., 2013), resultados similares foram demonstrados na infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 e humanos infectados por *S. japonicum* (HUSSAARTS et al., 2015; SHEN et al., 2015). Enquanto a infecção por *S. venezuelensis* e *stercoralis* diminuiu a susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes (PERES et al., 2013; HAYS et al., 2015).

O aumento do baço e linfonodo mesentérico é descrito na infecção por ancilostomídeos e está relacionado a estimulação da resposta Th2 (MUKAYA et al., 2009). O baço dos animais obesos infectados apresentou aumento e pode estar relacionado à intensificação da resposta imunológica. Além disso, independente da infecção, os grupos obesos apresentaram aumento do pâncreas, corroborando com estudos que relacionam o aumento deste órgão ao desenvolvimento de diabetes em indivíduos obesos (MIGDALIS et al., 1991; ALZAID; AIDEYAN; NAWAZ, 1993; SILVA et al., 1993). Ambas as patogenias podem provocar alterações no trânsito intestinal (CASTRO et al., 1976; CUNNINGHAM et al., 1991). No caso da infecção, pode ocorrer um aumento da motilidade intestinal, ocasionada pela contração do músculo liso, na tentativa de eliminar o parasito (CASTRO et al., 1976; VERMILLION; COLLINS, 1988), enquanto indivíduos obesos tendem a ter aumento do trânsito intestinal levando ao quadro clínico de diarreia (CUNNINGHAM et al., 1991; DELGADO-AROS et al., 2004). O aumento na ingestão de uma dieta hiperlipídica é capaz de provocar uma série de alterações no intestino delgado, como aumento da absorção de nutrientes, do comprimento intestinal e da proliferação de células (MUSHREF; SRINIVASAN, 2013), corroborando com os resultados obtidos na mensuração do intestino delgado. O aumento do comprimento do

intestino delgado é descrito em indivíduos obesos devido as modificações na alimentação, capazes de influenciar a liberação de fatores endócrinos na região distal do intestino, devido a menor absorção de nutrientes levando à diminuição da liberação de insulina e saciedade (WEAVER; AUSTIN; COLE, 1991).

Os animais obesos infectados apresentaram elevação dos leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes. Na infecção por *N. brasiliensis* o aumento da quimiocina, resistina, que está associada à resistência à insulina, eleva a migração de monócitos para o local da infecção (JANG et al., 2015), enquanto na obesidade ocorre a migração de monócitos para o tecido adiposo em resposta à hipóxia dos adipócitos (FOTI; BRUNETTI, 2017; MURPHY et al., 2017). A elevação de monócitos e neutrófilos em obesos tem sido associado ao desenvolvimento de doenças arteriais e arteriosclerose devido aos danos provocados pela migração das células pelos vasos sanguíneos (ADAMOPOULOS et al., 2001; MADJID; FATEMI, 2013). Apesar da eosinofilia descrita na infecção por ancilostomídeos, neste estudo não houve elevação dos eosinófilos em nenhum dos fluídos, órgãos e tecidos analisados.

No modelo experimental utilizado, a infecção não foi capaz de induzir a produção IL-10, apesar do aumento demonstrado na ancilostomose humana (PASSOS et al., 2017). A IL-10 é importante na modulação da resposta imunológica, sendo produzida pelas células T reguladoras, macrófagos M2 e células não linfoides. O papel regulador da IL-10 é bem descrito na literatura e muitos estudos tem associado a elevação desta citocina aos benefícios da infecção por helmintos em doenças autoimunes, através da regulação da resposta inflamatória (ZACCONE et al., 2009; BHARGAVA et al., 2012; PERES et al., 2013; WOLFS et al., 2014; HAYS et al., 2015). A IL-10 juntamente com a IL-2 é importante na manutenção da homeostase intestinal, e a diminuição da expressão destas citocinas estão relacionados à situações de inflamação, como demonstrado no presente trabalho (MISHRA; WATERS; KUMAR, 2012). Outro resultado obtido foi a diminuição da expressão do fator de transcrição FOXP3, o qual acreditava-se que estava presente apenas nas células Treg, mas recentemente foi descrito nas células iNKT e macrófagos (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; FONTENOT et al., 2005; MONTEIRO et al., 2010; ZORRO et al., 2011).

A elevação de IL-4 na infecção por helmintos é bem descrita na literatura (CHAKIR et al., 2003; FISH et al., 2005) e nossos resultados corroboram com estes trabalhos. A IL-4 é um dos principais marcadores da resposta Th2 e importante na proteção contra a infecção por helmintos, possuindo a capacidade de estimular as células B a produzirem anticorpos,

contribuindo para a ativação de macrófagos M2, aumentando o peristaltismo e secreção de muco no intestino (CHAKIR et al., 2003; FISH et al., 2005; HAO et al., 2017; WANG, YI et al., 2017). A elevação de citocinas relacionadas à resposta Th2 foi descrita em humanos e hamsters experimentalmente infectados por ancilostomídeos (MENDEZ et al., 2005; GAZE et al., 2012).

A elevação da expressão de IFN- γ no intestino de indivíduos obesos está relacionada ao aumento da permeabilidade intestinal, responsável pela elevação de lipopolissacarídeo (LPS) no plasma e intensificação da inflamação (TURNER, 2006). No presente trabalho, houve elevação dos níveis de IFN- γ no intestino dos animais obesos, o qual foi diminuído com a infecção. A diminuição nos níveis de IFN- γ foi descrita em crianças em idade escolar e aparentemente os níveis desta citocina são inversamente proporcionais à carga parasitária (GABRIE et al., 2016). O IFN- γ estimula a produção de IL-12 e está envolvido no quadro clínico de inflamação (SCHRODER, 2003). Além disso, a IL-4 possui uma ação antagônica sobre IFN- γ devido à capacidade suprimir a resposta Th1 e polarizar da resposta Th2 (HEINZEL et al., 1989), colaborando com os resultados obtidos. Enquanto, a elevação do TNF- α aumenta o depósito de gordura do tecido adiposo, interferindo na expressão e regulação de diversos mecanismos responsáveis pelo equilíbrio do organismo de indivíduos saudáveis (ARNER, 1995), no entanto, nossos resultados não demonstraram elevação da expressão desta citocina.

O papel da IL-6 na obesidade apresenta resultados contraditórios, aparentemente essa citocina é capaz de interferir nos níveis de ferro disponível no organismo de indivíduos obesos através da desregulação dos níveis de hepcidina, estimulando a produção de Proteína C Reativa (PCR) e contribuindo para o quadro clínico de inflamação (LYON; LAW; HSUEH, 2003; REXRODE et al., 2003). Outros estudos tem demonstrado que a IL-6 possui a capacidade de polarizar macrófago M2, contribuindo para o aumento da sensibilidade à insulina (WUNDERLICH et al., 2010; SADAGURSKI et al., 2010; MAUER et al., 2014; MA et al., 2015; BRAUNE et al., 2017). No entanto, nossos resultados não demonstraram elevação da expressão de IL-6.

Na obesidade, as alterações intestinais são capazes de induzir a inflamação na região do íleo, aumentando a permeabilidade intestinal. As modificações intestinais são atribuídas à alimentação rica em gordura e elevação de citocinas inflamatórias, contribuindo para o aumento da permeabilidade intestinal e possível envolvimento com a hiperfagia (DE LA SERRE et al., 2010; TURNER, 2006). Nossos resultados demonstraram aumento dos macrófagos e

neutrófilos ativados no intestino delgado, podendo haver relação com a inflamação ocasionada pela obesidade e modificações intestinais observadas na infecção (BLAXTER et al., 1998; DE LA SERRE et al., 2010; FRAZIER; DIBAISE; MCCLAIN, 2011). Entretanto, os fenótipos dos macrófagos presentes neste tecido não foram avaliados, mas observou-se a diminuição nos níveis de IFN- γ , que pode estar relacionado a elevação da expressão de IL-4.

A inflamação de baixa intensidade observada no tecido adiposo é responsável por uma série de alterações (RAUSCH et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que a infecção por *A. ceylanicum* não foi capaz de atenuar a inflamação. No tecido adiposo a elevação de NAG e MPO está associada a neutrófilos e macrófagos ativados, parâmetros que não foram alterados pela infecção. A hipertrofia dos adipócitos também é responsável pela inflamação, pois induz a secreção de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) na circulação, ocasionando o recrutamento de monócitos para o tecido adiposo que se diferenciam em macrófagos (ITO et al., 2007). A inflamação no tecido adiposo ocasiona intolerância à glicose (DINIZ et al., 2008), e a anemia decorrente da infecção, apresenta efeitos similares (KAUL et al., 1982). A diminuição da inflamação e morbidade em indivíduos obesos é descrita em diversos estudos envolvendo a infecção por *N. brasiliensis*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* (LA FLAMME et al., 2007; STANLEY et al., 2009; RICARDO-GONZALEZ et al., 2010; YANG, ZHONGHAN et al., 2013; HAYS et al., 2015; SHEN et al., 2015). Vale ressaltar que o modelo animal, no nosso caso, o hamster, foi diferente dos modelos utilizados nesses trabalhos, assim como o helminto. Estudos mais aprofundados e utilizando moléculas isoladas dos diferentes helmintos poderão ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos para os diferentes modelos.

A dieta hiperlipídica é capaz de aumentar os níveis séricos de colesterol e triglicérides, induzindo a esteatose hepática e aumentando os ácidos graxos livres em animais infectados e não infectados (MUKERJEE et al., 1990; WANG, YULAN et al., 2009; KIM et al., 2014). Nossos resultados corroboram com esses dados, demonstrando que a associação da infecção com a obesidade foi capaz de induzir o acúmulo de lipídeos no fígado. Apesar disso, a quantificação de NAG, MPO e EPO, para os diferentes grupos, não apresentou diferença, evidenciando a inexistência de inflamação neste órgão. O acúmulo de lipídeos no fígado está associado a diversos fatores, como obesidade, diabetes, má nutrição e sedentarismo (MURILLO; DIMARCO; FERNANDEZ, 2016). No presente estudo dois fatores podem influenciar no acúmulo de lipídeos: obesidade e síndrome de má absorção. O aumento dos lipídeos no conteúdo fecal pode estar relacionado ao consumo da dieta HSB, uma vez que, esse

achado não foi observado nos animais normonutridos infectados. Interessante o fato de que, resultados similares, de aumento de lipídeos nas fezes, foram descritos na infecção por *A. ceylanicum* em hamsters submetidos à dieta hipoproteica (PACANARO et al., 2014), provavelmente em decorrências de alterações metabólicas decorrentes de dietas desbalanceadas.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como premissa a hipótese de que a infecção por *A. ceylanicum* poderia interferir com o quadro de obesidade, melhorando os parâmetros bioquímicos associados a esta patologia. Entretanto, os resultados encontrados, demonstraram uma interferência negativa, para o hospedeiro, frente às duas patologias. Ou seja, a associação da obesidade com a infecção por *A. ceylanicum* agravou o quadro clínico do hospedeiro. Apesar da diminuição dos níveis de IFN- γ , a infecção não potencializou a expressão do fator de transcrição Foxp3, de IL-10 e de IL-2, para nenhum dos grupos infectados, marcadores que poderiam compensar de forma positiva, para o hospedeiro, os danos causados pela obesidade. Além disso, os parâmetros associados ao metabolismo de lipídeos e glicose foram agravados pela infecção, assim como a inflamação.

Independente do quadro de obesidade foi demonstrado, nesse trabalho, que a infecção interfere no metabolismo de lipídeos, aumentando os níveis de triglicérides e colesterol e confirmou dados da literatura demonstrando que a infecção causa diminuição de HDL. Foi também demonstrado que a infecção causa uma diminuição na absorção de glicose. Desta forma, esse trabalho contribuiu para um maior aprofundamento nos estudos da resposta imune e alterações metabólicas na ancilostomose. Os principais resultados obtidos no presente trabalho estão sumarizados de forma esquemática na Figura 26.

