

Camila Pereira de Queiroz

**As influências metabólicas e imunológicas da infecção
helmíntica nos estágios iniciais de desenvolvimento de
obesidade experimental**

Belo Horizonte,

Minas Gerais - Brasil

Junho - 2021

Camila Pereira de Queiroz

**As influências metabólicas e imunológicas da infecção
helmíntica nos estágios iniciais de desenvolvimento de
obesidade experimental**

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago

**Tese submetida ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e
Imunologia**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Junho - 2021

043

Queiroz, Camila Pereira de.

As influências metabólicas e imunológicas da infecção helmíntica nos estágios iniciais de desenvolvimento de obesidade experimental [manuscrito] / Camila Pereira de Queiroz. - 2021.

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

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Nematospiroides dubius. 3. Metabolismo. 4. Inflação. 5. Sistema Imunológico. I. Santiago, Helton da Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE CAMILA PEREIRA DE QUEIROZ.

Ao um dia do mês de junho de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma Google Meet no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "As influências metabólicas e imunológicas da infecção helmíntica nos estágios iniciais de desenvolvimento de obesidade experimental", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Edenil Costa Aguilar (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jeffrey M Bethony (George Washington University), aprovada; Dr. José Carlos Alves (Universidade de São Paulo - Rib. Preto), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de junho de 2021.

Dr. Edenil Costa Aguilar (UFMG)

Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)

Dr. Jeffrey M Bethony (George Washington University)

Dr. José Carlos Alves (Universidade de São Paulo - Rib. Preto)

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

Dedico este trabalho a minha ansiedade, para
que seja uma constante lembrança de que eu
sou mais forte do que ela.

AGRADECIMENTOS

E é chegado aquele momento da tese que sentimentos valem mais do que entendimento. E eu tenho tantos, e eles são tão confusos que talvez você meu caro leitor se pergunte mais de uma vez o que você está fazendo aqui. Mas tenha paciência que já já a gente vai pra ciência.

No final dessa mesma sessão da minha dissertação eu disse: “E que venha o doutorado!”. Mal sabia eu que na velocidade em que ele veio ele também estaria indo embora. E ao mesmo tempo ufa, ainda bem que ele está indo embora, porque só eu sei a importância que fechar esta etapa tem na minha vida. Hoje depois de muito reclamar e gritar a quatro cantos que não daria conta, sou imensamente grata ao universo, que me proporcionou essa oportunidade, esses encontros, desencontros, aprendizados e mudanças. Sou grata as agências de fomento, em especial a CAPES, que persistiu com o financiamento da minha bolsa, no Brasil e nos EUA, e de tantos outros bolsistas mesmo em tempos tão difíceis. E nós sabemos que sem financiamento não há como existir ciência, e sem ciência não há progresso. E para mim não haveria ciência se não fosse por ele, o professor Helton da Costa Santiago. Aquele a quem eu devo a minha vida científica. Aquele que demorou um pouco a me dar crédito, mas que depois da fase de teste não mediu esforços para que eu conquistasse o que eu quisesse. Aquele que poderia sim ter liberado um pouco mais de dinheiro para o meu projeto, mas que lutou por mais de um ano para me despachar, com passagem de volta é claro, para NY. Aquele que secou minhas lágrimas infinitas, e disse mil vezes “Camila, não é possível que você pensa isso de você”. Aquele que se algum dia precisar de ajuda eu não medirei esforços para estar lá. Adicional ao senhor Helton, eu queria deixar aqui meu coração a sua digníssima esposa, Ester Roffê. A Ester que para mim não é esposa do Helton, mas sim uma amiga improvável. Com ela eu aprendi que não se pode julgar um livro pela capa, que os dois lados de cada história devem ser considerados e que sonhos estão aí para serem alcançados, mesmo que você não saiba qual ele seja. Além de ter

muito orgulho de ser sua amiga, eu sou imensamente grata a todas as vezes que você pegou na minha mão e disse: “Você vai conseguir e vai ficar feliz por isso”. E dizem que nessa vida quem tem amigos tem tudo e mais uma vez sou obrigada a concordar com o dito popular. Venho aqui então agradecer a Mari, que apesar de ser uma das pessoas mais difíceis de se trabalhar (sem ofensas), fez de tudo e mais um pouco para que o fim dessa jornada fosse tranquilo e bem-sucedido. Mari, você foi a primeira pessoa (sem contar o Lucas) que realmente se importou comigo. Que me viu antes de ver os favores que eu poderia oferecer. E por isso, mais do que tudo, serei eternamente grata e guardarei você para sempre no meu coração. E você Stephanie? Achou que eu ia esquecer de você? Jamais. Passamos por altos e baixos durante esses anos, vivenciamos momentos que eu nem gosto de lembrar, limpamos gaiolas infinitas, fizemos vários experimentos que não deram certo, mas o que mais vai ficar marcado no meu coração é o seu companheirismo. Você está sempre aqui. Para o que der e vier. E você não sabe o quanto ter você fez e faz a minha vida melhor. Por falar em melhor, it’s time for me thank my lovely “concrete jungle where dreams are made of”, because living there made me a person 1000% better than I was. I have so many things to say about you New York that my mind it’s not being able to translate into words. So I’ll just say thank you for teaching me what’s life is all about and I want you to know that I miss you so much that hurts (hope to see you soon). Let’s keep being thankful for things related to New York... Hernandez thank you for keep trying to make me a better scientist and specially for showing me that sometimes man and women are not treated the same way and that is unacceptable. Moving on to New Yorkers I would like to send my love to my family on 75 Harrison St, Staten Island. Victoria, Michael, Sylvia and Philip gave us a home when we desperately needed a house. You made our lives better in so many ways. You took care of us. You loved us. And please never forget that we love you back. Então chegamos nos finalmente para falar de família, afinal literalmente eu não existiria sem eles. Pai, mãe vocês são tão imperfeitos e me causaram tantas dores que eu ainda tento me recuperar até

hoje, mas ao mesmo tempo fizeram das tripas coração para que eu e minha irmã tivéssemos a melhor educação possível. Afinal, conhecimento é a única coisa que não podem te roubar, não é mesmo mãe?! Eu sei que eu não demonstro e que eu sou muito diferente de vocês mas eu reconheço e agradeço tudo que vocês fizeram por mim. Bárbara, miguilis, Lindsey, Buru, obrigada por compartilhar o seu crescimento comigo. Eu tenho muito orgulho de você. Não só da sua performance na escola, mas da mulher maravilhosa que eu vejo se formar a cada dia. Quero que você saiba que tudo que eu conquisto na vida é para mostrar para você que você pode fazer o que você quiser. E chegamos ao fim, a você que eu sei que está lendo isso aqui corrigindo meu português, verificando se eu estou escrevendo como eu mesma. Você que pularia até de um penhasco se eu dissesse que era a nossa melhor opção. Você que não larga minha mão há 10 anos, mesmo nos momentos que eu larguei a sua. Lu, meu Lu, amor da minha vida eu poderia te agradecer pelas horas dedicadas aos meus experimentos, pelos lanches e águas que você trouxe para a minha mesa, pelo colo, pelas discussões imunológicas, que na maioria das vezes se empacam em MHC I e II, mas se fosse assim eu deixaria de falar o mais importante. Muito obrigada Lu por ser a pessoa que nunca, nunca, em hipótese alguma deixa de acreditar em mim, especialmente nos momentos que eu não acredito. E um dia eu te prometo que vou me olhar com os olhos que você me enxerga. Saiba que cada passo que eu dou é por você, por mim e pelo Lasanha (inclusive, valeu Dr. Lasanha, por ser meu sorrisinho durante quase todo esse processo de escrita). **E é isso gente. Fecho aqui essa porta. Com um montão de gratidão e um desejo enorme de ver o que tem ali na frente.**

P.S. Aos meus outros colegas de laboratório, ao pessoal do Labin (especialmente Melissa, Edenil e Wesley) e a todos os técnicos meu sincero “valeu”. Experimento nenhum seria possível sem vocês, porque ninguém faz ciência sozinho.

força (s.f)

é ver minhas certezas desabarem e me manter de pé. é sentir o sol nascendo dentro de mim em dias nublados pela tristeza e pela insegurança. é o que me faz continuar tentando mesmo pensando que já está tudo acabado. é um sentimento abençoado pela coragem e pela esperança. É a sina de quem não aprendeu a desistir.
é a voz dentro de mim que silencia o medo.

joão doederlein
@akapoeta

RESUMO

A Hipótese da Higiene postula que a estimulação do sistema imune por uma infecção parasitária protege o hospedeiro do desenvolvimento de desordens atópicas e inflamatórias. Nos últimos anos tem-se estudado a influência de parasitos em doenças imunometabólicas, como obesidade. Isto porque o benefício da infecção advém da capacidade de modular o sistema imune o que garante não só a permanência do parasito como também diminui respostas inflamatórias no hospedeiro. O presente estudo objetivou investigar a influência da infecção por *Heligmosomoides polygyrus*, um helminto de roedores, nos estágios iniciais do desenvolvimento de obesidade e das suas consequências metabólicas. Camundongos C57BL/6 machos, livres de patógenos específicos, foram submetidos à dieta controle ou indutora de obesidade, por cinco semanas, na presença ou não de infecção. Foram analisados: ganho de peso, ingestão calórica, desenvolvimento de alterações metabólicas, inflamação e perfil de células inflamatórias no tecido adiposo. Apesar de não haver diferença na ingestão calórica entre os animais submetidos à dieta hiperlipídica, a presença da infecção foi capaz de prevenir o ganho exacerbado de peso. Este efeito não ocorre devido a espoliação do parasito já que não houve diferença de peso entre os grupos infectado e não infectado que receberam dieta controle. Além disso, a infecção foi capaz de melhorar a resposta à insulina, o acúmulo de gordura no fígado, o nível de triglicerídeos e colesterol HDL. Observamos aumento de parâmetros reguladores da inflamação, associada à obesidade, como IL10, adiponectina, e células Th2 e Tregs, bem como diminuição de Th1 e Th17. Estes efeitos estiveram associados à capacidade da infecção de modular o fenótipo das células Tregs induzindo a expressão de marcadores relacionados a produção de TGF- β (LAP) e também a ativação celular (Ox40), além de proteger a perda de funcionalidade das Tregs, induzida pela dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: *Heligmosomoides polygyrus*, metabolismo, inflação, imunorregulação

ABSTRACT

The Hygiene Hypothesis postulates that the immune system stimulation by parasitic infection can protect the host from developing atopic and inflammatory disorders. In the past few years the parasite influence in the development of immunometabolic diseases, such as obesity, has been a topic of interest within the scientific community. The beneficial effect of the infection occurs due to its capacity to modulate the immune system that enables the survival of the parasite in the host, but also modulates inflammatory responses. The present study aimed to verify the influence of the infection by *Heligmosomoides polygyrus*, a murine parasite, in early stages of obesity development and its metabolic consequences. C57BL/6 male mice, specific pathogen free, were fed control or high fat diet, for five weeks, in the presence or not of helminth infection. Weight gain, caloric intake, development of metabolic disorders, inflammation and cellular migration to the adipose tissue were evaluated. Even though no changes were observed in the caloric intake between animals fed with high fat diet, the presence of infection was able to prevent the exacerbated weight gain. This effect did not occur because of host spoliation by the parasite since there was no difference between groups infected and non-infected that received control diet. Also, the infection improved the response to insulin, fat accumulation in the liver and serum levels of triglycerides and HDL cholesterol. We could observe increase in regulatory mechanisms against obesity-associated inflammation like IL10, adiponectin, Th2 and Tregs cells, and a reduction in Th1 and Th17 infiltration in adipose tissue. These effects seemed to be associated with the ability of the infection to modulate Tregs numbers and phenotype, promoting the expression of cell surface markers associated with TGF- β production (LAP), and cell activation (Ox40), and also by protecting the loss of function by these cells, induced by the high fat diet.

Keywords: *Heligmosomoides polygyrus*, metabolism, inflammation, immunoregulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão esquemática do modelo de <i>counter-regulatory feedback</i>	19
Figura 2: Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em adultos, no ano de 2016.....	24
Figura 3: Prevalência mundial de sobrepeso em crianças, entre 2 e 4 anos, no ano de 2016..	25
Figura 4: Desenho experimental utilizado ao longo do presente estudo	33
Figura 5: Estratégia de <i>gate</i> painel Caracterização de Linfócitos T	47
Figura 6: Estratégia de <i>gate</i> painel Caracterização das células T reguladoras	48
Figura 7: Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> atenua o ganho de peso em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica por cinco semanas, apesar de não alterar o consumo calórico	55
Figura 8: Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> e dieta hiperlipídica não alteram parâmetros associados ao estado nutricional de camundongos C57BL/6	57
Figura 9: Ciclo de vida do <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	60
Figura 10: Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> previne disfunções metabólicas associadas às células β -pancreáticas mesmo após administração de dieta hiperlipídica.....	61
Figura 11: Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> exerce papel crítico durante a administração de dieta hiperlipídica, evitando alterações morfológicas no fígado, bem como melhorando parâmetros séricos associados ao metabolismo lipídico	64
Figura 12: Infecção por <i>Heligmosomoides polygyrus</i> aumenta a secreção de adipocitocinas anti-inflamatórias, apesar de manter inalterada a produção das inflamatórias	66
Figura 13: Infecção helmíntica altera o infiltrado inflamatório do tecido adiposo durante alimentação com dieta hiperlipídica, diminuindo a migração de células tipicamente inflamatórias Th1 e Th17, e aumentando a de Th2	73
Figura 14: Infecção helmíntica impede a redução de células reguladoras no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica	74

Figura 15: Infecção helmíntica induz a expressão de LAP e CD134 nas Tregs residentes no tecido adiposo, o que pode estar associado às melhorias metabólicas e inflamatórias observadas anteriormente..... 79

Figura 16: Infecção por *H. polygyrus* evita perda de função das células Tregs, residentes no tecido adiposo, ocasionada pela alimentação com dieta indutora de obesidade..... 82

Figura 17: Modelo hipotético representando os potenciais mecanismos pelos quais *Heligmosomoides polygyrus* modula o ganho de peso e o metabolismo do hospedeiro . 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição energética (% do valor calórico total – VCT) das dietas AIN-93M e Dieta Indutora de Obesidade (DIO).....	33
Tabela 2: Anticorpos utilizados no painel Caracterização de Linfócitos T, de acordo com o fluorocromo e o tipo de marcação (extra ou intracelular).....	45
Tabela 3: Anticorpos utilizados no painel Caracterização de células T reguladoras, de acordo com o fluorocromo e o tipo de marcação (extra ou intracelular).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acaca	<i>Acetyl-CoA Carboxylase Alpha</i>
Acly	<i>ATP Citrate Lyase</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
Arg	Arginase 1
BSA	<i>Bovine Albumin Serum</i> – Soro Fetal Bovino
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	<i>C-C Motif Chemokine Ligand</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
DIO	Dieta indutora de obesidade
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTPA	<i>Diethylenetriaminepentaacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
Fasn	<i>Fatty acid synthase</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FSC	<i>Forward scatter</i>

Fxr	<i>Farnesoid X receptor</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostatic model assessment for insulin resistance</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
IKK	<i>Inhibitor of κ kinase</i>
ILC	<i>Innate Lymphoid Cell</i> – Célula Linfóide inata
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> – Fator regulador de interferon
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
JNK	c-jun N-terminal kinase
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i> - Vírus da coriomeningite linfocítica
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LDV	<i>Lactate dehydrogenase elevating virus</i> – Vírus Elevador do Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MFI	<i>Mean Fluorescent Intensity</i> – Intensidade Média de Fluorescência
NOD	<i>Nonobese diabetic</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato-salino
PD	<i>Programmed death</i>
PDL	<i>Programmed death-ligand</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato

PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Raldh	<i>Retinaldehyde dehydrogenase</i>
rpm	Rotações por minuto
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tecido Adiposo Epididimal
TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
Teft	T efetoras
TGF	<i>Transforming growth factor</i> – Fator de transformação do crescimento
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladoras
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopietin</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCT	Valor calórico total
VLDL	<i>Verry low-density lipoprotein</i> – Lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. ANIMAIS E DIETAS.....	32
3.2. DESENHO EXPERIMENTAL	33
3.3. PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	34
3.4. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	35
<i>Albumina</i>	35
<i>Proteínas Totais</i>	36
3.5. TESTE DE SENSIBILIDADE À INSULINA	36
3.6. TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE	37
3.7. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO ASSOCIADO AO METABOLISMO HEPÁTICO.....	37
<i>Triglicerídeos</i>	37
<i>Colesterol Total e HDL</i>	38
3.8. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS POR FOLCH.....	39
3.9. ISOLAMENTO DE ADIPÓCITOS E DE CÉLULAS DA FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL.....	40
3.10. CULTURA DE CÉLULAS ESTROMAIS E ADIPÓCITOS.....	41
3.11. CYTOMETRIC BEAD ARRAY	41
3.12. ELISA	42
3.13. CITOMETRIA DE FLUXO.....	44
3.14. ENSAIO FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULADORAS.....	49
3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. A INFEÇÃO POR <i>HELIGMOSOMOIDES POLYGYRUS</i> ATENUA O GANHO DE PESO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA	52
4.2. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO ESTADO NUTRICIONAL SÃO MANTIDOS INALTERADOS TANTO NA PRESENÇA DE INFEÇÃO QUANTO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE OBESIDADE	56

4.3.	INFECÇÃO POR <i>H. POLYGYRUS</i> PREVINE O INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS RESULTANTES DA DIETA HIPERLIPÍDICA.....	60
4.4.	ASSOCIAÇÃO ENTRE INFECÇÃO POR <i>H. POLYGYRUS</i> E DIETA HIPERLIPÍDICA RESULTA EM AUMENTO DA SECREÇÃO DE ADIPOCITOCINAS REGULADORAS.....	65
4.5.	INFECÇÃO HELMÍNTICA AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS T REGULADORAS NO TECIDO ADIPOSEO, ALÉM DE EVITAR A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PARA O MESMO TECIDO DURANTE ADMINISTRAÇÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA	69
4.6.	INFECÇÃO HELMÍNTICA ASSOCIADA A DIETA INDUTORA DE OBESIDADE ALTERA A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIES DE CÉLULAS T REGULADORAS RESIDENTES NO TECIDO ADIPOSEO	75
4.7.	INFECÇÃO POR <i>H. POLYGYRUS</i> PROTEGE AS CÉLULAS TREGS DE PERDER A CAPACIDADE SUPRESSIVA INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA	80
5.	CONCLUSÃO	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

A “Hipótese da Higiene”, termo cunhado ao longo dos anos 90, postula que a frequência de infecções, especialmente durante a infância, tem correlação inversa com o desenvolvimento de doenças autoimunes e alérgicas (Bach, 2018). A primeira formulação desta hipótese apareceu na literatura em 1989, através do estudo de Strachan que investigou as possíveis causas para o aumento expressivo de rinite alérgica na população Britânica pós-revolução industrial (Strachan, 1989). Neste estudo Strachan concluiu que a probabilidade de desenvolvimento de rinite alérgica é menor quando as crianças possuem contato “não higiênico” com irmãos mais velhos. Porém, mesmo antes deste estudo, alguns artigos já demonstravam evidências da correlação inversa entre infecções diversas e o desenvolvimento de doenças autoimunes. Greenwood (1969), por exemplo, constatou baixa ocorrência de artrite reumatoide na população nigeriana e atribuiu este fato a relação com fatores ambientais, inclusive com a prevalência de infecções parasitárias (Greenwood, 1969). Para testar esta hipótese Greenwood e colaboradores (1970) estudaram o desenvolvimento de anemia hemolítica autoimune em camundongos infectados com *Plasmodium berghei yoelii*, e constataram que a infecção de fato atrasa o desenvolvimento desta doença autoimune. Apesar de confirmarem experimentalmente a hipótese os autores não analisaram os mecanismos imunológicos que poderiam explicar essa relação, apontando inclusive que o mecanismo seria apenas uma especulação (Greenwood, Herrick & Voller, 1970). Quase duas décadas mais tarde, Oldstone (1988) induziu imunossupressão, utilizando LCMV, em camundongos NOD, demonstrando que a infecção normalizava o nível de glicose sérica e também o de insulina pancreática. E já nesta época o autor sugere que vírus, bactérias, fungos ou seus produtos poderiam ser utilizados como terapia para doenças humanas (Oldstone, 1988).