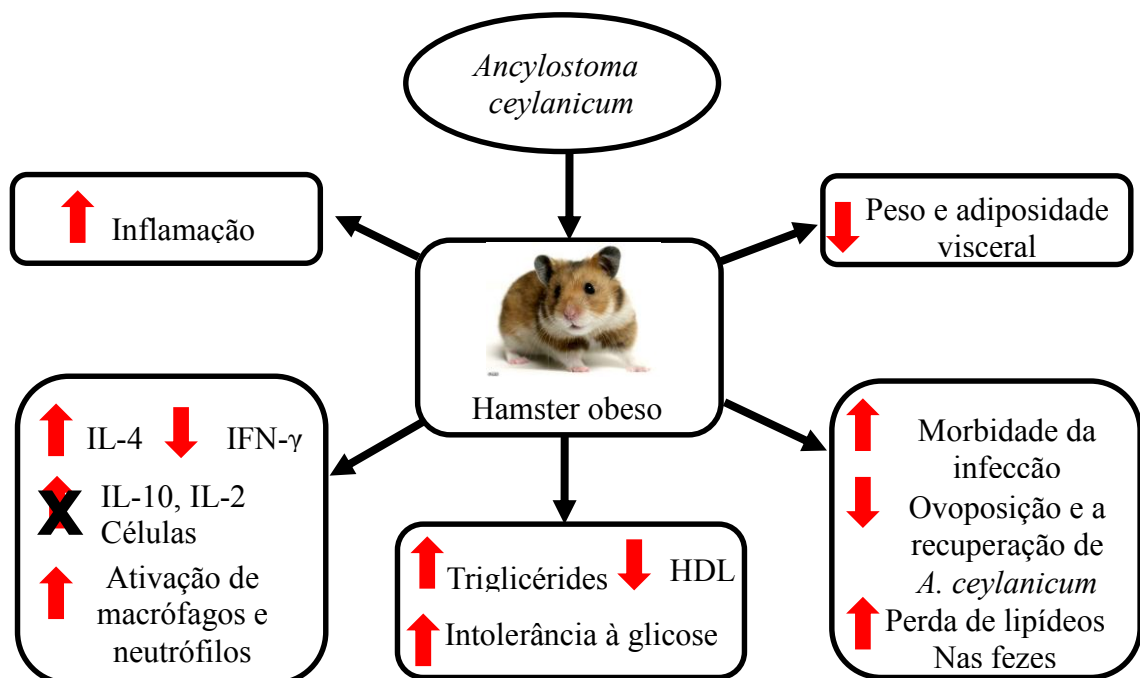


Figura 26: Resultados obtidos no presente trabalho.

8. PERSPECTIVAS

O presente trabalho contribuiu de forma pioneira para a geração de dados decorrentes da associação entre obesidade e infecção por um tipo de ancilostomídeo em modelo experimental. Foram gerados dados relacionando a resposta imunológica da infecção por *A. ceylanicum* em modelo experimental obeso. Entretanto,, alguns mecanismos necessitam de um maior aprofundamento. Alguns resultados da resposta imune, aparentemente discordantes da literatura, precisam ser analisados em face das diferentes fases da infecção, se em fase aguda ou crônica. Da mesma forma se faz necessário um aprofundamento sobre a interferência da infecção no metabolismo de lipídeos e glicose, e da interferência da obesidade na fisiologia do parasito.

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ABU-GHAZALEH, R I et al. IgA-induced eosinophil degranulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 142, n. 7, p. 2393–2400 , 1989.
- ADAMOPOULOS, S et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. **European heart journal** v. 22, n. 9, p. 791–7 , maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350112>>.
- AL-SUHAIMI, Ebtessam a; SHEHZAD, Adeeb. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. **European journal of medical research** v. 18, p. 12 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- ALZAID, A; AIDEYAN, O; NAWAZ, S. The size of the pancreas in diabetes mellitus. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association** v. 10, n. 8, p. 759–63 , out. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261759>>.
- ANTEN, J F; ZUIDEMA, P J. Hookworm infection in Dutch servicemen returning from West New Guinea. **Tropical and geographical medicine** v. 16, p. 216–24 , set. 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5895548>>.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Annals of medicine** v. 27, n. 4, p. 435–438 , 1995.
- ASSMANN, G et al. Management of hypertriglyceridemic patients. A. Treatment classifications and goals. **The American journal of cardiology** v. 68, n. 3, p. 30A–34A , 24 jul. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1853848>>.
- BAGNI, Ursula Viana; LUIZ, Ronir Raggio; VEIGA, Gloria Valeria Da. Overweight is associated with low hemoglobin levels in adolescent girls. **Obesity Research & Clinical Practice** v. 7, n. 3, p. e218–e229 , maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871403X12000026>>.
- BANKS, W A; DIPALMA, C R; FARRELL, C L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. **Peptides** v. 20, n. 11, p. 1341–5 , nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612449>>.
- BARMA, Pomy et al. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. **Biochimica et biophysica acta** v. 1792, n. 3, p. 190–200 , mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19111928>>.
- BARTH, L R; FERNANDES, A P; RODRIGUES, V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during in vitro cultivation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** NULL, v. 38, n. 6, p. 423–6 , [S.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293088>>.
- BARTSCH, Sarah M et al. The Global Economic and Health Burden of Human Hookworm

Infection. **PLoS neglected tropical diseases** v. 10, n. 9, p. e0004922 , set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27607360>>.

BESSESEN, Daniel H. Update on obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism** v. 93, n. 6, p. 2027–34 , jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539769>>.

BHARGAVA, Perna et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. **Nature medicine** v. 18, n. 11, p. 1665–72 , nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104131>>.

BLACKMAN, V. et al. Albumin metabolism in hookworm anaemias. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 59, n. 4, p. 472–482 , jul. 1965. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(65\)90068-4](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(65)90068-4)>.

BLAXTER, M L *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature** v. 392, n. 6671, p. 71–75 , 1998.0028-0836.

BOUFFI, C. et al. IL-33 Markedly Activates Murine Eosinophils by an NF- κ B-Dependent Mechanism Differentially Dependent upon an IL-4-Driven Autoinflammatory Loop. **The Journal of Immunology** v. 191, n. 8, p. 4317–4325 , 15 out. 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1301465>>.

BOULENOUAR, Selma et al. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. **Immunity** v. 46, n. 2, p. 273–286 , 21 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228283>>.

BRADBURY, Richard S et al. *Ancylostoma ceylanicum* Hookworm in the Solomon Islands. **Emerging infectious diseases** v. 23, n. 2, p. 252–257 , fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28098526>>.

BRAUNE, Julia et al. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 198, n. 7, p. 2927–2934 , 1 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193830>>.

BRESTOFF, Jonathan R et al. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. **Nature** v. 519, n. 7542, p. 242–6 , 12 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533952>>.

BROOKER, Simon; HOTEZ, Peter J; BUNDY, Donald A P. Hookworm-related anaemia among pregnant women: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases** v. 2, n. 9, p. e291 , 17 set. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820740>>.

BUNGIRO, R. D. et al. Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. **Parasite Immunology** v. 30, n. 5, p. 293–303 , 2008.

BUNGIRO, R D et al. Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. **The Journal of infectious diseases** v. 183, n. 9, p. 1380–1387 , 2001.0022-1899.

BUNGIRO, Richard D.; ANDERSON, Brett R.; CAPPELLO, Michael. Oral transfer of adult *Ancylostoma ceylanicum* hookworms into permissive and nonpermissive host species. **Infection and Immunity** v. 71, n. 4, p. 1880–1886 , 2003.

BUTTERWORTH, A E. Cell-mediated damage to helminths. **Advances in parasitology** v. 23, p. 143–235 , 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6397977>>.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut** v. 58, n. 8, p. 1091–1103 , 1 ago. 2009. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2008.165886>>.

CASEY, Gerard J. et al. Sustained effectiveness of weekly iron-folic acid supplementation and regular deworming over 6 years in women in rural Vietnam. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v. 11, n. 4, p. e0005446 , 13 abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005446>>.

CASTRO, G A et al. Altered small bowel propulsion associated with parasitism. **Gastroenterology** v. 71, n. 4, p. 620–625 , 1976.

CHAKIR, Habiba et al. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. **Journal of immunological methods** v. 278, n. 1–2, p. 157–69 , jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957404>>.

CHANG, Hua-Chen et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. **Nature Immunology** v. 11, n. 6, p. 527–534 , 2 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1867>>.

CHANG, Jung-Su et al. Interactive Effects of Dietary Fat/Carbohydrate Ratio and Body Mass Index on Iron Deficiency Anemia among Taiwanese Women. **Nutrients** v. 6, n. 9, p. 3929–3941 , 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/6/9/3929/>>.

CHO, Hye Min et al. The Association Between Serum Albumin Levels and Metabolic Syndrome in a Rural Population of Korea. **Journal of Preventive Medicine & Public Health** v. 45, n. 2, p. 98–104 , 31 mar. 2012. Disponível em: <<http://jpmph.org/journal/view.php?doi=10.3961/jpmph.2012.45.2.98>>.

CHOI, Eun Nam et al. A parallel signal-transduction pathway for eotaxin- and interleukin-5-induced eosinophil shape change. **Immunology** v. 108, n. 2, p. 245–256 , fev. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2567.2003.01565.x>>.

CROESE, John et al. Experimental hookworm infection and gluten microchallenge promote tolerance in celiac disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** v. 135, n. 2, p. 508–516.e5 , fev. 2015.

CUNNINGHAM, K M et al. Gastrointestinal adaptation to diets of differing fat composition in human volunteers. **Gut** v. 32, n. 5, p. 483–486 , 1991.

DA LUZ, F Q et al. Prevalence of obesity and comorbid eating disorder behaviors in South Australia from 1995 to 2015. **International journal of obesity (2005)** , 18 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28337025>>.

- DARK, S J. Malnutrition in African adults. 5. Effects of hookworm infestation on absorption of foodstuffs. **The British journal of nutrition** v. 13, p. 278–282 , 1959.
- DARLAN, Dewi Masyithah et al. Correlation between Intestinal Parasite Infection and Eosinophil Levels among Primary School Children in Medan. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences** , 22 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.idpress.eu/mjms/article/view/oamjms.2017.014>>.
- DAVESON, A. James et al. Effect of Hookworm Infection on Wheat Challenge in Celiac Disease – A Randomised Double-Blinded Placebo Controlled Trial. **PLoS ONE** v. 6, n. 3, p. e17366 , 8 mar. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0017366>>.
- DE GRUIJTER, Johanna M et al. Polymerase chain reaction-based differential diagnosis of *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* infections in humans in northern Ghana. **Tropical medicine & international health : TM & IH** v. 10, n. 6, p. 574–80 , jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941421>>.
- DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology** v. 299, n. 2, p. G440–G448 , ago. 2010a.
- DE LA SERRE, C. B. et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology** v. 299, n. 2, p. G440–G448 , 1 ago. 2010b. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00098.2010>>.
- DEIULIIS, Jeffrey et al. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in regulatory cell numbers. **PLoS ONE** v. 6, n. 1 , 2011.1932-6203 (Electronic)r1932-6203 (Linking).
- DELGADO-AROS, Silvia et al. Obesity is associated with increased risk of gastrointestinal symptoms: a population-based study. **The American journal of gastroenterology** v. 99, n. 9, p. 1801–1806 , 2004.
- DINARELLO, Charles A; DONATH, Marc Y; MANDRUP-POULSEN, Thomas. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity** v. 17, n. 4, p. 314–21 , ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20588114>>.
- DINIZ, Yeda S. et al. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **International Journal of Cardiology** v. 124, n. 1, p. 92–99 , 2008.
- DOENHOFF, M J et al. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. **Parasitology** v. 125, n. Pt 5, p. 415–21 , nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458825>>.
- DONATH, Marc Y et al. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. **Cell metabolism** v. 17, n. 6, p. 860–72 , 4 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747245>>.
- DONATH, Marc Y et al. Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. **Diabetes care** v. 31 Suppl 2, p. S161-4 , fev. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227479>>.

DONDI, Blaise et al. Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. **Infection and Immunity** v. 76, n. 6, p. 2560–2567 , 2008.2037375972.

EGGLETON, P et al. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. **Clinical immunology and immunopathology** v. 72, n. 3, p. 405–9 , set. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062452>>.

ELMUGABIL, Abdelmageed et al. High level of hemoglobin, white blood cells and obesity among Sudanese women in early pregnancy: a cross-sectional study. **Future Science OA** v. 3, n. 2, p. FSO182 , maio 2017. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fsoa-2016-0096>>.

ENRIORI, Pablo J et al. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** v. 31, n. 34, p. 12189–97 , 24 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865462>>.

FALLON, Padraic G. et al. Identification of an interleukin (IL)-25?dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. **The Journal of Experimental Medicine** v. 203, n. 4, p. 1105–1116 , 17 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20051615>>.