Num primeiro momento, a Hipótese da Higiene foi recebida com ceticismo pela comunidade acadêmica já que o que se sabia de imunologia não era suficiente para explicar esse papel protetor das infecções (Strachan, 2000). Foi apenas quando a comunidade científica começou a encontrar fortes evidências sobre os diferentes tipos de células T auxiliares, sendo as Th1 responsivas a vírus e bactéria e as Th2 a helmintos e alergias (Romagnani, 1992), que a Hipótese da Higiene ganhou o início de uma explicação plausível. A partir deste momento vários estudos epidemiológicos (von Mutius, et al., 1994; Ball, et al., 2000; Kuehni, et al., 2007; Ege, et al., 2011) e experimentais (Takei, et al., 1992; Lynch, et al., 1993; Qin & Singh, 1997; van der Biggelaar, et al., 2000) vêm corroborando e acrescentando explicações a cerca deste assunto.

Diversos estudos epidemiológicos demonstram que o ambiente em que a criança cresce influencia na possibilidade do desenvolvimento de asma. Por exemplo, crianças que crescem em fazendas apresentam menor probabilidade de desenvolvimento da doença quando comparadas com crianças que crescem em ambientes urbanizados (Ege, et al., 2011). Não só a exposição a antígenos ambientais como também a idade em que as crianças são expostas a estes antígenos influencia no desenvolvimento de doenças respiratórias. Um estudo com meninas asiáticas que migraram para o Reino Unido antes dos 5 anos demonstrou que elas apresentaram maior índice de desenvolvimento de asma do que as crianças que realizaram este processo migratório após essa idade (Kuehni, et al., 2007). Já von Mutius e colaboradores (1994) analisaram, na população alemã recém unificada, não só a prevalência de sintomas alérgicos, como também a ocorrência de rinite alérgica e a sensibilização alérgica (por meio do *prick test*). Este estudo mostrou que crianças provenientes do oeste da Alemanha (ou Alemanha Ocidental, a parte mais desenvolvida e modernizada) apresentaram maior prevalência de todos os parâmetros analisados, e os autores atribuem este fato tanto a menor quantidade de irmãos quanto ao menor contato com outras crianças, já que apenas 8,2% destas crianças passavam o

dia em creches contra um total de 69% das crianças que cresceram no leste do país (von Mutius, et al., 1994). A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de doenças não se restringe apenas a doenças respiratórias visto que fatores como: presença de infecções, mudanças de hábito e ordem de nascimento também foram associados ao desenvolvimento de esclerose múltipla (Sewell, et al., 2002; Houzen, et al., 2012) e diabetes tipo 1 (Bodansky, et al., 1992; Cardwell, et al., 2011).

Associado ao crescimento das evidências epidemiológicas favoráveis à Hipótese da Higiene, surgiram estudos experimentais com o intuito de descrever os mecanismos imunológicos responsáveis pela inibição do desenvolvimento das doenças alérgicas e autoimunes. Num primeiro momento acreditou-se que para diminuir os efeitos maléficos das patogenicidades dependentes de Th2 e IgE, resposta associada a alergias, era necessário favorecer a polarização de Th1, que inibe a resposta Th2, logo nos estágios iniciais de desenvolvimento do sistema imune na criança (Holt, 1994). Essa vertente de pensamento era favorecida principalmente por estudos que demonstravam a inibição do desenvolvimento de doenças autoimunes na presença de infecções por vírus ou bactérias (Takei, et al., 1992; Qin & Singh, 1997). Um destes estudos demonstrou que a infecção por Vírus Elevador do Lactato Desidrogenase (LDV) suprime o desenvolvimento de diabetes tipo 1, sugerindo que de fato esta doença poderia ser suprimida por infecções virais (Takei, et al., 1992). Outro estudo demonstrou que a imunoterapia através da vacinação com BCG também prevenia o desenvolvimento de diabetes espontânea em camundongos NOD (Qin & Singh, 1997). No entanto, começaram a surgir outros estudos demonstrando que a presença de infecção por helmintos, típicos indutores de resposta Th2, também levava a uma menor probabilidade de desenvolvimento de alergias (Lynch, et al., 1993; van der Biggelaar, et al., 2000; Wang, et al., 2001), o que representava um paradoxo para a explicação existente. O simples favorecimento de Th1 em detrimento de Th2 já não fornecia evidências científicas suficientes para explicar os

benefícios de uma infecção associada a doenças alérgicas e autoimunes. Alguns trabalhos começaram a demonstrar a importância de outro componente do sistema imunológico, a citocina anti-inflamatória IL10 na supressão de atopia (King, et al., 1996; Cooper, et al., 1998; van der Biggelaar, et al., 2000). van den Biggelaar (2000), por exemplo, demonstrou que a infecção por *Schistosoma haematobium* diminui a sensibilização ao ácaro doméstico e que este efeito estaria relacionado ao aumento da secreção de IL10 (van der Biggelaar, et al., 2000). Foi a partir disso que surgiu o conceito de *counter-regulatory feedback* que sugere que a inibição no desenvolvimento de alergias e doenças autoimunes na presença de uma infecção (viral, bacteriana, helmíntica) está mais intimamente relacionada com a indução da secreção de IL10 do que com o balanço entre Th1 e Th2 (Wills-Karp, Santeliz & Karp, 2001). A IL10 é produzida tanto por células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa e ela exerce um importante papel na homeostase e no controle do processo inflamatório. Logo, a maioria das exposições a antígenos que levam a ativação da resposta imune induzem a secreção de IL10, o que de forma secundária acaba ajudando a suprimir alergias e doenças autoimunes (Fig. 1) (Wills-Karp, Santeliz & Karp, 2001).

Com o passar dos anos, os estudos que investigam Hipótese da Higiene focaram no efeito modulador e anti-inflamatório das infecções por helmintos. As infecções helmínticas estão entre as infecções mais comuns do mundo sendo que, apesar dos intensos esforços de controle, cerca de 24% da população mundial ainda apresenta infecção por algum helminto transmitido pelo solo (WHO, 2020). Majoritariamente, as infecções helmínticas são assintomáticas (Bordes & Morand, 2009; McSorley & Maizels, 2012) e estes fatos sugerem uma relação benéfica, construída ao longo da evolução, entre os parasitos e o sistema imune. Especula-se que para o parasito não era interessante induzir no hospedeiro uma forte resposta imunológica, já que ocasionaria em expulsão do mesmo, e que para o hospedeiro, uma resposta inflamatória intensa também não era benéfica, pois poderia levar ao desenvolvimento de

imunopatologias. Sendo assim, ao longo dos anos, helmintos que foram capazes de induzir respostas reguladoras (células T e B reguladoras, ativação alternativa de macrófagos, produção de IL10) no hospedeiro garantiram não só a sobrevivência das espécies, como também evitaram danos e trouxeram benefícios ao hospedeiro (Jackson, et al., 2008; Allen & Maizels, 2011; Girgis, Gundra & Loke, 2013). E é esta capacidade da presença dos helmintos de suprimir, modular e até induzir mecanismos do sistema imune que é a responsável por gerar os efeitos benéficos no contexto de doenças inflamatórias, possibilitando a utilização destes micro-organismos como prevenção/tratamento destas doenças (Fleming & Weinstock, 2015; Elliott & Weinstock, 2017; Ryan, et al., 2020).

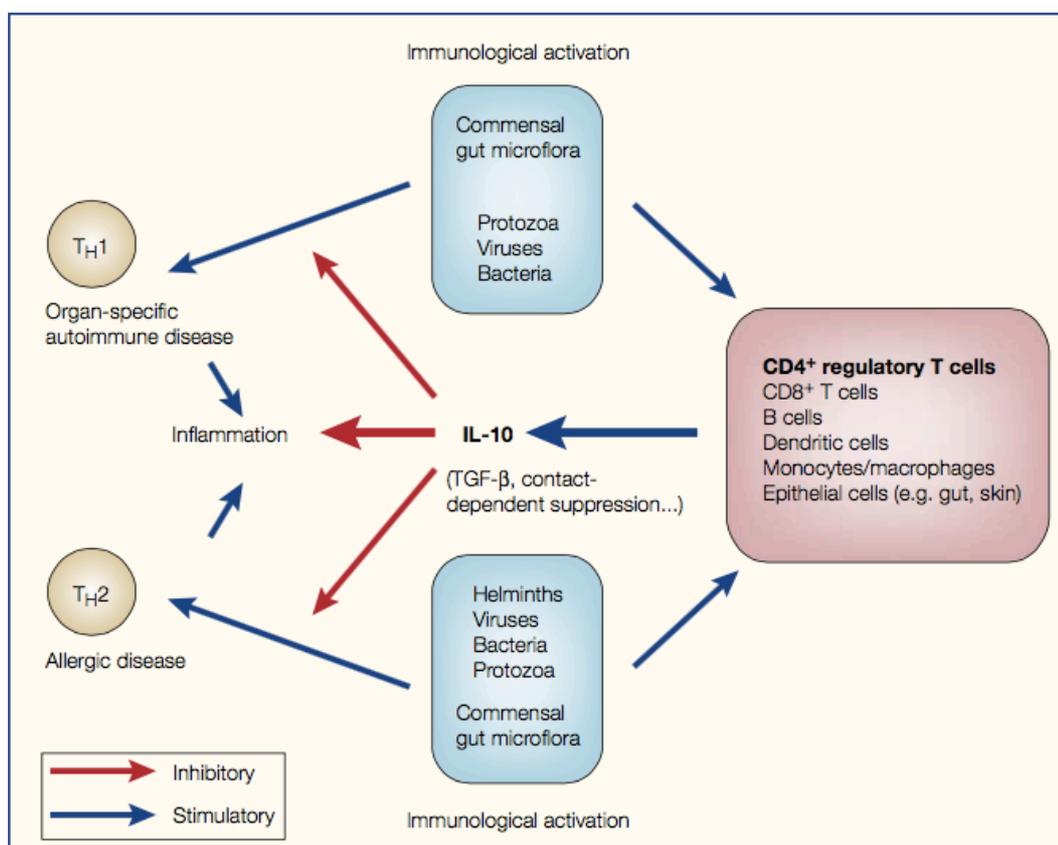


Figura 1: Visão esquemática do modelo de *counter-regulatory feedback*. Diversos estímulos que induzem a ativação imunológica, independente se forem associados a Th1 ou Th2, acabam por levar a secreção de IL10 por células do sistema imune inato e adaptativo. Esse mecanismo é essencial na regulação da inflamação, porém de forma indireta, acaba exercendo efeito benéfico no contexto de doenças secundárias, como alergia e autoimunidade. Fonte: Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL (2001).

Dentre os diversos mecanismos imunológicos, que demonstram regulação dos processos inflamatórios e diminuição da imunopatologia, mediados pela infecção, a indução de células T reguladoras (Tregs) tem sido o mais estudado ao longo dos anos (Taylor, et al., 2005; Wilson, et al., 2005; Hubner, Stocker & Mitre, 2009; Liu, et al., 2009; Grainger, et al., 2010; Metenou, et al., 2010; Layland, et al., 2013). Além das Tregs, a literatura demonstra que a infecção é capaz de induzir outros mecanismos imunológicos no hospedeiro, sendo estes mecanismos variáveis de acordo com o contexto e com o parasito. Por exemplo, *Heligmosomoides polygyrus* e suas proteínas secretadas foram descritos por induzir IL17 na presença de IL6, sem promover respostas Th1 ou Th2 (Grainger, et al., 2010), além de induzirem Tregs produtoras de TGF- β e IL10 que são responsáveis por suprimir a inflamação das vias aéreas (Wilson, et al., 2005). Considerando diabetes tipo 1 e infecção por *H. polygyrus* há aumento na secreção de IL4, IL10 e IL13, além do aumento de Tregs, o que leva a inibição do desenvolvimento da doença em camundongos NOD jovens ou a diminuição da insulite nos camundongos que já estavam em estágios mais avançados da doença (Liu, et al., 2009). Células dendríticas CD11c^{lo}, durante infecção por *H. polygyrus*, geram poucas células CD4⁺ específicas para o parasito, porém em um mecanismo dependente de ácido retinóico e TGF- β geram altas porcentagens de células Foxp3⁺ (Smith, et al., 2011). Já a infecção por *Litomosoides sigmodontis*, uma filária de camundongos, aumenta a diferenciação de células Treg CTLA4⁺ GITR^{high} independente da secreção de IL10 (Taylor, et al., 2005), além de induzir uma polarização da resposta imune para o padrão Th2, que está associado a inibição de diabetes tipo 1 (Hubner, Stocker & Mitre, 2009). Em contrapartida no estudo de filariose humana foi descrito aumento de células CD4 produzindo IL4, IL10 e IL17A e Tregs produtoras de IL10 (Metenou, et al., 2010). Uma infecção por *Schistosoma mansoni* é capaz de suprimir a inflamação das vias aéreas em um modelo experimental de asma por um mecanismo dependente de células Treg secretoras de IL10 (Layland, et al., 2013). Neste mesmo contexto, não só a ação de Tregs mas também a

secreção de IL10 por células B reguladoras CD1d^{high} foi associada a diminuição de inflamações alérgicas (van der Vlugt, et al., 2012). Adicionalmente, macrófagos M2 exercem papel importante na infecção por *S. mansoni*, já que foi demonstrado que estas células expressam Raldh2 que em um mecanismo dependente de ácido retinóico em combinação com TGF-β induzem a expressão de Foxp3 (Broadhurst, et al., 2012). A conversão de M2, identificada através da expressão de Ym1, Arg-1, TGF-β e PD-L1, também foi considerada essencial para a prevenção de diabetes tipo 1 em um tratamento com produtos excretados-secretados por *Fasciola hepatica* (Lund, et al., 2014). Porém nem todos os efeitos benéficos provêm de mecanismos dependentes de Tregs, já que em um tratamento com estes mesmos produtos de *Fasciola hepatica* foi comprovado atenuação dos sinais clínicos de encefalomielite experimental decorrentes da secreção de IL33 e IL5, que acabaram por induzir acumulação de eosinófilos (Finlay, et al., 2016). A secreção de IL33 juntamente com IL25 e TSLP também pode levar a indução de ILC2, secretoras de IL4, IL5, IL13 e Anfiregulina, que estão associadas a inibição no desenvolvimento de alergias, asma, dermatites e fibroses (Cording, et al., 2016). Outros tipos celulares menos prevalentes também podem exercer papel importante na relação infecção x doenças alérgicas/autoimunes, como é o caso das iNKTs. Estas são importantes células imunoreguladoras que aparecem em quantidade reduzida nos camundongos NOD, mas que aumentam expressivamente diante da exposição a antígenos do ovo de *S. mansoni*, e sua ação está associada a prevenção do desenvolvimento de diabetes tipo 1 (Zaccone, et al., 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que a modulação de outros parâmetros fisiológicos do hospedeiro também poderia influenciar no desenvolvimento de doenças autoimunes quando associadas à infecção. Um destes parâmetros é a composição da microbiota. Especula-se que a infecção poderia favorecer ou suprimir o crescimento de determinadas bactérias que modulam o sistema imune. Foi demonstrado que a infecção por *H. polygyrus* melhora a inflamação intestinal, sendo associada a um aumento no número de bactérias da família *Lactobacillaceae*

no íleo (Walk, et al., 2011). A presença de bactérias desta família induz no hospedeiro diversos mecanismos imunomodulatórios, como aumento de células Tregs, regulação da sinalização inflamatória, aumento na produção de defensinas e modulação de células apresentadoras de antígenos (Wells, 2011). Na doença de Crohn, a infecção por *H. polygyrus*, em um mecanismo dependente de Th2, promove o estabelecimento de uma microbiota protetora enriquecida em Clostridiales, inibindo a colonização por espécies inflamatórias de *Bacteroides*, em camundongos geneticamente susceptíveis à doença (Ramanan, et al., 2016). Essa mudança da microbiota foi observada não só em camundongos, mas também no intestino de pessoas que vivem em regiões endêmicas de infecção helmíntica (Ramanan, et al., 2016).

O efeito benéfico das infecções helmínticas não é restrito a modelos experimentais, sendo que há 15 anos têm sido realizadas pesquisas clínicas utilizando infecção controlada por *Trichuris suis* ou *Necator americanus* em doenças inflamatórias intestinais (Summers, et al., 2003; Croese, et al., 2006; Sandborn, et al., 2013), doença celíaca (Davieson, et al., 2011; Croese, et al., 2015), artrite reumatoide (Ryan, et al., 2020), esclerose múltipla (Rosche, et al., 2013; Voldsgaard, et al., 2015; Fleming, et al., 2019), psoríase (Ryan, et al., 2020), rinite alérgica (Bager, et al., 2010), asma (Feary, et al., 2010), alergia a amendoim (Fleming & Weinstock, 2015) e autismo (Fleming & Weinstock, 2015). Estes parasitos foram selecionados como modelo de infecção nas pesquisas clínicas, pois satisfazem todos os critérios de segurança e tolerabilidade para o participante (Fleming & Weinstock, 2015). *T. suis* ou verme-chicote, é um parasito suíno que infecta o intestino delgado e cécum causando uma infecção crônica, mas que também leva a uma infecção autolimitada em humanos e outros primatas (Laber & Swindle, 2002; Ryan, et al., 2020). *N. americanus* é um nematódeo transmitido pelo solo que infecta o intestino delgado humano podendo sobreviver neste ambiente por anos, já que a resposta imune sozinha não consegue eliminá-lo (Loukas, et al., 2016). Tanto o tratamento com ovos de *T. suis* quanto com larva de *N. americanus* resultaram em melhora dos pacientes com doença

inflamatória intestinal, inclusive com alta taxa de remissão da doença, sem manifestação de efeitos colaterais graves (Summers, et al., 2003; Croese, et al., 2006). Para doença celíaca, um estudo inicial demonstrou que a inoculação de 15 larvas de *N. americanus* não trazia efeitos adversos para estes pacientes, constatando a segurança da infecção apesar de não ter demonstrado melhora na tolerância ao glúten (Daveson, et al., 2011). Posteriormente, um estudo mais longo demonstrou melhora na qualidade de vida e na tolerância ao glúten em 12 adultos com doença celíaca infectados com 20 larvas de *N. americanus*, associado a diminuição na produção de IFN- γ e aumento de células Treg, (Croese, et al., 2015). Já na esclerose múltipla, o tratamento com ovos de *T. suis* por 10 meses demonstrou uma redução de 35% nas lesões ativas, além do aumento no número de células Treg, sem apresentar efeitos adversos (Fleming, et al., 2019). Apesar destes resultados bem-sucedidos, o ramo de pesquisas clínicas com infecção controlada enfrenta diversos problemas, como: dificuldade de aprovação por comitês de ética, baixo recrutamento de voluntários, desistência de voluntários (que devido ao *n* reduzido acabam por comprometer a pesquisa) e dificuldade no estabelecimento tanto da dosagem apropriada de parasito quanto no tempo de reinfecção/acompanhamento dos pacientes (o que ocasiona inconsistência de resultados mesmo em estudos que investiguem a mesma doença) (Fleming & Weinstock, 2015; Ryan, et al., 2020).