FEUERER, Markus et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature medicine** v. 15, n. 8, p. 930–9 , ago. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633656>>.

FISH, Susan C et al. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 174, n. 12, p. 7716–24 , 15 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944273>>.

FONTENOT, Jason D et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity** v. 22, n. 3, p. 329–41 , mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780990>>.

FOTI, Daniela P; BRUNETTI, Antonio. Editorial: “Linking Hypoxia to Obesity”. **Frontiers in endocrinology** v. 8, p. 34 , 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275368>>.

FRAZIER, Thomas H.; DIBAISE, John K.; MCCLAIN, Craig J. Gut Microbiota, Intestinal Permeability, Obesity-Induced Inflammation, and Liver Injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition** v. 35, n. 5_suppl, p. 14S–20S , set. 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0148607111413772>>.

FREITAS, M G. **Helmintologia veterinária**. Rabelo e F ed. Belo Horizonte: Helmintologia Veterinária, 1977. Helmintologia Veterinária.

GABRIE, José Antonio et al. Immune Profile of Honduran Schoolchildren with Intestinal Parasites: The Skewed Response against Geohelminths. **Journal of Parasitology Research** v. 2016, p. 1–13 , 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jpr/2016/1769585/>>.

GANGULY, N. K. et al. Role of specific immunoglobulin E to excretory-secretory antigen in diagnosis and prognosis of hookworm infection. **Journal of Clinical Microbiology** v. 26, n. 4, p. 739–742 , 1988.0095-1137 (Print)r0095-1137 (Linking).

GAROUFI, Anastasia et al. Associations between obesity, adverse behavioral patterns and cardiovascular risk factors among adolescent inhabitants of a Greek island. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM** v. 30, n. 4, p. 445–454 , 1 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28315850>>.

GARSIDE, P; BEHNKE, J M. Ancylostoma ceylanicum in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. **Parasitology** v. 98 Pt 2, p. 283–289 , 1989.

GAZE, Soraya et al. Characterising the Mucosal and Systemic Immune Responses to Experimental Human Hookworm Infection. **PLoS Pathogens** v. 8, n. 2, p. e1002520 , 9 fev. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002520>>.

GEORGE, Santosh et al. Identification of *Ancylostoma ceylanicum* in children from a tribal community in Tamil Nadu, India using a semi-nested PCR-RFLP tool. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 109, n. 4, p. 283–5 , abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618132>>.

GHADIRI-ANARI, Akram; NAZEMIAN, Narjes; VAHEDIAN-ARDAKANI, Hassan-Ali. Association of Body Mass Index with Hemoglobin Concentration and Iron Parameters in Iranian Population. **ISRN Hematology** v. 2014, p. 1–3 , 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/525312/>>.

GHOSH, Kashinath et al. The impact of concurrent and treated *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections on the immunogenicity of a recombinant hookworm vaccine in hamsters. **The Journal of infectious diseases** v. 193, n. 1, p. 155–162 , 2006.0022-1899 (Print)n0022-1899 (Linking).

GOTTSTEIN, B; ISING, S; STOYE, M. [Parasitologic, clinical, hematologic and serologic findings in puppies after lactogenic infection with *Ancylostoma caninum* Ercolani 1859 (Ancylostomidae)]. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B** v. 38, n. 2, p. 111–22 , mar. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1853668>>.

HAILEGEBRIEL, Tamirat. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among students at Dona Berber primary school, Bahir Dar, Ethiopia. **BMC Infectious Diseases** v. 17, n. 1, p. 362 , 23 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2466-x>>.

HAMS, Emily et al. The helminth T2 RNase ω 1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33- and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. **FASEB Journal** v. 30, n. 2, p. 824–835 , 2016.

HAO, Jin et al. Involvement of JNK signaling in IL4-induced M2 macrophage polarization. **Experimental cell research** , 10 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28501460>>.

HAYS, Russell et al. Does *Strongyloides stercoralis* infection protect against type 2 diabetes

in humans? Evidence from Australian Aboriginal adults. **Diabetes Research and Clinical Practice** v. 107, n. 3, p. 355–361, mar. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822715000200>>.

HAYS, Russell et al. *Strongyloides stercoralis*, Eosinophilia, and Type 2 Diabetes Mellitus: The Predictive Value of Eosinophilia in the Diagnosis of *S stercoralis* Infection in an Endemic Community. **Open Forum Infectious Diseases** v. 3, n. 1, p. ofw029, jan. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ofid/article-lookup/doi/10.1093/ofid/ofw029>>.

HEINZEL, F P et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of experimental medicine** v. 169, n. 1, p. 59–72, 1 jan. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2521244>>.

HINTZE, Korry Joseph et al. Adipocyte hypoxia increases hepatocyte hepcidin expression. **Biological Trace Element Research** v. 143, n. 2, p. 764–771, 2011.

HIRATA, Kae et al. Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. **Lipids in health and disease** v. 12, p. 122, 9 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937951>>.

HORI, Shohei; NOMURA, Takashi; SAKAGUCHI, Shimon. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science (New York, N.Y.)** v. 299, n. 5609, p. 1057–61, 14 fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12522256>>.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature** v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474>>.

HOTEZ, Peter J et al. Hookworm infection. **The New England journal of medicine** v. 351, n. 8, p. 799–807, 2004.1533-4406.

HOTEZ, Peter J. et al. Experimental approaches to the development of a recombinant hookworm vaccine. **Immunological Reviews**. [S.l.: s.n.], 1999

HUSSAARTS, Leonie *et al.* Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** v. 29, n. 7, p. 3027–39, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852044>>.

INPANKAEW, Tawin et al. High prevalence of *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections in humans, Cambodia, 2012. **Emerging infectious diseases** v. 20, n. 6, p. 976–82, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865815>>.

ITO, Ayaka *et al.* Role of MAPK phosphatase-1 in the induction of monocyte chemoattractant protein-1 during the course of adipocyte hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 35, p. 25445–25452, 2007.0021-9258 (Print).

JACKSON, Joseph A. et al. Gastrointestinal nematode infection is associated with variation in innate immune responsiveness. **Microbes and Infection** v. 8, n. 2, p. 487–492, fev. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457905002911>>.

JANG, Jessica C. et al. Macrophage-Derived Human Resistin Is Induced in Multiple Helminth Infections and Promotes Inflammatory Monocytes and Increased Parasite Burden. **PLoS Pathogens** v. 11, n. 1, p. e1004579 , 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004579>>.

JIRAANANKUL, Vittaya et al. Incidence and risk factors of hookworm infection in a rural community of central Thailand. **The American journal of tropical medicine and hygiene** v. 84, n. 4, p. 594–8 , abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460016>>.

JORDANIA DA SILVA, Vivian et al. Obesity induction in hamster that mimics the human clinical condition. **Experimental animals** , 28 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28367889>>.

KABEERDOSS, J et al. Exposure to hookworms in patients with Crohn’s disease: a case-control study. **Alimentary pharmacology & therapeutics** v. 34, n. 8, p. 923–30 , out. 2011.

KAILA, Brinderjit; RAMAN, Maitreyi. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie** v. 22, n. 1, p. 61–8 , jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209783>>.

KAUL, C. L. et al. Changes in carbohydrate metabolism in golden hamsters infected with *Necator americanus*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** v. 76, n. 4, p. 475–482 , 24 ago. 1982. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1982.11687568>>.

KEANE, Eimear et al. Physical Activity, Sedentary Behaviour and the Risk of Overweight and Obesity in School Aged Children. **Pediatric exercise science** p. 1–27 , 7 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28388271>>.

KEPHA, Stella et al. Impact of single annual treatment and four-monthly treatment for hookworm and *Ascaris lumbricoides*, and factors associated with residual infection among Kenyan school children. **Infectious Diseases of Poverty** v. 6, n. 1, p. 30 , 9 dez. 2017. Disponível em: <<http://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-017-0244-z>>.

KERN, P A et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism** v. 280, n. 5, p. E745-51 , maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11287357>>.

KIM, Hyunsook et al. Dietary Supplementation of Chardonnay Grape Seed Flour Reduces. , 2014a.

KIM, Hyunsook et al. Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. **Journal of agricultural and food chemistry** v. 62, n. 8, p. 1919–25 , 2014b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517872>>.

KROTKIEWSKI, Marcin; BILLING-MARCZAK, Katarzyna. [Different types of obesity. Can some types of obesity be protective?]. **Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego** v. 37, n. 219, p. 175–80 , set. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345280>>.

LA FLAMME, A. C. et al. Chronic exposure to schistosome eggs reduces serum cholesterol but has no effect on atherosclerotic lesion development. **Parasite Immunology** v. 29, n. 5, p. 259–266 , maio 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2007.00942.x>>.

LEE, Jane J. et al. Predictive equations for central obesity via anthropometrics, stereovision imaging and MRI in adults. **Obesity** v. 22, n. 3, p. 852–862 , mar. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/oby.20489>>.

LEE, Stephen D.; TONTONOZ, Peter. Eosinophils in Fat: Pink Is the New Brown. **Cell** v. 157, n. 6, p. 1249–1250 , jun. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414006680>>.

LI, Chaoyang et al. Increasing Trends in Waist Circumference and Abdominal Obesity among U.S. Adults*. **Obesity** v. 15, n. 1, p. 216–216 , jan. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2007.505>>.

LI, Pingping et al. LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. **Nature Medicine** , 23 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nm.3800>>.

LICONA-LIMÓN, Paula et al. Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. **Immunity** v. 39, n. 4, p. 744–757 , out. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313004342>>.

LIU, Xuefeng et al. Prevalence and change of central obesity among US Asian adults: NHANES 2011–2014. **BMC Public Health** v. 17, n. 1, p. 678 , 25 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcpublihealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-017-4689-6>>.

LOLMÈDE, K et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity** v. 27, n. 10, p. 1187–95 , out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513066>>.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. **Clinical Microbiology Reviews**. [S.l: s.n.] , 2001

LOUKAS, A; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. **Clinical microbiology reviews** v. 14, n. 4, p. 689–703, table of contents , out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585781>>.

LOUKAS, Alex et al. Hookworm infection. **Nature reviews. Disease primers** NULL, v. 2, p. 16088 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27929101>>.

LYNCH, Lydia. Adipose invariant natural killer T cells. **Immunology** v. 142, n. 3, p. 337–46 , jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24673647>>.

LYNCH, Lydia et al. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. **Immunity** v. 37, n. 3, p. 574–

87 , 21 set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981538>>.

LYNCH, Lydia et al. iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. **Cell metabolism** v. 24, n. 3, p. 510–9 , 13 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27593966>>.

LYNCH, Lydia et al. Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. **European journal of immunology** v. 39, n. 7, p. 1893–901 , jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19585513>>.

LYON, Christopher J; LAW, Ronald E; HSUEH, Willa A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology** v. 144, n. 6, p. 2195–200 , jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12746274>>.

MA, Yongjie et al. Interleukin-6 gene transfer reverses body weight gain and fatty liver in obese mice. **Biochimica et biophysica acta** v. 1852, n. 5, p. 1001–11 , maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660446>>.

MADJID, Mohammad; FATEMI, Omid. Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update. **Texas Heart Institute journal** v. 40, n. 1, p. 17–29 , 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467296>>.

MAGALHAES, Isabelle; KIAF, Badr; LEHUEN, Agnès. iNKT and MAIT Cell Alterations in Diabetes. **Frontiers in immunology** v. 6, p. 341 , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191063>>.

MANDRUP-POULSEN, T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia** v. 39, n. 9, p. 1005–29 , set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877284>>.

MATTIOLI, Benedetta et al. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 174, n. 11, p. 6820–8 , 1 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905523>>.

MAUER, Jan et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nature Immunology** v. 15, n. 5, p. 423–430 , 30 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2865>>.

MCKAY, Derek M.; SHUTE, Adam; LOPES, Fernando. Helminths and intestinal barrier function. **Tissue Barriers** v. 5, n. 1, p. e1283385 , 2 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21688370.2017.1283385>>.

MENDEZ, S. et al. Host Cytokine Production, Lymphoproliferation, and Antibody Responses during the Course of *Ancylostoma ceylanicum* Infection in the Golden Syrian Hamster. **Infection and Immunity** v. 73, n. 6, p. 3402–3407 , 1 jun. 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.6.3402-3407.2005>>.

MENON, S; BHOPALE, M K. *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) in golden hamsters

(*Mesocricetus auratus*): pathogenicity and humoral immune response to a primary infection. **Journal of helminthology** v. 59, n. 2, p. 143–146 , 1985.