O efeito anti-inflamatório da infecção helmíntica no hospedeiro é multifatorial, e seus benefícios não são restritos a doenças alérgicas e autoimunes. Nos últimos anos tem-se demonstrado o benefício de infecções no metabolismo, principalmente daquele associado ao tecido adiposo, intestino, fígado, pâncreas e cérebro (Hotamisligil, 2017; Ryan et al., 2020). Doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, obesidade, diabetes tipo 2 e câncer são consideradas doenças imunometabólicas, o que significa que fatores que modulam o sistema imune podem influenciar no desenvolvimento das mesmas (Hotamisligil, 2017). Dentre estas doenças, os distúrbios de peso chamam a atenção pela prevalência mundial exorbitante;

atingindo 1,9 bilhões de adultos (Fig. 2), 340 milhões de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos e 38,2 milhões de crianças com até 5 anos (Fig. 3) (WHO, 2020). Além disso, sobrepeso e obesidade estão associados ao desenvolvimento de outras doenças imunometabólicas como: diabetes (Mokdad, et al., 2003), doenças cardiovasculares (Hotamisligil, 2017) e alguns tipos de câncer, que acometem fígado (Larsson & Wolk, 2007), endométrio (Fader, et al., 2009), mama (Stephenson & Rose, 2009), ovário (Olsen, et al., 2007), próstata (Freedland & Platz, 2007), rim (Pan, et al., 2006), cólon (Frezza, et al., 2006), bexiga (Larsson & Wolk, 2007). Como resultado disso, estima-se que em 2017, 4,7 milhões de pessoas morreram de forma prematura devido a obesidade (IHME, 2018). Este número é quase 4 vezes maior do que o de mortes por acidente de carro, e cinco vezes maior que o de mortes por HIV/AIDS no mesmo ano (GBD Causes of Death, 2018).

Share of adults that are overweight or obese, 2016

Being overweight is defined as having a body-mass index (BMI) greater than or equal to 25. Obesity is defined by a BMI greater than or equal to 30. BMI is a person's weight in kilograms divided by his or her height in metres squared.

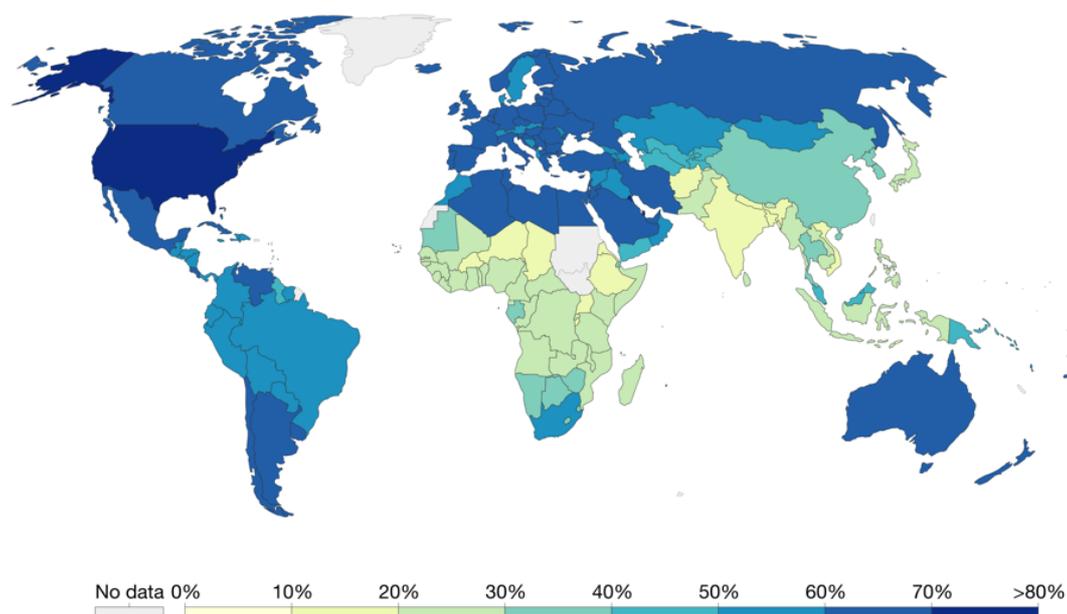


Figura 2: Prevalência mundial de sobrepeso e obesidade em adultos, no ano de 2016. A taxa de prevalência dos distúrbios de peso é indicada pela intensidade das cores, sendo que cores mais fortes (azul escuro) indicam maiores índices e cores mais brandas (amarelo claro) demonstram menores ocorrências. Fonte: WHO, Global Health Observatory.

Share of children who are overweight, 2016

Share of children aged 2-4 years old who are defined as overweight.

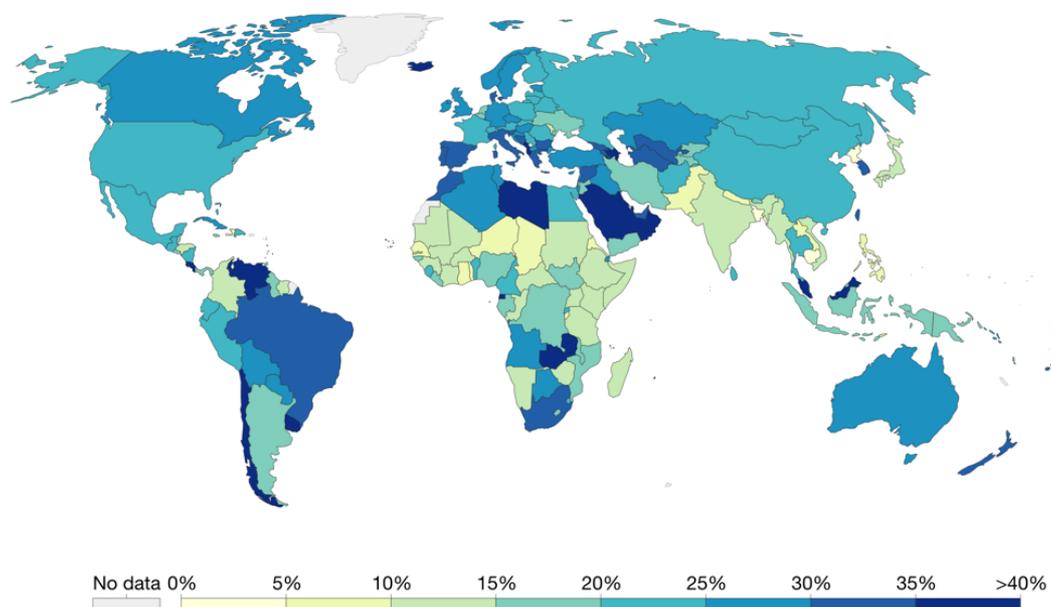


Figura 3: Prevalência mundial de sobrepeso em crianças, entre 2 e 4 anos, no ano de 2016.

A taxa de prevalência do sobrepeso é indicada pela intensidade das cores, sendo que cores mais fortes (azul escuro) indicam maiores índices e cores mais brandas (amarelo claro) demonstram menores ocorrências. Fonte: Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME).

Mas o que significa classificar a obesidade como uma doença imunometabólica? Significa que a obesidade e suas doenças associadas são iniciadas por células metabólicas (ex. adipócitos, hepatócitos, β -pancreáticas), em resposta a alterações também metabólicas (como: excesso de nutrientes, aumento de ácidos graxos livres, e acúmulo de glicose e lipídeos circulantes), a partir da indução de vias de sinalização que exercem papel chave tanto na imunidade quanto no metabolismo (Hotamisligil, 2017). Por exemplo, o excesso de nutrientes induz a ativação de citocinas ou de vias de TLRs no tecido adiposo, fígado ou células sanguíneas, que por sua vez levam a ativação das quinases IKK, JNK e PKR, downstream a suas vias. Estas três quinases induzem a fosforilação em serina do IRS-1, que resulta na inibição da sinalização de insulina, e também levam a ativação de AP-1, NF- κ B e IRF, que regulam positivamente a expressão de genes inflamatórios (Solinas & Karin, 2010; Gregor &

Hotamisligil, 2011; Hotamisligil, 2017). Já o aumento de ácidos graxos saturados induz a ativação de inflamassomas que permite a maturação de citocinas pró-inflamatórias IL1 β e IL18 por clivagem de caspase-1 (Stienstra, et al., 2010; Wen, et al., 2011). O aumento de IL1 β ativa é responsável por direcionar os adipócitos a um fenótipo mais resistente à insulina (Stienstra, et al., 2010). Além disso, os ácidos graxos saturados também são responsáveis pela ativação de células mieloides CD11c⁺ via TLR2/4, promovendo inflamação e resistência à insulina (Nguyen, et al., 2007). Dentre as células mieloides, vale destacar a importância dos macrófagos que durante o processo de ganho de peso têm seu estágio de ativação alterado, passando a expressar TNF e iNOS, sendo responsáveis por exercer papel central na inflamação e nas disfunções no metabolismo de glicose (Lumeng, Bodzin & Saltiel, 2007; Fan, et al., 2016). A inflamação estabelecida por estes mecanismos persiste ao longo do tempo e acaba por induzir a migração de diversas células imunes para o tecido adiposo, alterando a composição da fração vascular estromal (células que não são adipócitos) (Gregor & Hotamisligil, 2011). Dentre estas células migratórias é possível citar os mastócitos, que através da secreção de IL6 e IFN- γ contribuem para apoptose e angiogênese e, que por sua vez, promovem intolerância à glicose (Liu, et al., 2009). Há também aumento de linfócitos B secretando citocinas pró-inflamatórias (DeFuria, et al., 2013) acompanhado da redução de células B reguladoras produtoras de IL10 (Nishimura, et al., 2013) que também se associam ao desenvolvimento de resistência à insulina (Winer, et al., 2014). Observa-se ainda a redução de linfócitos T *naive* residentes no tecido adiposo, associado ao aumento de células T de memória, que apresentam maiores níveis de mediadores inflamatórios e menor diversidade de TCR (Yang, et al., 2010). Por fim, observa-se redução nas células Tregs que parece impactar tanto no ganho de peso, quanto no metabolismo, já que foi demonstrado que a transferência destas células para camundongos obesos é capaz de reverter o ganho de peso e a resistência à insulina em um mecanismo dependente de Th2 (Feuerer, et al., 2009; Winer, et al., 2009; Ilan, et al., 2010). Além disso, a

diminuição da população de Tregs no tecido adiposo demonstra deficiência nos mecanismos de regulação que acabam falhando em diminuir e desligar a inflamação, garantindo que ela seja mantida e reforçada por cada um dos mecanismos que a gera (Feuerer, et al., 2009). Dessa forma, observa-se o estabelecimento de uma inflamação crônica multifatorial, denominada metainflamação (Hotamisligil, 2017).

A obesidade e suas doenças associadas são provenientes principalmente da inflamação basal (Hotamisligil, 2017) e por isso é que se tem estudado o efeito de infecções helmínticas nesse contexto. Em humanos, por exemplo, a infecção por *Strongyloides stercoralis* está relacionada a um efeito protetor nos parâmetros associados à diabetes tipo 2 (ex. menor nível sérico de insulina e glucagon) (Rajamanickam, et al., 2018), sendo que indivíduos infectados têm 61% menos chance de desenvolver a doença (Hays, et al., 2015). Este efeito foi associado à eosinofilia, aumento de Th2 e Tregs, além de diminuição de citocinas de perfil Th1 e Th17 (Hays, et al., 2015; Rajamanickam, et al., 2018). Indivíduos diabéticos apresentam menores taxas de filariose em países endêmicos do que indivíduos saudáveis ou pré-diabéticos (Aravindhan, et al., 2010). Além disso, indivíduos diabéticos infectados apresentam menor nível sérico das citocinas inflamatórias IL6 e GM-CSF (Aravindhan, et al., 2010). Na China rural, a infecção prévia por *Schistosoma* está associada a menor prevalência de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica, sendo observado também menor nível de glicose em jejum e pós-prandial, e hemoglobina glicada A1C (Chen, et al., 2013). Já na Indonésia, um país endêmico de infecções helmínticas transmitidas pelo solo, a presença de infecções está associada a: menor índice de massa corporal, menor valor de circunferência de cintura e menores níveis de colesterol total, LDL e HOMA-IR (Wiria, et al., 2013; Wiria, et al., 2015). Neste país o tratamento com anti-helmíntico resultou em aumento de leptina, diminuição de adiponectina e aumento na probabilidade do desenvolvimento de resistência à insulina (Tahapary, et al., 2017).

Em estudos experimentais, a primeira evidência da relação infecção e metabolismo,

ocorreu quando foi demonstrado que a ausência de eosinófilos no modelo de dieta hiperlipídica auxiliava no ganho de peso, na resistência à insulina e na intolerância à glicose, e que a eosinofilia induzida por helmintos revertia estes efeitos no metabolismo de glicose (Wu, et al., 2011). Em seguida, foi demonstrado que produtos presentes na superfície dos helmintos ou secretados por eles eram capazes de modular o metabolismo (Bhargava, et al., 2012; Hams, et al., 2015; Berbudi, et al., 2016; van den Berg, et al., 2017; Crowe, et al., 2019). A administração de lacto-N-fucopentose III, um glicano imunomodulatório encontrado em helmintos, melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em um mecanismo dependente de IL10, secretada por macrófagos M2 e células dendríticas, em camundongos submetidos à dieta indutora de obesidade (Bhargava, et al., 2012). Neste mesmo modelo observou-se um aumento de Fxr- α que suprime a lipogênese no fígado, ocasionando proteção no desenvolvimento de esteatose hepática (Bhargava, et al., 2012). Já no tratamento com antígenos de *Litomosoides sigmodontis* há diminuição na resposta inflamatória associada ao aumento de células Th2 e ILC2, e aumento na expressão de genes relacionados a sinalização de insulina e captação de ácidos graxos, porém sem exercer efeito no peso, massa do tecido adiposo e tamanho do adipócito (Berbudi, et al., 2016). A infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos RIP2-Opal *Ko* submetidos à dieta hiperlipídica resulta em menor ganho de peso, menor massa do tecido adiposo epididimal, além de melhora no metabolismo de glicose e na esteatose hepática (devido a menor expressão de enzimas/mediadores lipogênicos), resultante da ação de IL13 na ativação da sinalização de STAT-6 (Yang, et al., 2013). A infecção de camundongos C57BL/6, por 12 semanas, com *S. mansoni* resulta em redução de ganho de peso, de massa e do tamanho do adipócito, além de melhora na captação de glicose no sangue e na sensibilidade a insulina, decorrentes do aumento de eosinófilos e de macrófagos M2 (Hussaarts, et al., 2015). Já na infecção por *Strongyloides venezuelensis* associada à dieta hiperlipídica observa-se redução na inflamação subclínica, através do aumento de secreção de citocinas anti-

inflamatórias e ativação de macrófagos M2 no tecido adiposo epididimal, que exerce efeito positivo no metabolismo de glicose, identificada pela melhor sinalização e sensibilidade à insulina (Pace, et al., 2018). Neste modelo também foi observado aumento na produção de ácido oleico, que participa de vias anti-inflamatórias; aumento de *Lactobacillus* spp; e aumento na expressão de proteínas de *tight junction*, que ocasionam numa redução de permeabilidade intestinal (Pace, et al., 2018). Esses resultados demonstram que os efeitos da infecção helmíntica ou o uso de seus derivados têm efeitos multifatoriais na obesidade, mas que resultam em melhora do ganho ponderal e da síndrome metabólica.

O modelo mais utilizado para se estudar os efeitos da infecção helmíntica na obesidade e suas alterações metabólicas associadas é a infecção por *H. polygyrus* devido a três características primordiais: 1. Capacidade de induzir uma infecção subclínica, com morbidades relatadas apenas em situações de elevado parasitismo (Bansemir & Sukhdeo, 1994); 2. Estabelecimento de uma infecção crônica que pode durar por até oito meses (Monroy & Enriquez, 1992), o que é essencial no modelo de dieta hiperlipídica que dura em média 8 semanas; e 3. O estágio infectante da larva se alimentar de tecido morto do próprio hospedeiro (por exemplo, células intestinais descamadas) e não de ingesta ou sangue (Bansemir & Sukhdeo, 1994), o que garante que não haja competição por alimento entre a larva e o hospedeiro. Sendo assim, já foi comprovado que a infecção por *H. polygyrus*, além de suprimir o ganho de peso (Su, et al., 2018; Shimokawa, et al., 2019), resulta em melhora no controle de glicose (Marimoto, et al., 2016), diminuição de acúmulo de gordura no fígado (Marimoto, et al., 2016), aumento na expressão de UCP1 (envolvida na termogênese) nos adipócitos (Su, et al., 2018; Shimokawa, et al., 2019) e aumento na concentração de norepinefrina no soro (que foi responsável pelo efeito protetor no ganho de peso) (Shimokawa, et al., 2019). Estes efeitos foram associados a uma regulação positiva de IL4, IL10, IL13, Arg1, Fizz1 e Ym1 no intestino, que demonstra uma ação importante dos macrófagos M2 neste órgão (Marimoto, et al., 2016;

Su, et al., 2018). Além disso, foi observada menor expressão de fatores de transcrição T-bet e ROR γ t, bem como de suas citocinas associadas, IFN- γ e IL17, acompanhada de maior expressão de GATA3 e IL10 no linfonodo mesentérico (Su, et al., 2018). Apesar disto, pouco se sabe sobre a resposta imune induzida por *H. polygyrus* em associação com dieta hiperlipídica, especialmente no órgão endócrino mais importante no contexto: o tecido adiposo.

Sendo assim, o intuito principal deste trabalho foi estudar o efeito da infecção por *H. polygyrus* no ganho de peso e no desenvolvimento de alterações metabólicas e especialmente na migração celular para o tecido adiposo em estágios iniciais do desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar se a infecção por *Heligmosomoides polygyrus* melhora as alterações metabólicas e os parâmetros inflamatórios associados ao ganho de peso e identificar os mecanismos imunológicos envolvidos nesse processo.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da infecção por *H. polygyrus* em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica quanto à(ao):

- Ganho de peso e o consumo alimentar;
- Peso dos tecidos adiposo epididimal e subcutâneo, e do fígado;
- Integridade do intestino e ao estado nutricional;
- Parâmetros associados ao metabolismo de glicose e de lipídeos;
- Produção de citocinas e adipocinas pelas células do tecido adiposo epididimal;
- Composição imune, especialmente de células T, da fração vascular estromal;
- Fenótipo e funcionalidade das células T reguladoras residentes no tecido adiposo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e dietas

Camundongos C57BL/6 machos, livres de patógenos específicos, com idade inicial de quatro semanas, e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram utilizados como modelo experimental no presente estudo. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental Ênio Cardillo Vieira, do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN) da mesma universidade, em gaiolas coletivas, com no máximo cinco camundongos por gaiola, em condições ambientais controladas, sendo ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 28°C.

Ao longo das semanas de experimentação, água e dieta foram ofertados livremente, tendo diferença apenas no tipo de dieta, AIN-93M ou Dieta Indutora de Obesidade (DIO), de acordo com o grupo experimental. A dieta AIN-93M é composta de BHT (0,0008%), cistina (0,18%), bitartarato de colina (0,25%), mix de vitaminas (1%), mix de minerais (3,5%), óleo de soja (4%), celulose (5%), sacarose (10%), caseína (14%), maltodextrina (15,5%) e amido de milho (46,5%), sendo caracterizada por possuir quantidades ideais e de acordo com a necessidade dos animais, de carboidratos, proteínas e lipídeos (Tabela 1). Já a DIO é composta de BHT (0,0014%), bitartarato de colina (0,25%), cistina (0,3%), mix de vitaminas (1%), mix de minerais (3,5%), celulose (5%), amido de milho (6,2%), caseína (20%), groselha (31%) e banha de porco (35,5%), sendo uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, contendo cerca de 62% do valor calórico total na forma de gordura. A distribuição energética das dietas AIN-93M e DIO está listada na Tabela 1 (Akagiri, et al., 2008).

Tabela 1: Distribuição energética (% do valor calórico total – VCT) das dietas AIN-93M e Dieta Indutora de Obesidade (DIO)

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

3.2. Desenho experimental

Os camundongos foram divididos em quatro grupos, de forma homogênea quanto ao peso corporal, dos quais dois deles receberam dieta AIN-93M, e os outros dois receberam DIO. Dos dois grupos que receberam dietas semelhantes, um deles foi infectado com *H. polygyrus* (AIN Inf e DIO Inf), e o outro não recebeu nenhum tratamento (AIN Ct e DIO Ct). A infecção foi realizada no primeiro dia do experimento juntamente com o início da dieta (Fig. 4). Para isso, cada camundongo dos grupos “infectado” recebeu, por meio de gavagem oral, cerca de 200 larvas em estágio L3 de *H. polygyrus*.