MENTZEL, Caroline M Junker et al. Fat and carbohydrate content in the diet induces drastic changes in gene expression in young Göttingen minipigs. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society** , 10 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396939>>.

MIGDALIS, I N et al. Size of the pancreas in non-insulin-dependent diabetic patients. **Journal of medicine** v. 22, n. 3, p. 179–86 , 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770326>>.

MIROLI, A A; SPITZ, M. Studies on the human basophil IgE receptor. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the receptor. **Journal of immunological methods** v. 97, n. 2, p. 185–90 , 12 mar. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2950176>>.

MISHRA, J.; WATERS, C. M.; KUMAR, N. Molecular mechanism of interleukin-2-induced mucosal homeostasis. **AJP: Cell Physiology** v. 302, n. 5, p. C735–C747 , 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00316.2011>>.

MISRA, Anoop; KHURANA, Lokesh. Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 93, n. 11_supplement_1, p. s9–s30 , nov. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2008-1595>>.

MOLOFSKY, Ari B. et al. Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. **Immunity** v. 43, n. 1, p. 161–174 , jul. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761315002174>>.

MONTAZERGHAEEM, Hossein; SAFAIE, Naser; SAMIEI NEZHAD, Vahid. Body Mass Index or Serum Albumin Levels: Which is further Prognostic following Cardiac Surgery? **Journal of cardiovascular and thoracic research** v. 6, n. 2, p. 123–6 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031829>>.

MONTEIRO, Marta et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 185, n. 4, p. 2157–63 , 15 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639482>>.

MORAWSKI, Bozena M et al. Hookworm infection is associated with decreased CD4+ T cell counts in HIV-infected adult Ugandans. **PLoS neglected tropical diseases** v. 11, n. 5, p. e0005634 , maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28542260>>.

MUHANGI, Lawrence et al. Associations between mild-to-moderate anaemia in pregnancy and helminth, malaria and HIV infection in Entebbe, Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 101, n. 9, p. 899–907 , set. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555783>>.

MUKAI, Kaori et al. Differences in the Importance of Mast Cells, Basophils, IgE, and IgG versus That of CD4 + T Cells and ILC2 Cells in Primary and Secondary Immunity to *Strongyloides venezuelensis*. **Infection and Immunity** v. 85, n. 5, p. e00053-17 , maio 2017. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00053-17>>.

MUKAYA, Japheth E et al. Prevalence and morphological types of anaemia and hookworm infestation in the medical emergency ward, Mulago Hospital, Uganda. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde** v. 99, n. 12, p. 881–6 , 7 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459999>>.

MUKERJEE, S. et al. Molecular basis of hyperlipidemia in golden hamsters during experimental infection with *Ancylostoma ceylanicum* (Nematoda: Strongylidae). **International Journal for Parasitology** v. 20, n. 2, p. 217–223 , abr. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002075199090104U>>.

MÜNZBERG, Heike; FLIER, Jeffrey S; BJØRBAEK, Christian. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology** v. 145, n. 11, p. 4880–9 , nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271881>>.

MURILLO, Ana; DIMARCO, Diana; FERNANDEZ, Maria. The Potential of Non-Provitamin A Carotenoids for the Prevention and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Biology** v. 5, n. 4, p. 42 , 8 nov. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-7737/5/4/42>>.

MURPHY, Aoife M et al. Intermittent hypoxia in obstructive sleep apnoea mediates insulin resistance through adipose tissue inflammation. **The European respiratory journal** v. 49, n. 4 , abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424360>>.

MUSHREF, Mazen Al; SRINIVASAN, Shanthi. Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. **Annals of translational medicine** v. 1, n. 2, p. 14 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.3367131598.

NAMMI, Srinivas et al. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. **Nutrition journal** v. 3, p. 3 , 14 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084221>>.

NAVARRO, Severine et al. Hookworm recombinant protein promotes regulatory T cell responses that suppress experimental asthma. **Science translational medicine** NULL, v. 8, n. 362, p. 362ra143 , 26 out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27797959>>.

NEELS, Jaap G; OLEFSKY, Jerrold M. Inflamed fat: what starts the fire? **The Journal of clinical investigation** v. 116, n. 1, p. 33–5 , jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16395402>>.

NELSON, Charles L. et al. Low Albumin Levels, More Than Morbid Obesity, Are Associated With Complications After TKA. **Clinical Orthopaedics and Related Research®** v. 473, n. 10, p. 3163–3172 , 21 out. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11999-015-4333-7>>.

NGUI, Romano et al. Epidemiological and genetic data supporting the transmission of *Ancylostoma ceylanicum* among human and domestic animals. **PLoS neglected tropical diseases** v. 6, n. 2, p. e1522 , 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347515>>.

NICOLAS, Gaël et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **Journal of Clinical Investigation** v. 110, n. 7, p. 1037–1044 , 2002.0021-9738 (Print)r0021-9738 (Linking).

O’SULLIVAN, Timothy E et al. Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. **Immunity** v. 45, n. 2, p. 428–41 , 16 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27496734>>.

OMITOLA, O. O. et al. Geohelminth Infections and Nutritional Status of Preschool Aged Children in a Periurban Settlement of Ogun State. **Scientifica** v. 2016, p. 1–9 , 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2016/7897351/>>.

OSBORN, Olivia; OLEFSKY, Jerrold M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine** v. 18, n. 3, p. 363–374 , 6 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2627>>.

OSWALD, William E. et al. Association of community sanitation usage with soil-transmitted helminth infections among school-aged children in Amhara Region, Ethiopia. **Parasites & Vectors** v. 10, n. 1, p. 91 , 17 dez. 2017. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2020-0>>.

PACANARO, Carina P et al. Evaluation of biochemical, hematological and parasitological parameters of protein-deficient hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. **PLoS neglected tropical diseases** v. 8, n. 9, p. e3184 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254370>>.

PALMER, Carlyle S et al. The veterinary and public health significance of hookworm in dogs and cats in Australia and the status of *A. ceylanicum*. **Veterinary parasitology** v. 145, n. 3–4, p. 304–13 , 30 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276602>>.

PASSOS, Lívia Silva Araújo et al. Regulatory monocytes in helminth infections: insights from the modulation during human hookworm infection. **BMC Infectious Diseases** v. 17, n. 1, p. 253 , 8 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2366-0>>.

PATTON, J S et al. Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 83, n. 21, p. 8313–7 , nov. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430284>>.

PAZ-FILHO, Gilberto et al. Leptin therapy, insulin sensitivity, and glucose homeostasis. **Indian journal of endocrinology and metabolism** v. 16, n. Suppl 3, p. S549-55 , 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602983&tool=pmcentrez&render_type=abstract>.2230-8210 (Print)r2230-9500 (Linking).

PENG, Wen; GOLDSMITH, Rebecca; BERRY, Elliot M. Demographic and lifestyle factors associated with adherence to the Mediterranean diet in relation to overweight/obesity among Israeli adolescents: findings from the Mabat Israeli national youth health and nutrition survey. **Public health nutrition** v. 20, n. 5, p. 883–892 , abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829478>>.

PEREIRA, Edvânia Beatriz dos Santos et al. Detection of intestinal parasites in the environments of a public school in the town of Diamantina , Minas Gerais state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 58 , 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000238&lng=en&tlng=en>.

PERES, Raphael Sanches et al. Previous contact with *Strongyloides venezuelensis* contributed to prevent insulinitis in MLD-STZ diabetes. **Experimental Parasitology** v. 134, n. 2, p. 183–189 , jun. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489413000775>>.

PETRANGELI, Elisa et al. Hypoxia Promotes the Inflammatory Response and Stemness Features in Visceral Fat Stem Cells From Obese Subjects. **Journal of cellular physiology** v. 231, n. 3, p. 668–79 , mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26224080>>.

PULLAN, Rachel L et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. **Parasites & Vectors** v. 7, n. 1, p. 37 , 2014. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-37>>.

PUNSAWAD, Chuchard et al. Prevalence of intestinal parasitic infection and associated risk factors among village health volunteers in rural communities of southern Thailand. **BMC Public Health** v. 17, n. 1, p. 564 , 9 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-017-4486-2>>.

RACHMI, C N; LI, M; ALISON BAUR, L. Overweight and obesity in Indonesia: prevalence and risk factors-a literature review. **Public health** v. 147, p. 20–29 , 6 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404492>>.

RAI, S K et al. Effect of intestinal helminth infection on some nutritional parameters among rural villagers in Nepal. **The Kobe journal of medical sciences** v. 44, n. 2, p. 91–8 , abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036863>>.

RAINBIRD, M A; MACMILLAN, D; MEEUSEN, E N. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. **Parasite immunology** v. 20, n. 2, p. 93–103 , fev. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572052>>.

RAKSHANDEHROO, M; KALKHOVEN, E; BOES, M. Invariant natural killer T cells in adipose tissue: novel regulators of immune-mediated metabolic disease. **Cellular and molecular life sciences : CMLS** v. 70, n. 24, p. 4711–27 , dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835837>>.

RAO, G M; MORGHOM, L O. Effect of obesity on erythrocyte count and hemoglobin levels in Libyan diabetic patients. **Clinical physiology and biochemistry** v. 4, n. 4, p. 277–80 , 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3757413>>.

RAUSCH, M E et al. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. **International journal of obesity (2005)** v. 32, n. 3, p. 451–463 , 2008.1476-5497 (Electronic)n0307-0565 (Linking).

REP, B H; HEINEMANN, D W. Changes in hookworm distribution in Surinam. **Tropical**

and **geographical medicine** v. 28, n. 2, p. 104–10, jun. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/987625>>.

REXRODE, Kathryn M et al. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annals of epidemiology** v. 13, n. 10, p. 674–82, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599731>>.

RICARDO-GONZALEZ, R. R. et al. IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 107, n. 52, p. 22617–22622, 28 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009152108>>.

RICCI, Natasha Delaqua et al. Induction of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 5, n. 11, 2011.1935-2735.

ROBBINS, S L et al. **Fundamentos de patologia estrutural e funcional**. 6º ed. [S.l.: s.n.], 2001. .

RODRÍGUEZ-GUARDADO, A et al. [Hookworm as cause of iron deficiency anemia in the prison population]. **Revista española de sanidad penitenciaria** v. 15, n. 2, p. 63–5, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843143>>.

ROSEN, Evan?D.; SPIEGELMAN, Bruce?M. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell** v. 156, n. 1–2, p. 20–44, jan. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413015468>>.

ROSSI, M.C.E. *et al.* Obesity and changes in urine albumin/creatinine ratio in patients with type 2 diabetes: The DEMAND Study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases** v. 20, n. 2, p. 110–116, fev. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939475309000453>>.

SADAGURSKI, M. et al. Human IL6 enhances leptin action in mice. **Diabetologia** v. 53, n. 3, p. 525–535, 10 mar. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00125-009-1580-8>>.

SAHIMIN, Norhidayu et al. Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. **Acta Tropica** v. 173, p. 109–115, set. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X1730102X>>.

SARAYA, A K; TANDON, B N. Hookworm anaemia and intestinal malabsorption associated with hookworm infestation. **Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques** v. 19, p. 108–118, 1975.

SARAYA, A K; TANDON, B N; RAMACHANDRAN, K. Study of vitamin B12 and folic acid deficiency in hookworm disease. **The American journal of clinical nutrition** v. 24, n. 1, p. 3–6, jan. 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5539055>>.

SCHRAMM, Gabriele *et al.* Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine

basophils in vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 178, n. 10, p. 6023–7 , 15 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475824>>.

SCHRODER, K. Interferon- : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology** v. 75, n. 2, p. 163–189 , 23 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0603252>>.

SCHUSTER, Rolf K et al. The parasite fauna of stray domestic cats (*Felis catus*) in Dubai, United Arab Emirates. **Parasitology research** v. 105, n. 1, p. 125–34 , jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238440>>.

SHEN, S.-W. et al. The potential long-term effect of previous schistosome infection reduces the risk of metabolic syndrome among Chinese men. **Parasite Immunology** v. 37, n. 7, p. 333–339 , jul. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12187>>.

SHI, Hang et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of clinical investigation** v. 116, n. 11, p. 3015–25 , nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053832>>.

SILSWAL, Nirupama et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. **Biochemical and biophysical research communications** v. 334, n. 4, p. 1092–101 , 9 set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039994>>.

SILVA, M E *et al.* Ultrasonographic abnormalities of the pancreas in IDDM and NIDDM patients. **Diabetes care** v. 16, n. 9, p. 1296–7 , set. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404436>>.

SMOUT, Felicity A et al. The hookworm *Ancylostoma ceylanicum*: An emerging public health risk in Australian tropical rainforests and Indigenous communities. **One health (Amsterdam, Netherlands)** v. 3, p. 66–69 , jun. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28616506>>.

SOBOTKA, A K et al. IgE-mediated basophil phenomena: quantitation, control, inflammatory interactions. **Immunological reviews** v. 41, p. 171–85 , 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/81547>>.

SOULSBY, E J. The immune system and helminth infection in domestic species. **Advances in veterinary science and comparative medicine** v. 23, p. 71–102 , 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/550707>>.

SPITE, Matthew et al. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 187, n. 4, p. 1942–9 , 15 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742977>>.

STANLEY, Ronald G. et al. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice. **Atherosclerosis** v. 207, n. 1, p. 131–138 , nov. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002191500900330X>>.

STOTT, G. Anaemia in Mauritius. **Bulletin of the World Health Organization** v. 23, n. 6, p. 781–91 , 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20604074>>.

SUÁREZ-ÁLVAREZ, K. et al. Serum IL-12 Is Increased in Mexican Obese Subjects and Associated with Low-Grade Inflammation and Obesity-Related Parameters. **Mediators of Inflammation** v. 2013, p. 1–8 , 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/967067/>>.

SUGAWARA, Reiko et al. Small intestinal eosinophils regulate Th17 cells by producing IL-1 receptor antagonist. **The Journal of Experimental Medicine** v. 213, n. 4, p. 555–567 , 4 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20141388>>.

SUN, Zhizhi et al. Leptin Inhibits Neutrophil Apoptosis in Children via ERK/NF- κ B-Dependent Pathways. **PLoS ONE** v. 8, n. 1, p. e55249 , 31 jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055249>>.

TATEYA, Sanshiro; KIM, Francis; TAMORI, Yoshikazu. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**. [S.l.: s.n.] , 2013

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology** v. 6, n. 10, p. 772–783 , 22 out. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1937>>.

TRAUB, Rebecca J et al. Application of a species-specific PCR-RFLP to identify *Ancylostoma* eggs directly from canine faeces. **Veterinary parasitology** v. 123, n. 3–4, p. 245–55 , 2 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325050>>.

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology** v. 3, n. 2, p. 133–46 , fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563297>>.

TURNER, Jerrold R. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation. **The American Journal of Pathology** v. 169, n. 6, p. 1901–1909 , dez. 2006a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010626521>>.

TURNER, Jerrold R. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation. **The American Journal of Pathology** v. 169, n. 6, p. 1901–1909 , dez. 2006b.

UNDERDOWN, B J; SCHIFF, J M. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. **Annual review of immunology** v. 4, p. 389–417 , 1986.

VAN DEN BERG, Susan M. et al. Immune modulation of brown(ing) adipose tissue in obesity. **Endocrine Reviews** p. er.2016-1066 , 16 nov. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2016-1066>>.

VERMILLION, D L; COLLINS, S M. Increased responsiveness of jejunal longitudinal muscle in *Trichinella*-infected rats. **The American journal of physiology** v. 254, n. 1 Pt 1, p. G124–G129 , 1988.

VILCHIS-GIL, Jenny et al. Food habits, physical activities and sedentary lifestyles of eutrophic and obese school children: a case–control study. **BMC Public Health** v. 15, n. 1 , 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/15/124>>.

WANG, Yi et al. Role of C/EBP homologous protein and endoplasmic reticulum stress in asthma exacerbation by regulating the IL-4/signal transducer and activator of transcription

6/transcription factor EC/IL-4 receptor α positive feedback loop in M2 macrophages. **The Journal of allergy and clinical immunology** , 24 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28238747>>.

WANG, Yulan et al. Systems Metabolic Effects of a *Necator americanus* Infection in Syrian Hamster. **Journal of Proteome Research** v. 8, n. 12, p. 5442–5450 , 4 dez. 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr900711j>>.

WARDELL, Rebecca et al. An environmental assessment and risk map of *Ascaris lumbricoides* and *Necator americanus* distributions in Manufahi District, Timor-Leste. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v. 11, n. 5, p. e0005565 , 10 maio 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005565>>.

WARNE, J P. Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **The Journal of endocrinology** v. 177, n. 3, p. 351–5 , jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773114>>.

WEAVER, L T; AUSTIN, S; COLE, T J. Small intestinal length: a factor essential for gut adaptation. **Gut** v. 32, n. 11, p. 1321–3 , nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1752463>>.

WIEDERMANN, U et al. Intestinal worm burden and serum cholesterol or lipid concentration in a Shipibo population (Peru). **Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology** v. 275, n. 2, p. 279–86 , jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1930580>>.

WILSON, Mark S; MAIZELS, Rick M. Regulatory T cells induced by parasites and the modulation of allergic responses. **Chemical immunology and allergy** v. 90, p. 176–95 , 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210910>>.

WILSON, Shona et al. Rapidly Boosted Plasma IL-5 Induced by Treatment of Human *Schistosomiasis haematobium* Is Dependent on Antigen Dose, IgE and Eosinophils. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 7, n. 3, p. e2149 , 28 mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002149>>.

WIRIA, Aprilianto Eddy et al. Relationship between Carotid Intima Media Thickness and Helminth Infections on Flores Island, Indonesia. **PLoS ONE** v. 8, n. 1, p. e54855 , 24 jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054855>>.

WOLFS, I. M. J. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. **The FASEB Journal** v. 28, n. 1, p. 288–299 , 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.13-235911>>.

WOOD, I Stuart et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **The Proceedings of the Nutrition Society** v. 68, n. 4, p. 370–7 , nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698203>>.

WU, Davina et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science (New York, N.Y.)** v. 332, n. 6026, p. 243–247 , 2011.1095-9203 (Electronic)n0036-8075 (Linking).

WUNDERLICH, F Thomas et al. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells

suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. **Cell metabolism** v. 12, n. 3, p. 237–49 , 8 set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816090>>.

YANG, Bo-Gie; SEOH, Ju-Yong; JANG, Myoung Ho. Regulatory Eosinophils in Inflammation and Metabolic Disorders. **Immune Network** v. 17, n. 1, p. 41 , 2017. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2017.17.1.41>>.

YANG, Zhonghan et al. Parasitic nematode-induced modulation of body weight and associated metabolic dysfunction in mouse models of obesity. **Infection and immunity** NULL, v. 81, n. 6, p. 1905–14 , jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509143>>.

YING, Wei et al. Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB4/LTB4R1 signaling. **The Journal of clinical investigation** v. 127, n. 3, p. 1019–1030 , 1 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192375>>.

ZACCONE, Paola et al. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. **European Journal of Immunology** v. 39, n. 4, p. 1098–1107 , abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200838871>>.

ZHOU, Yi et al. Leptin Deficiency Shifts Mast Cells toward Anti-Inflammatory Actions and Protects Mice from Obesity and Diabetes by Polarizing M2 Macrophages. **Cell Metabolism** v. 22, n. 6, p. 1045–1058 , dez. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115004702>>.

10. ANEXOS

—Original—

Obesity induction in hamster that mimics the human clinical condition

Vivian JORDANIA DA SILVA^{1,2}, Sílvia Regina Costa DIAS^{1,3}, Tatiani Uceli MAIOLI⁴,
Luciana Ribeiro SERAFIM¹, Luis Fernando Viana FURTADO¹, Maria da Gloria QUINTÃO SILVA²,
Ana Maria Caetano de FARIA⁵, and Élide Mara Leite RABELO¹

¹Molecular Parasitology Laboratory, Parasitology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Center University UNA, Guajajaras St, 175, Center. CEP 30180-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Center University Estácio Juiz de Fora, Av. Presidente João Goulart, 600, Cruzeiro do Sul. CEP 36030-900. Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

⁴Nutrition Department, Nursing School, Federal University of Minas Gerais. Alfredo Balena Ave, 190, Santa Efigênia, CEP 30130-100.

⁵Biochemistry and Immunology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Abstract: Although obesity is well established in hamsters, studies using diets with high levels of simple carbohydrate associated with lipids are necessary to assess the impact of this type of food in the body. In this study a high sugar and butter diet (HSB) and high temperature were employed towards this end. Obesity was successfully induced at a temperature of 30.3°C to 30.9°C after 38 days feeding the animals an HSB diet. It was shown that although diet is important for the induction of obesity, temperature is also essential because at a temperature slightly below the one required, obesity was not induced, even when the animals were fed for a longer period (150 days). The obese clinical condition was accompanied by biochemical and hematological changes, as increased cholesterol and triglyceride levels and increased leukocyte numbers, similar to alterations observed in obese humans. Furthermore, it was demonstrated that increasing the intake of simple carbohydrates associated with lipids provided evidence of inflammation in obese animals.

Key words: AIN-93, hamster, high sugar and butter diet, obesity, temperature

Introduction

Obesity is increasing gradually due to poor diet and sedentary lifestyles in the population around the world. According to the World Health Organization [54], approximately 1.9 billion adults have a body mass index (BMI) in the overweight range, and approximately 600 million are obese. This condition may be characterized as low intensity inflammation caused by the increased

body weight and adipose tissue expansion, increasing the predisposition to cardiovascular diseases, dyslipidemias, cancer, chronic kidney disease, and type 2 diabetes [30].

Hypercaloric and high fat diets have been widely used for inducing obesity in animal models because there is a similarity with the pathogenesis of obesity in humans [11]. Considering the physiological similarity to humans, pigs have been used as good models for these studies

(Received 20 January 2017 / Accepted 7 March 2017 / Published online in J-STAGE 28 March 2017)

Address corresponding: É.M.L. Rabelo, Molecular Parasitology Laboratory, Parasitology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Antônio Carlos Ave, 6627, Pampulha. CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Supplementary Figures: refer to J-STAGE: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/exanim>

Table 1. AIN-93 M diet formulated for maintenance of adult rodents and the high sugar and butter diet

Ingredient	g/kg diet	
	AIN-93M (CTRL diet)*	High sugar and butter (HSB) diet
Cornstarch	465.692	265.692
Casein (>85% protein)	140.000	140.000
Dextrinizedcornstarch	155.000	–
Sucrose	100.000	265.000
Soybean oil	40.000	40.000
Fibre (cellulose)	50.000	50.000
Mineral mix (AIN-93 M-MX)	35.000	35.000
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10.000	10.000
L-Cystine	1.800	1.800
Choline bitartrate	2.500	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008
Unsalted butter	–	190.000
TOTAL	1,000	1,000
Kcal/g of diet	3.8	4.8
Carbohydrate (%)	76	45
Protein (%)	15	12
Lipid (%)	9	44

Note: Adapted from Reeves, *et al.* [39].

[47], but work with these animals in laboratories turns out to be unfeasible due to the physical structures required. Mice [52], rats [53] and hamsters have also served as models for studying obesity [50].

Some pathogens, particularly hookworms [34], *Leishmania* sp. [3], Hantavirus [42], and Ebola virus [12] are more likely or exclusively infective for particular groups of rodents, as hamsters. Furthermore, hamsters are used as a model of cardiomyopathy, diabetes, muscular dystrophy, cancer and other diseases [16]. Despite the obesity model be established in hamster, studies using diets high in simple carbohydrates and lipids, that would contribute on the understanding of some chronic diseases, are scarce in the literature, requiring further investigation as suggested by Greenwood *et al.* [20]. Morgantini *et al.* [32] shows that high glycemic carbs interfere with the absorption of lipids and contribute to the development of low intensity inflammation, as glucose has the ability to activate genes related to inflammation by epigenetic mechanisms. Hamsters are considered seasonal hibernators, a characteristic that can manifest at any time of the year depending on environmental conditions and is influenced by annual periods and shorter days and various physiological parameters [4, 22, 26]. Therefore, it is conceivable that the induction of obesity will be influenced by these parameters. Thus, the objective of this study was to induce obesity in hamsters (*Mesocricetus auratus*) in different annual periods and assessing for temperature interference in weight

gain. Furthermore, we evaluated to which extension obesity induced by a diet with a high concentration of simple carbohydrates and lipids interferes with clinical and haematological parameters of animals compared to controls.

Materials and Methods

Ethical statement

All animal procedures were approved by the Animal Care Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, protocol number 194/2011) and were performed under the guidelines of the Brazilian Council of Animal Experimentation (CONCEA) and strictly followed Brazilian law for “Procedures for the Scientific Use of Animals” (11.794/2008).