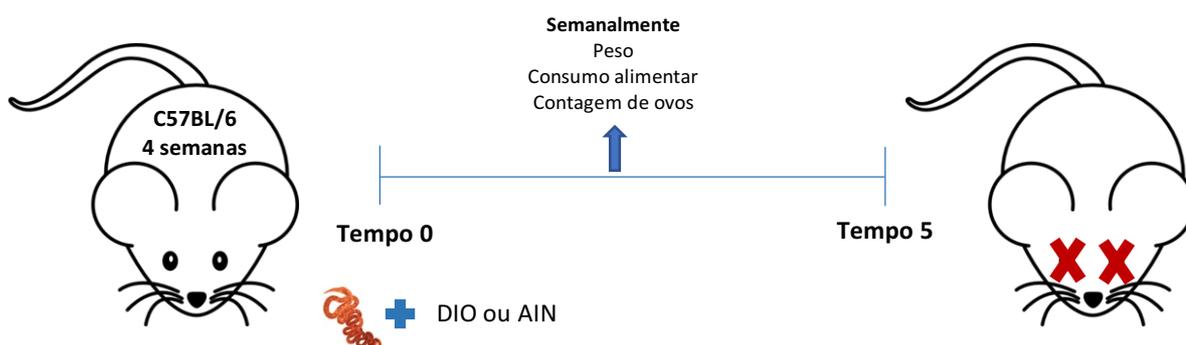


Figura 4: Desenho experimental utilizado ao longo do presente estudo. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 4 semanas foram divididos em quatro grupos, de forma homogênea quanto ao peso corporal, dos quais dois deles receberam dieta AIN-93M, e os outros dois receberam DIO. Dos dois grupos que receberam dietas semelhantes, um deles foi infectado com *H. polygyrus* (AIN Inf e DIO Inf), e o outro não recebeu nenhum tratamento (AIN Ct e

DIO Ct). A infecção foi realizada no primeiro dia do experimento juntamente com o início da dieta. Semanalmente foram avaliados: ganho de peso, consumo alimentar e contagem de ovos nas fezes. A experimentação ocorreu durante 5 semanas.

Semanalmente foram avaliados peso corporal, para acompanhar o desenvolvimento da obesidade, consumo alimentar, para verificar possíveis alterações devido a infecção, e número de ovos/g de fezes, para certificar a manutenção da infecção. O consumo alimentar foi mensurado por meio do cálculo da diferença entre o peso da dieta ofertada e o restante não consumido, sendo este valor ajustado pelo número de animais por gaiola e multiplicado pelas calorias por grama da respectiva dieta, apresentando assim o valor diário, em quilocalorias (kcal), consumido por cada animal.

Ao final das cinco semanas de experimentação os animais foram submetidos aos Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI) e Tolerância Oral à Glicose (TTOG) para verificar o desenvolvimento de resistência à insulina. O tempo de jejum antecedente a eutanásia variou de acordo com o objetivo do experimento, não ultrapassando 16 horas. Os animais foram eutanasiados por meio de injeção intraperitoneal de solução de ketamina (50mg/Kg) e xilasina (20mg/Kg) seguido de deslocamento cervical, conforme orientado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG). Após a eutanásia, ocorreu a retirada de sangue (por punção cardíaca), fígado, tecido adiposo epididimal (TAE) e tecido adiposo subcutâneo (TAS). Os órgãos foram pesados e armazenados a -70°C ou imediatamente processados, de acordo com a necessidade da análise posterior.

3.3. Permeabilidade Intestinal

A permeabilidade intestinal foi aferida a partir da medida de difusão da radioatividade no sangue, após gavagem de DTPA marcado com tecnécio – ^{99m}Tc – DTPA,

contendo 18,5 MBq ^{99m}Tc), segundo o protocolo descrito por Trindade e colaboradores (Trindade, et al., 2018). A coleta de sangue ocorreu quatro horas após a gavagem, sendo o sangue colocado em tubos específicos para a medida de radioatividade. A leitura foi realizada utilizando o aparelho Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os dados foram expressos em % da dose, calculada a partir da fórmula: [(contagem por minuto [cpm de sangue/ com da dose administrada)] x 100.

3.4. Avaliação do estado nutricional

Albumina

Albumina corresponde a uma das principais proteínas no sangue, e seu nível plasmático é utilizado para avaliação do estado nutricional e também da função hepática (Morbarhan, 1988). A mensuração do nível de albumina sérica ocorre através da identificação do nível de desvio do pico de absorvidade máxima do verde de bromocresol quando este corante se liga a albumina (Howorth, 1971).

A concentração da albumina em jejum foi determinada utilizando kit enzimático comercial (Labtest#19-1/250), em ensaio de microplaca de 96 poços, nos quais foram inseridos 2 μL de soro puro ou padrão, ambos em duplicata, seguido de 200 μL do reagente de cor. Após a homogeneização, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos, e a absorbância lida a 630nm em leitor de microplaca (VarioskanTM Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, USA). O resultado, em g/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este resultado multiplicado por 3,8 que corresponde a concentração (g/dL) do padrão.

Proteínas Totais

A análise do nível de normalidade de albumina sérica se baseia na relação com a quantidade de proteínas totais, sendo que cerca de 50% destas correspondem a albumina (Zaias, et al., 2009). Sendo assim a quantidade de proteínas totais no soro foi mensurada a partir da reação de íons de cobre com as ligações peptídicas das proteínas em meio alcalino resultando em uma coloração púrpura (Meulemans, 1960).

O nível de proteínas totais em jejum foi determinado utilizando kit enzimático comercial (Labtest#99-250), em ensaio de microplaca de 96 poços, nos quais foram inseridos 4 μ L de soro puro ou padrão, ambos em duplicata, seguido de 200 μ L do reagente de cor. Após a homogeneização, a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos, e a absorbância lida a 545nm em leitor de microplaca (VarioskanTM Flash Multimode Reader). O resultado, em g/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este resultado multiplicado por 4, que corresponde a concentração (g/dL) do padrão.

3.5. Teste de Sensibilidade à Insulina

O Teste de Sensibilidade à Insulina (TSI) foi realizado para avaliar o possível desenvolvimento de resistência a este hormônio, já que esta é uma das consequências associadas ao ganho exacerbado de peso e sua consequente síndrome metabólica. Este teste consiste na medição do nível de glicose no sangue antes da aplicação intraperitoneal de insulina (0,75U/Kg de peso corporal) e após 15, 30 e 60 minutos. O teste foi realizado quatro dias antes da eutanásia, os animais não foram submetidos a jejum (Santos, et al., 2008), o sangue foi retirado da cauda e a glicemia foi aferida por um glicosímetro portátil, Accu-Check Performa (Roche, Diagnostics, USA), gerando resultados em mg/dL. A área sob a curva foi obtida a partir

do cálculo da área entre o eixo x e a curva de interesse utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.0.0).

3.6. Teste de Tolerância Oral à Glicose

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

3.7. Avaliação do perfil lipídico associado ao metabolismo hepático

O perfil lipídico dos animais foi avaliado a partir da dosagem dos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL, utilizando kits enzimáticos comerciais (Labtest, Brasil). Para a realização destes testes, os animais foram submetidos a jejum de 16 horas, como recomendado por Bellantuono e colaboradores (2020) para estudos de metabolismo hepático (Bellantuono, et al., 2020).

Triglicerídeos

O nível de triglicerídeos no soro é determinado a partir de reações em cadeia, sendo que inicialmente a lipase hidrolisa os triglicerídeos da amostra liberando glicerol e ácidos graxos. O glicerol sofre então ação da glicerolquinase que o converte em glicerol-3-fosfato, que por sua vez é oxidado em dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Por fim, o peróxido de hidrogênio é acoplado com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo uma quinoneimina que gera uma coloração avermelhada proporcional a quantidade de triglicerídeos (Fossati & Prencipe, 1982).

A concentração de triglicerídeos foi determinada em ensaio de microplaca de 96 poços, nos quais foram inseridos 2 μ L de soro puro ou padrão, ambos em duplicata, seguido de 200 μ L do reagente de cor (Labtest#87-2/100). Após homogeneização, a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos e a absorbância lida a 505nm em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA). O resultado, em mg/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este valor multiplicado por 200, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão.

Colesterol Total e HDL

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

A concentração de colesterol total, assim como a de triglicerídeos, foi determinada em ensaio de microplaca de 96 poços utilizando a mesma quantidade de soro, padrão e reagente de cor (Labtest#76-2/100). A placa também foi incubada a 37°C por 10 minutos e a absorbância

lida a 500nm em leitor de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer). O resultado, em mg/dL, foi obtido a partir da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e este valor multiplicado por 200, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão.

Já o colesterol HDL foi medido a partir da precipitação inicial seletiva das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_4$) e cloreto de magnésio ($MgCl_2$). Após a adição dos precipitantes ao soro, a solução foi submetida a centrifugação de 3.500rpm por 15 minutos, para obtenção do sobrenadante, que foi utilizado para medida do HDL (Lopes-Virella, et al., 1977). Este sobrenadante foi então pipetado, na microplaca de 96 poços, e os procedimentos seguintes foram realizados de acordo com o protocolo utilizado para a medida do nível de colesterol total. Por fim, para calcular o nível de colesterol HDL, em mg/dL, foi realizado o cálculo da razão da absorbância do teste em relação ao padrão e o resultado multiplicado por 40, que corresponde a concentração (mg/dL) do padrão (Labtest#13-50).

3.8. Extração de lipídeos por FOLCH

O ensaio de FOLCH, de maneira adaptada, foi realizado com o intuito de verificar o efeito da dieta associada ou não a infecção, no acúmulo de gordura no fígado (Folch, et al., 1957). 100mg de fígado, previamente congelado a $-70^{\circ}C$, foram homogeneizados em 950 μ L de solução de clorofórmio:metanol (2:1). Posteriormente foram adicionados 200 μ L de metanol, e as amostras centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi transferido para um tubo limpo, previamente pesado. 400 μ L de clorofórmio e 320 μ L de solução de NaCl a 0,73% foram adicionados e homogeneizados ao sobrenadante coletado. A amostra resultante foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos, sendo a fase superior descartada e a inferior submetida a 3 lavagens consecutivas com 300 μ L de solução de FOLCH

(2% de NaCl a 0,2%, 3% Clorofórmio, 47% de água destilada, 48% de metanol). Por fim, a amostra foi submetida a secagem em estufa à 60°C. O tubo contendo a amostra seca foi novamente pesado, sendo a quantidade de lipídeos da amostra calculada a partir da diferença de peso do tubo com e sem amostra processada.