Experimental diets

The composition of the manipulated diets in the present study was based on the AIN-93 M rodent diet as recommended by the American Institute of Nutrition (1993) with modifications of the fat components and carbohydrates as described by Maioli *et al.* [28]. The diets were offered to animals as pellets, and each diet group was maintained until the day of euthanasia. The animals were fed on diets *ad libitum*. The composition of AIN-93 M (CTRL) and the high sugar and butter diet (HSB) diet are described in Table 1.

Experimental design

This study was performed using female hamsters (*Mesocricetus auratus*) (4–6 weeks old). They were housed in the Animal Facility at the Department of Parasitology, UFMG, with a 12 h light/dark cycle. Water and manipulated diet were provided *ad libitum*. Animals at the facility are routinely treated before experiments with one 5 mg/kg dose of Ivomec® (Ivomec Gold 1%, Merial Saúde Animal Ltda, SP, Brazil) via gavage to eliminate possible parasitic infections. The hamsters were randomly distributed into two groups each that were fed either AIN-93 M (CTRL) [39] or a high sugar and butter diet (HSB) modified from AIN-93 M [28]. The diets of each group were maintained until the day of euthanasia. Two experiments (12 hamsters/each) were conducted to evaluate the effect of temperature on hamster eating behaviour and its influence on hamster weight gain: 1) April–September (fall–spring, 150 days), and 2) December–March (summer, 68 days). A third experiment (12 hamsters) was conducted from June to November (winter–spring, 150 days) following the same methodology, and the results are not presented, but are discussed. During the first experiment, a heater was installed on the 60th day of the experiment in the animal house to increase the room temperature. The findings of the first experiment were used to standardize and optimize the weight gain of the animals for the remaining experiments. In experiment 2 and 3, the heater was maintained from the first day of the experiment. The animal house temperature was measured daily. The meteorological data for the duration of the experiments were obtained from the National Institute of Meteorology of Brazil (INMET).

Assessing obesity condition

The parameters used to consider an animal obese were biochemical and haematological changes, increased adiposity percentage and significant weight gain compared to the control group. After animals reached a statistically significant weight gain, they were euthanized by an overdose of anaesthetic solution administered intraperitoneally (240 mg/kg ketamine plus 45 mg/kg xylazine chloride solution, Cetamin® and Xilazin®, Syntec, Brazil).

Measurement of hamster weight

The weight of the hamsters was measured on day 0 of the experiment and every 7 days until the end of the

experiments using a semi-analytical balance.

Consumption of food and water

The diets were offered *ad libitum* to each group of animals. The consumption of diets per group was calculated by the difference in grams of food offered and remaining food found in the cages daily. Water consumption was measured twice a week and was calculated by the difference in millilitres of water offered and remaining water found in the bottle. Food and water consumption values are expressed as the mean for each group.

Blood collection and haematological parameters

The blood samples were collected on the first day of the diet (day 0) and every 30 or 38 days until the end of the experiment, based on the study of Pacanaro *et al.* [34]. The hamsters were fasted for 12 h prior to individual blood collection from the sublingual vein. Two aliquots of blood were collected: one with EDTA-potassium fluoride solution added to each sample (Doles, Goiânia, Brazil), to obtain plasma, and other, without anticoagulant, to obtain serum after centrifugation. The blood was used to evaluate red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) numbers. The cells were counted with a Newbauer chamber. The WBC differential count was determined with smears stained with May-Grunwald-Giemsa and examined under a light microscope (Olympus BH2, Japan).

Blood biochemical parameters

The animals were fasted for 12 h before blood collection. The biochemical parameters evaluated from plasma were total cholesterol and triglycerides and from serum, was evaluated fasting glucose. All measurements were performed using commercial kits (Doles, Goiânia, Brazil). Reference values for female hamsters were obtained from Gad [16].

Visceral adiposity

One day before the end of the experiment, all animals were weighed. After euthanasia, the visceral adipose tissue was recovered from each animal and weighed [34]. The visceral adiposity index was determined by the formula:

$$\text{Adiposity} = \frac{\text{Weight of visceral adipose tissue recovered} \times 100}{\text{Total weight of the live animal}}$$

Statistical analysis

All data were examined for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. For analysis between two groups, Student's *t*-test was used for parametric data, and the Wilcoxon Matched Pairs or Mann-Whitney test was used for nonparametric data. The Kruskal-Wallis test was used followed by Dunn's post-hoc test for comparisons of three or more groups of nonparametric data. One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test was used for parametric data. The Grubbs test was used to detect outliers, which were removed from the sample. All tests were considered significant at the $P < 0.05$ level. All analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Experiment 1: Fall-Spring

Figure 1a shows the temperature values outside and inside the animal house and the weight gain of both groups. The heater, installed on the 60th day of the experiment, increased the temperature of the animal house from 25.1°C to 30.3°C (Supplementary Fig. S1a). The weight difference between the CTRL and HSB groups began after the 90th day (30 days after installation of the heater unit in the room). Consequently, 150 days after starting the diet, the HSB group showed a significant increase in visceral fat (approximately 2×) (Fig. 1b). The external maximum temperature averaged 25.7°C in the period during which this experiment was performed.

After installing the heater, two animals of the HSB group showed aggressive behaviour and dominance in the cage. These animals interfered with the feeding performance of the remaining animals in the cage and were removed from the experiment. After the isolation of the dominant animals, the aggressive behavior persisted to the remaining animals, being detected by fights among the females and wounds in the body, but without interference in the weight gain. There was a significant difference in the weight gain between the feed intake of the CTRL (9.94 ± 1.78 g/day/animal) and the HSB (7.79 ± 0.19 g/day/animal) groups ($P < 0.05$), whereas no difference was observed for water consumption (data not shown).

There was a significant difference in the levels of total triglycerides (Fig. 2a), cholesterol (Fig. 2b) and glucose (Fig. 2c), with increased levels of cholesterol and triglycerides to the animals from the HSB group compared to the control group. This difference was higher

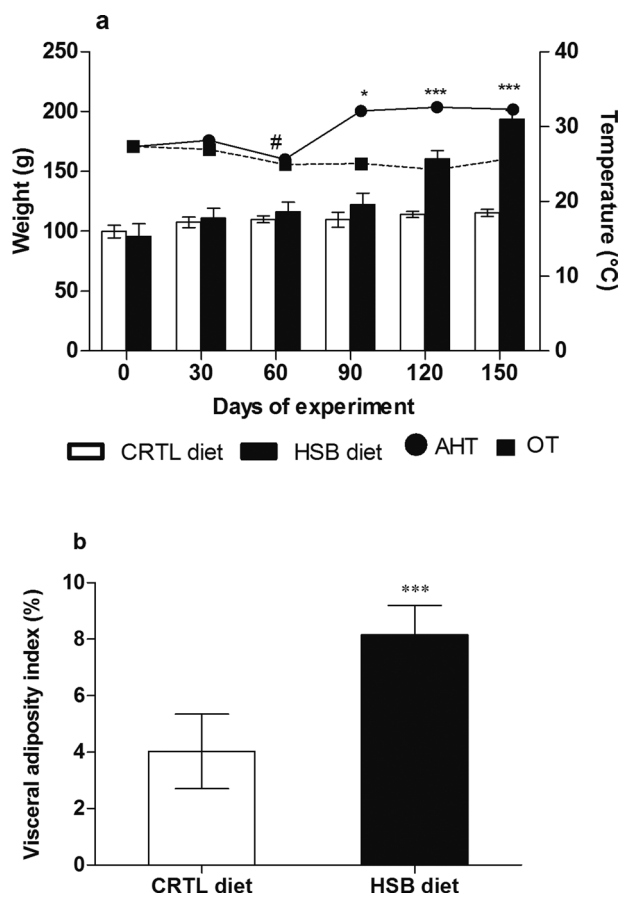


Fig. 1. (a) Hamster body weight in grams (bars) and temperature inside and outside the animal house (lines). (b) Visceral Adiposity Index at 150 days (as a percentage). Hamsters fed the AIN 93 M diet (CTRL, $n=6$) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, $n=4$). Animal house temperature (AHT) and outside temperature (OT) in degrees Celsius (°C). # Start of heater use in the animal house. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

from day 90 to the end of the experiment for total triglycerides ($P < 0.01$) and cholesterol ($P < 0.001$), while the HSB group only showed increase in blood glucose ($P < 0.001$) from day 120 to the end of the experiment.

After 60 days of the experiment (installation of heater), hamsters fed with the high sugar and butter diet had an increase in the number of leukocytes (Fig. 3a). After the 120th day of the experiment, we observed an increase in the number of neutrophils (Fig. 3b) and lymphocytes (Fig. 3c). The monocytes were elevated from the 60th day until the end of the experiment (Fig. 3d).

Experiment 2: Summer

After it has been demonstrated the need of a heater to

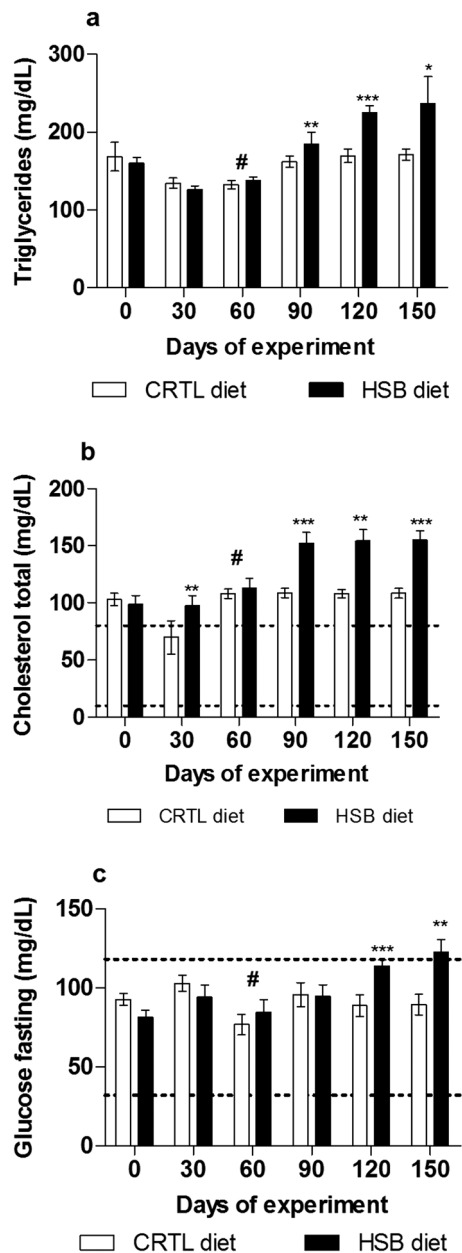


Fig. 2. (a) Triglycerides in milligrams per deciliter. (b) Cholesterol in milligrams per deciliter. (c) Glucose fasting in milligrams per deciliter. Hamsters fed the AIN-93 M diet (CTRL, $n=6$) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, $n=6$ or 4). # beginning of use of the heater in the animal house. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

maintain the animal house temperature higher than the outside temperature, new experiments were performed to analyse other parameters, as visceral adiposity (experiments 2 and 3, data not shown). For these experiments, the animals were fed the same diet offered to

animals in the first experiment.

The external temperature average for experiment 2 was 29.6°C , and the average temperature of the animal house was 30.9°C (Supplementary Fig. S1c). As in experiment 1, there was a significant difference between the feed intake of the CTRL group (8.97 ± 1.97 g/day/animal) and the HSB group (7.49 ± 0.23 g/day/animal) ($P<0.05$). No difference was observed in water consumption (data not shown). In this experiment, the HSB group had significantly different weights at the 38th day ($P<0.01$) of the experiment, and the experiment was extended for 30 days more, to analyze possible biochemical and haematological alterations, and the weights difference between the two groups remained significantly different ($P<0.01$).

Two animals from the HSB group died during the experimentation period. Therefore, the weight and visceral adiposity values for this group were measured on the 68th day for four animals. Nevertheless, the obesity had been established with significant differences between the HSB and CTRL groups as demonstrated on both parameters, final weight (Supplementary Fig. S2a) and visceral adiposity (Supplementary Fig. S2b).

In experiment 2, the HSB group had elevated levels of triglycerides ($P<0.001$; Supplementary Fig. S3a) and cholesterol ($P<0.01$; Supplementary Fig. S3b) within 38 days, which remained the case until the end of the experiment. Blood glucose levels were significantly lower in the CTRL group at the 38th day ($P<0.01$), but this did not continue through the end of the experiment. The glucose levels remained within the reference values for hamsters, and no difference was observed at the 68th day (Supplementary Fig. S3c).

The HSB group of experiment 2 had increased WBC cells from the 38th day until the end of the experiment in animals fed the high sugar and butter diet ($P<0.01$; Supplementary Fig. S4a). On the 38th day, we observed an increase in neutrophils and monocytes ($P<0.01$; Supplementary Fig. S4b and $P<0.001$; Supplementary Fig. S4d, respectively). However, on the 68th day, we observed a decline of these cells and a predominance of lymphocytes ($P<0.01$) in the blood of animals from the HSB group (Supplementary Fig. S4c).

As previously mentioned, experiment 2 had two deaths from the HSB group at 50 and 59 days, and it was observed that these animals had an excessive increase in leukocyte numbers, with values of 24,800 and 23,560 leukocyte/ mm^3 for each animal.

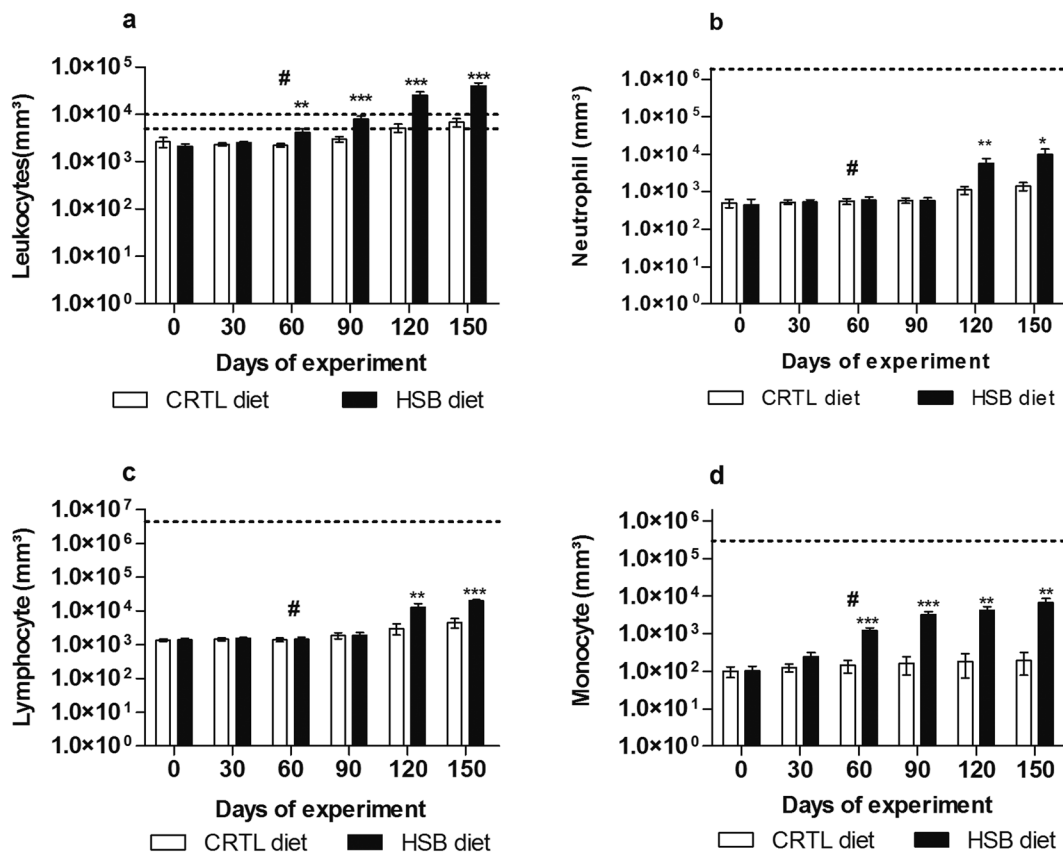


Fig. 3. Total and differential leukocyte counts. (a) Leukocytes per mm³ of blood. (b) Neutrophils per mm³ of blood. (c) Lymphocytes per mm³ of blood. (d) Monocyte per mm³ of blood. Hamsters fed the AIN 93 M diet (CTRL, n=6) and hamsters fed the high sugar and butter diet (HSB, n=6 or 4). # beginning of heater use in the animal house. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$. The data are shown as the mean \pm standard deviation.

Discussion

The main genesis of obesity in humans is due to the ingestion of a high fat and high sugar diet. Considering that obesity represents a serious global problem, the establishment of experimental models that can be extrapolated to human's physiological conditions is crucial. Different strategies have been used to establish animal's models to study obesity, as an example by lesion of the medial hypothalamus region that is responsible for satiety [40]. However, in most of the situations the induced obesity does not results in an ideal model of study, because the parameters that are altered by high fat and high sugar diet could not be achieved. In this work, a clinical condition of obesity was established in a hamster model using a high sugar and butter diet and high temperatures.

The influence of temperature observed in experiment 1 demonstrates that temperature needs to be under close surveillance when inducing obesity in hamsters. Accord-

ing to Wade and Bartness [50], it is harder to induce obesity in hamsters in seasons other than summer, corroborating our data. The difficulty on the development of obesity induction protocols is because these animals have a distinct metabolism: they can hibernate at any time of year according to the environmental conditions, which may influence weight gain [4, 22, 27]. It was also observed a behavior of dominance and stress, to all groups. This behavior is common in models maintained in group. However, the animals from the HSB group exhibited an extremely aggressive behavior and cage dominance, preventing weight gain for the other animals. The stress and aggressiveness observed in obese animals can lead to an increase in cortisol levels, causing various physiological changes in the body. Recent studies have demonstrated the involvement of the 11 β -HSD1 enzyme (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1) in the activation of cortisol in adipose tissue and its relation to the development of obesity and insulin resistance, as corti-

sol is an insulin-antagonistic [21, 35].

Experiment 1 covered three seasons (fall, winter and spring), with a natural temperature average of 25.7°C throughout the period. Unlike other studies described in the literature [5, 24], that reported the induction of obesity in hamsters at temperatures below 25°C, hamsters in this study only reached obesity after the introduction of a heater into the animal house that increased the temperature by 5.2°C (25.1°C to 30.3°C). These results were replicated in experiment 2 (supplementary data). These data corroborate the results of Zhao [56], which indicated that temperature was an essential factor in the accumulation of fat in hamsters. Cannon and Nedergaard [8] observe that the ideal temperature for housing rodents would be 30°C because, this is a zone of thermal neutrality to these animals, with results that can be compared to the humans thermal neutrality zone. The work done by Zhang *et al.* [57] has shown that the activity of the mitochondria at a temperature of 30°C is lower in hamsters, thus reducing thermogenesis. The consumption of a hyperlipid diet, leads to an increase in oxidative stress, resulting in the elevation of free fatty acids, hyperglycemia and postprandial hypertriglyceremia [14]. These factors are responsible for the elevation of reactive oxygen species, formation of superoxide anion and production of proinflammatory cytokines [10]. Apparently, increased oxidative stress decreases the activity of the uncoupling protein 1 (UCP1), present in brown adipose tissue besides being involved in mechanisms that aggravate morbidity in obese individuals [57]. Although brown adipose tissue is present mainly in newborn humans, it is known to be of some importance for adults and its metabolism is conditioned by changes in temperature, mainly when it drop off, and that is associated with weight loss. However, the interruption of the cold exposure due to the increase of the temperature on internal environments, leads to the weight gain and thermogenesis decreases [29].

In experiment 3 (data not shown), performed during winter and spring, even using the heater, the temperature was not increased above 28.8°C and, even after 150 days, we were unable to induce obesity in the animals. Coherently with the results found on the two previous experiments, where obesity was accompanied by biochemical and haematological changes, no such alterations were detected in this experiment to any of the evaluated parameters. This can be explained by the fact that with higher temperature, animals required less energy to keep

their body temperature, resulting in a positive energy balance [49]. Kodama and Pace [25] showed that the decrease in temperature decreased the accumulation of body fat in hamsters, as observed in this study, and the narrow temperature variation range (30.3°C and 30.9°C in experiments 1 and 2, respectively, to 28.8°C, in experiment 3, Supplementary Fig. S1e) may be indicative that the temperature for Syrian hamsters is really a determining factor for the induction of obesity. Although the present study did not induce obesity in a temperature equal or lower than 28.8°C, other studies have demonstrated induction of obesity in experimental models at a temperature lower than the one established in this work [8, 49]. However, these studies did not characterize the season in which the experiments were conducted. Meisel *et al.* [31] showed that obesity induction is influenced by the way animals are housed, showing that female hamsters housed in groups exhibited greater adiposity than individually housed animals. The grouping of animals leads to an increase in temperature, reducing the energy expenditure necessary to maintain body temperature, which results in a positive energy balance. Moreover, the grouping may cause stress to the animals because hamsters live alone under natural conditions [6, 18]. Foster *et al.* [15] found that hamsters subjected to stress showed statistically increased food intake, weight gain and adiposity. Given that animals in this study were housed in groups, this may have favoured the weight gain for both the HSB group and the CTRL group. In our experiments, the animals from the HSB group ingested a smaller amount of food when compared to animals from the CTRL group, which demonstrated that the gain in weight and visceral fat were not caused by hyperphagia but by the high calorie modified diet. These data are similar to those found by Ramirez [36]. On the other hand, the volume of water was not different for the CTRL and HSB groups in any of the experiments, contrary to the findings, of Townsend *et al.* [48] in an experiment using mice.

Carbohydrates are a major source of energy for the functioning of the body. However, excessive consumption of carbohydrates, causes the expansion of adipose tissue, hyperglycemia and increased cholesterol [7, 9, 43, 55], whereas the exaggerated consumption of fat also produces these changes and promotes non-alcoholic fatty liver disease [17]. Furthermore, it has been demonstrated that the type of ingested carbohydrate correlates to the degree of inflammation intensity and with

the outcome of cardiovascular diseases [17]. This fact is related to the speed that the body absorb each type of carbohydrate influencing the ability to raise the glycemic index. Although the relationship between inflammation and the intake of carbohydrates is still obscure [20], evidence indicates a possible change of pro-inflammatory cytokines [19]. The high fat diet is a more natural way to induce obesity and is able to cause alterations of the biochemical parameters in experimental models [9, 23, 33].

Studies have shown the association of hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia with obesity, indicating that the increased levels of these molecules is related to predisposition to heart disease [2, 37, 41, 44]. The consumption of a diet high in fat and simple carbohydrates interferes with fat absorption because sugar presents the capacity of increases lipid storage on the enterocytes and of stimulate the secretion of chylomicrons [32]. As a hormonally active tissue, visceral adipose tissue releases different bioactive molecules and hormones that are able to interact with the immune system of the individual, interfering in many pathologic processes.

Many authors have reported an increase in white blood cells, triglycerides and body mass index in obese individuals, relating these results to the inflammation seen in obesity. Whereas the inflammatory response is associated with an increase in macrophages, other cell types are involved in the inflammation mechanism of the adipose tissue, such as neutrophils, mast cells, B lymphocytes and T lymphocytes [13, 38, 45, 51]. These results corroborate the results found in the present study in which leucocytosis was induced with an increase in lymphocytes, monocytes, and neutrophils. Neutrophils play an important role in the inflammatory response and in the recruitment of macrophages [46]. They also have the ability to respond to inflammatory stimuli and are the first cells to arrive at the site of inflammation [1].

In conclusion, this study showed that the temperature and the season influence the obesity establishment in Syrian-hamsters using a diet with high simple carbohydrates and lipids. The temperature above 30°C provides the ideal conditions for establishment of obesity in this model. Furthermore, the change in the type of food caused haematological and biochemical changes, similar to what is observed in human obesity, and provided evidence of inflammation in hamsters fed with HSB diet (obese animals).

Acknowledgments

This work was supported by CAPES – Process number: 23038.005297/2011–39, FAPEMIG – Process number: APQ 02456–12 and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG. SRCD was supported by Universidade Estácio de Sá (Estácio/UNESA). EMR was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

References

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S.H.I.V. 2016. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
2. Austin, M.A., Hokanson, J.E., and Edwards, K.L. 1998. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.* 81:(4A): 7B–12B. [Medline] [CrossRef]
3. Baharia, R.K., Tandon, R., Sahasrabudhe, A.A., Sundar, S., and Dube, A. 2014. Nucleosomal histone proteins of *L. donovani*: a combination of recombinant H2A, H2B, H3 and H4 proteins were highly immunogenic and offered optimum prophylactic efficacy against *Leishmania* challenge in hamsters. *PLoS One* 9: e97911. [Medline] [CrossRef]
4. Barabino, D.J. and Dybowski, C. 1992. Nuclear magnetic resonance of hydrogen sorbed by powdered palladium metal and alumina-supported palladium. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 1: 5–12. [Medline] [CrossRef]
5. Bhatena, J., Kulamarva, A., Martoni, C., Urbanska, A.M., Malhotra, M., Paul, A., and Prakash, S. 2011. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 4: 195–203. [Medline]
6. Brain, P.F. 1972. Effects of isolation/grouping on endocrine function and fighting behavior in male and female golden hamsters. (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Behav. Biol.* 7: 349–357. [Medline] [CrossRef]
7. Browning, J.D., Baker, J.A., Rogers, T., Davis, J., Satapati, S., and Burgess, S.C. 2011. Short-term weight loss and hepatic triglyceride reduction: evidence of a metabolic advantage with dietary carbohydrate restriction. *Am. J. Clin. Nutr.* 93: 1048–1052. [Medline] [CrossRef]
8. Cannon, B. and Nedergaard, J. 2009. Thermogenesis challenges the adipostat hypothesis for body-weight control. *Proc. Nutr. Soc.* 68: 401–407. [Medline] [CrossRef]
9. Chang, J.S., Chen, Y.C., Owaga, E., Palupi, K.C., Pan, W.H., and Bai, C.H. 2014. Interactive effects of dietary fat/carbohydrate ratio and body mass index on iron deficiency anemia among Taiwanese women. *Nutrients* 6: 3929–3941. [Medline] [CrossRef]
10. Choi, S.W., Benzie, I.F.F., Ma, S.W., Strain, J.J., and Hannigan, B.M. 2008. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic. Biol. Med.* 44: 1217–1231. [Medline] [CrossRef]
11. Diniz, Y.S., Burneiko, R.M., Seiva, F.R., Almeida, F.Q., Galhardi, C.M., Filho, J.L., Mani, F., and Novelli, E.L. 2008. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int. J. Cardiol.* 124: 92–99. [Medline] [CrossRef]
12. Ebihara, H., Zivcec, M., Gardner, D., Falzarano, D., LaC-

- asse, R., Rosenke, R., Long, D., Haddock, E., Fischer, E., Kawaoka, Y., and Feldmann, H. 2013. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 207: 306–318. [Medline] [CrossRef]
13. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N., and Levy, R. 2008. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* 49: 1894–1903. [Medline] [CrossRef]
 14. Esposito, K. and Giugliano, D. 2006. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *Eur. Heart J.* 27: 15–20. [Medline] [CrossRef]
 15. Foster, M.T., Solomon, M.B., Huhman, K.L., and Bartness, T.J. 2006. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R1284–R1293. [Medline] [CrossRef]
 16. Gad, S.C. 2007. *Animal Models in Toxicology*, 2nd ed. London, New York.
 17. Gao, M., Ma, Y., and Liu, D. 2015. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One* 10: e0119784. [Medline] [CrossRef]
 18. Germann, P.G., Kohler, M., Ernst, H., Baumgart, H., and Mohr, U. 1990. The relation of amyloidosis to social stress induced by crowding in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Z. Versuchstierkd.* 33: 271–275. [Medline]
 19. Goletzke, J., Buyken, A.E., Joslowski, G., Bolzenius, K., Remer, T., Carstensen, M., Egert, S., Nöthlings, U., Rathmann, W., Roden, M., and Herder, C. 2014. Increased intake of carbohydrates from sources with a higher glycemic index and lower consumption of whole grains during puberty are prospectively associated with higher IL-6 concentrations in younger adulthood among healthy individuals. *J. Nutr.* 144: 1586–1593. [Medline] [CrossRef]
 20. Greenwood, D.C., Threapleton, D.E., Evans, C.E., Cleghorn, C.L., Nykjaer, C., Woodhead, C., and Burley, V.J. 2013. Glycemic index, glycemic load, carbohydrates, and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 36: 4166–4171. [Medline] [CrossRef]
 21. Hewagalamulage, S.D., Lee, T.K., Clarke, I.J., and Henry, B.A. 2016. Stress, cortisol, and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying individuals prone to obesity. *Domest. Anim. Endocrinol.* 56:(Suppl): S112–S120. [Medline] [CrossRef]
 22. Hoffman, R.A., Hester, R.J., and Towns, C. 1965. Effect of light and temperature on the endocrine system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Comp. Biochem. Physiol.* 15: 525–533. [Medline] [CrossRef]
 23. Im, J.Y., Ki, H.H., Xin, M., Kwon, S.U., Kim, Y.H., Kim, D.K., Hong, S.P., Jin, J.S., and Lee, Y.M. 2015. Anti-obesity effect of *Triticum aestivum* sprout extract in high-fat-diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79: 1133–1140. [Medline] [CrossRef]
 24. Kim, H., Bartley, G.E., Arvik, T., Lipson, R., Nah, S.Y., Seo, K., and Yokoyama, W. 2014. Dietary supplementation of chardonnay grape seed flour reduces plasma cholesterol concentration, hepatic steatosis, and abdominal fat content in high-fat diet-induced obese hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 62: 1919–1925. [Medline] [CrossRef]
 25. Kodama, A.M. and Pace, N. 1964. Effect of environmental temperature on hamster body fat composition. *J. Appl. Physiol.* 19: 863–867. [Medline]
 26. Krelstein, M.S., Thomas, M.P., and Horowitz, J.M. 1990. Thermal effects on long-term potentiation in the hamster hippocampus. *Brain Res.* 520: 115–122. [Medline] [CrossRef]
 27. Lewis, C.J., Becker, J.J., Manis, A.D., Hamilton, J.S., Horowitz, J.M., and Horowitz, B.A. 2012. Neuroprotection supports signal processing in the hippocampus of Syrian hamsters, a facultative hibernator. *Neurosci. Lett.* 520: 20–25. [Medline] [CrossRef]
 28. Maioli, T.U., Gonçalves, J.L., Miranda, M.C.G., Martins, V.D., Horta, L.S., Moreira, T.G., Godard, A.L., Santiago, A.F., and Faria, A.M. 2016. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm. Res.* 65: 169–178. [Medline] [CrossRef]
 29. Mavrogianni, A., Johnson, F., Ucci, M., Marmot, A., Wardle, J., Oreszczyk, T., and Summerfield, A. 2013. Historic variations in winter indoor domestic temperatures and potential implications for body weight gain. *Indoor Built Environ.* 22: 360–375. [Medline] [CrossRef]
 30. Meigs, J.B. 2010. Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009. *Diabetes Care* 33: 1865–1871. [Medline] [CrossRef]
 31. Meisel, R.L., Hays, T.C., Del Paine, S.N., and Luttrell, V.R. 1990. Induction of obesity by group housing in female Syrian hamsters. *Physiol. Behav.* 47: 815–817. [Medline] [CrossRef]
 32. Morgantini, C., Xiao, C., Dash, S., and Lewis, G.F. 2014. Dietary carbohydrates and intestinal lipoprotein production. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17: 355–359. [Medline] [CrossRef]
 33. Ouchfoun, M., Eid, H.M., Musallam, L., Brault, A., Li, S., Vallerand, D., Arnason, J.T., and Haddad, P.S. 2016. Labrador tea (*Rhododendron groenlandicum*) attenuates insulin resistance in a diet-induced obesity mouse model. *Eur. J. Nutr.* 55: 941–954. [Medline] [CrossRef]
 34. Pacanaro, C.P., Dias, S.R., Serafim, L.R., Costa, M.P., Aguiar, E., Paes, P.R., Alvarez-Leite, J.I., and Rabelo, E.M. 2014. Evaluation of biochemical, hematological and parasitological parameters of protein-deficient hamsters infected with *Ancylostoma ceylanicum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8: e3184. [Medline] [CrossRef]
 35. Park, S.Y., Bae, J.H., and Cho, Y.S. 2014. Cortisone induces insulin resistance in C2C12 myotubes through activation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and autocrinal regulation. *Cell Biochem. Funct.* 32: 249–257. [Medline] [CrossRef]
 36. Ramirez, I. 1990. Does dietary hyperphagia contradict the lipostatic theory? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14: 117–123. [Medline] [CrossRef]
 37. Rapp, R.J. 2002. Hypertriglyceridemia: a review beyond low-density lipoprotein. *Cardiol. Rev.* 10: 163–172. [Medline] [CrossRef]

38. Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. 2008. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes.* 32: 451–463. [Medline] [CrossRef]
39. Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939–1951. [Medline]
40. Rowland, N.E., Miceli, M.O., Malsbury, C.W., Baile, C.A., Della-Fera, M.A., Gingerich, R.L., and Caputo, F.A. 1986. Medial hypothalamic lesions in Syrian hamsters: characterization of hyperphagia and weight gain. *Physiol. Behav.* 36: 513–521. [Medline] [CrossRef]
41. Sacks, F.M. 2001. The relative role of low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in coronary artery disease: evidence from large-scale statin and fibrate trials. *Am. J. Cardiol.* 88:(12A): 14N–18N. [Medline] [CrossRef]
42. Safronetz, D., Ebihara, H., Feldmann, H., and Hooper, J.W. 2012. The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 95: 282–292. [Medline] [CrossRef]
43. Saleh, J., Sniderman, A.D., and Cianflone, K. 1999. Regulation of Plasma fatty acid metabolism. *Clin. Chim. Acta* 286: 163–180. [Medline] [CrossRef]
44. Sposito, A.C., Mansur, A.P., Maranhão, R.C., Martinez, T.R.L., Aldrighi, J.M., and Ramires, J.A.F. 2001. Triglyceride and lipoprotein (a) are markers of coronary artery disease severity among postmenopausal women. *Maturitas* 39: 203–208. [Medline] [CrossRef]
45. Strissel, K.J., DeFuria, J., Shaul, M.E., Bennett, G., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. 2010. T-cell recruitment and Th1 polarization in adipose tissue during diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1918–1925. [Medline] [CrossRef]
46. Talukdar, S., Oh, D.Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M.B., and Olefsky, J.M. 2012. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* 18: 1407–1412. [Medline] [CrossRef]
47. Thomas, T.R., Pellechia, J., Rector, R.S., Sun, G.Y., Sturek, M.S., and Laughlin, M.H. 2002. Exercise training does not reduce hyperlipidemia in pigs fed a high-fat diet. *Metabolism* 51: 1587–1595. [Medline] [CrossRef]
48. Townsend, K.L., Lorenzi, M.M., and Widmaier, E.P. 2008. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine* 33: 176–188. [Medline] [CrossRef]
49. Wade, G.N. 1983. Dietary obesity in golden hamsters: reversibility and effects of sex and photoperiod. *Physiol. Behav.* 30: 131–137. [Medline] [CrossRef]
50. Wade, G.N. and Bartness, T.J. 1984. Seasonal obesity in Syrian hamsters: effects of age, diet, photoperiod, and melatonin. *Am. J. Physiol.* 247: R328–R334. [Medline]
51. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112: 1796–1808. [Medline] [CrossRef]
52. Winzell, M.S. and Ahrén, B. 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53:(Suppl 3): S215–S219. [Medline] [CrossRef]
53. Woods, S.C., Seeley, R.J., Rushing, P.A., D'Alessio, D., and Tso, P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 133: 1081–1087. [Medline]
54. World Health Organization (WHO) Obesity and overweight. WHO, Fact sheet 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
55. Yanai, H., Katsuyama, H., Hamasaki, H., Abe, S., Tada, N., and Sako, A. 2015. Effects of dietary fat intake on HDL metabolism. *J. Clin. Med. Res.* 7: 145–149. [Medline] [CrossRef]
56. Zhao, Z.J. 2011. Serum leptin, energy budget, and thermogenesis in striped hamsters exposed to consecutive decreases in ambient temperatures. *Physiol. Biochem. Zool.* 84: 560–572. [Medline] [CrossRef]
57. Zhang, J.Y., Zhao, X.Y., Wang, G.Y., Wang, C.M., and Zhao, Z.J. 2016. Food restriction attenuates oxidative stress in brown adipose tissue of striped hamsters acclimated to a warm temperature. *J. Therm. Biol.* 58: 72–79. [Medline] [CrossRef]