3.9. Isolamento de adipócitos e de células da fração vascular estromal

As células da fração vascular estromal, que correspondem aos outros tipos celulares que não são adipócitos, foram isoladas do tecido adiposo epididimal para realização de cultura e subsequente medida da produção de citocinas, além de citometria de fluxo para a avaliação da composição celular do tecido nas condições estudadas. Os procedimentos utilizados para isolamento destas células se basearam no protocolo desenvolvido em 1964 por Rodbell (Rodbell, 1964), que consiste basicamente em extração do tecido, digestão e separação das células por densidade.

Cerca de 1g de tecido adiposo epididimal foi extraído do animal, em capela de fluxo laminar, e inserido em recipiente estéril contendo meio DMEM completo (DMEM acrescido de 2% de Soro fetal bovino inativado e 0,2% de Penicilina/Estreptomicina). Caso o peso do tecido não atingisse 1g foi realizado pool de dois ou mais animais do mesmo grupo. Em seguida, o tecido foi transferido para outro recipiente estéril para ser submetido a digestão com 4mg de colagenase VIII (Sigma #C2139) acrescido a 3mL de tampão de digestão, que é composto de: DMEM incompleto, 4% de Albumina bovina livre de ácidos graxos e 0,1% de Glicose. Após a degradação do tecido, por meio de cortes com tesoura cirúrgica, os tubos foram incubados por 40 minutos, 37°C sob agitação constante para finalização da digestão. Após o término da incubação o conteúdo foi filtrado em rede de nylon e lavado três vezes com DMEM completo. Entre cada processo de lavagem o conteúdo foi submetido a centrifugação a 500rpm, 4°C por 3

minutos. Após cada centrifugação o conteúdo dos tubos foi separado, sendo o infranadante retirado e armazenado para posterior isolamento das células estromais e as células do sobrenadante (adipócitos) submetidas ao processo consecutivo de lavagem. Finalizado o processo de lavagem, o sobrenadante restante corresponde aos adipócitos isolados. Posteriormente, todo o infranadante armazenado (células da fração vascular estromal) foi centrifugado a 1.300rpm, 4°C por 10 minutos, seguido do descarte do sobrenadante, ressuspensão das células em 1mL de DMEM completo e contagem de células em câmara de Neubauer.

3.10. Cultura de células estromais e adipócitos

As células da fração vascular estromal (5×10^6 células em cada mL) e os adipócitos (3×10^5 células em cada mL) foram cultivadas em placa de 24 poços, com estímulo de PMA (0,4mg/mL) e Ionomicina (5mg/mL), em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂, por 24 horas. Após o término da incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até a realização do teste de CBA (*Cytometric Bead Array*) ou ELISA.

3.11. Cytometric Bead Array

O ensaio de *Cytometric Bead Array* (CBA) foi realizado para detectar possíveis diferenças na produção de citocinas, pelas células isoladas do tecido adiposo epididimal, no contexto de dieta hiperlipídica associada ou não a infecção helmíntica. Para realização deste ensaio foi utilizado o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD#560485).

Antes de iniciar o teste houve reconstituição e diluição seriada do padrão (1/2 até 1/256), preparo do mix de *beads* de detecção de citocinas (sendo necessário 3µL de cada suspensão de *bead* para cada poço) e descongelamento das amostras, em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 10.000rpm por 5 minutos. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços de fundo em U (Falcon#353077), compatível com o citômetro no qual foi realizada a leitura. Inicialmente 25µL de padrão ou amostras ou reagente diluente (controle negativo) foram pipetados nos respectivos poços, seguido de 21µL do mix de *beads*, 18µL do reagente de detecção, homogeneização e incubação por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante. Após a incubação, foi realizada a lavagem dos poços, com 130µL de tampão de lavagem seguido de centrifugação por 10 minutos a 1.400rpm, 18°C. O sobrenadante foi então cuidadosamente retirado, de forma que as *beads* não fossem removidas, sendo posteriormente adicionado a placa 175µL de tampão de lavagem, para aquisição no citômetro. A leitura foi realizada no aparelho FACSVerse (Becton Dickinson and Company, USA) da plataforma de citometria do Instituto René Rachou/Fiocruz-Minas. Os resultados foram então analisados pelo FCAP Array Software, sendo medidos a partir da intensidade da fluorescência de PE (“sanduíche” *bead* + amostra/padrão).

3.12. ELISA

A dosagem da produção de adiponectina pela cultura de adipócitos foi realizada através do Ensaio imunoenzimático (ELISA). A adiponectina corresponde a uma importante proteína secretada pelo tecido adiposo que age potencializando o efeito da insulina, principalmente no músculo esquelético e fígado (Berg, et al., 2001) (Chandran, et al., 2003). No músculo, é responsável por aumentar a fosforilação em tirosina do receptor de insulina aumentando a sensibilidade a este hormônio (Chandran, et al., 2003). No fígado, é capaz de diminuir o influxo

de ácidos graxos livres e aumentar a oxidação dos mesmos, ocasionando em menor deposição de glicose hepática e síntese de triglicerídeos, aumentando também a sensibilidade à insulina (Chandran, et al., 2003). Age também no endotélio vascular exercendo uma função diferenciada, pois atua principalmente na diminuição da adesão de monócitos, impedindo a inflamação (Chandran, et al., 2003). É encontrada em abundância no plasma de pessoas saudáveis (entre 1,9 e 17µg/mL) e suas elevadas concentrações indicam uma relação inversa com diversas alterações morfológicas e metabólicas como circunferência da cintura, quantidade de gordura visceral, nível de triglicerídeos, glicose em jejum e insulina e também com o desenvolvimento de diabetes tipo II (Arita, et al., 1999; Ryo, et al., 2004; Li, et al., 2009). Além disso, o nível de colesterol HDL parece estar diretamente relacionado com a quantidade de adiponectina (Ryo, et al., 2004).

A realização do teste de ELISA ocorreu de acordo com a recomendação do fabricante (R&D#DY1119), sendo que inicialmente 100µL da solução contendo o anticorpo de captura foi pipetada na placa, que foi então selada e incubada *overnight* a 4°C. Após três lavagens consecutivas com solução de PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), foi realizado o bloqueio da placa com solução de 1% BSA sendo incubada por 1 hora a 37°C. Depois de uma nova sequência de lavagem, 100µL de amostras e padrões foram pipetados nos respectivos poços, seguido de incubação por 2 horas a 37°C. Novamente foram realizadas lavagens, seguido de adição de 100µL de anticorpo de detecção biotilado e mais uma incubação por 2 horas a 37°C. Após as duas horas a placa foi lavada três vezes e em seguida 100µL de estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano foi adicionada em todos os poços e a placa foi incubada por 20 minutos, no escuro, a 37°C. Uma última sequência de lavagens foi realizada e por fim foram adicionados 100µL da solução de substrato (Na₂HPO₄ + Ácido Cítrico + TMB + H₂O₂) seguido por uma incubação final de 20 minutos, novamente protegido da luz e a 37°C. Após os 20 minutos, para parar a reação foram adicionados 52µL de 2N H₂SO₄, e a leitura foi realizada

no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram então expressos de acordo com a conversão da absorbância lida com a respectiva concentração indicada pelo padrão.

3.13. Citometria de Fluxo

Células estromais isoladas de acordo com o protocolo descrito acima foram submetidas a análise de citometria de fluxo com o intuito de distinguir as populações celulares específicas. Para isto foram utilizados dois painéis: Caracterização de Linfócitos T e Caracterização de Células T reguladoras. Após o término das marcações os dados foram adquiridos no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e as análises realizadas com auxílio do programa FlowJo V10.5.3.

Painel Caracterização de Linfócitos T

A partir da marcação deste painel foi possível distinguir as subpopulações de células T *helper* (Th1, Th2, Th17). As células foram pipetadas em placa específica (1×10^6 células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (30 μ L) acrescido de anticorpo anti-Fc γ R III/II CD16/32 (clone 2.4G2) (1:50), sendo incubadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Depois da primeira lavagem com tampão FACS (PBS + 2% Soro Fetal Bovino), as células foram fixadas e permeabilizadas com 100 μ L de FixPerm (eBioscience #00552300). Após incubação de 20 minutos, as células foram novamente lavadas, agora com 100 μ L de PermWash (eBioscience #00552300), e centrifugadas a 2.000rpm por 8 minutos. Em seguida ocorreu a marcação intracelular (30 μ L) por 45 minutos, ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4°C. Após três lavagens consecutivas com PermWash, as células foram enfim ressuspensas em 200 μ L de tampão FACS para serem adquiridas no citômetro de fluxo. As informações sobre todos os anticorpos utilizados neste painel estão descritas na tabela 2.

Para análise das subpopulações de células T, inicialmente foi verificada a qualidade da aquisição das amostras através da ferramenta *Check sample quality* do programa FlowJo. As leituras das amostras foram aceitas, sofreram ajustes ou foram recusadas seguindo protocolo automático dessa ferramenta.

A estratégia de *gate* para análise deste painel (Fig. 5) foi iniciada a partir dos dados de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A), para a delimitação do *gate* de linfócitos, que corresponde a células pequenas e pouco granulosas. Dentro do *gate* de linfócitos foi demarcado o *gate* de células únicas ou *singlets* (FSC-H x FSC-A), para excluir possíveis grumos celulares. E dentro do *gate* de *singlets*, nas amostras que apresentaram algum problema, foi excluído, no *gate* tempo, o momento que indica as eventuais interrupções na aquisição. A partir da população resultante foram selecionadas sequencialmente as populações CD3⁺ (SSC-A x CD3) e CD4⁺ (SSC-A x CD4). Dentro das células consideradas CD3⁺CD4⁺, a partir dos fatores de transcrição T-bet, GATA3 e RORγt foi possível identificar as células Th1, Th2 e Th17 respectivamente (Fig. 5).

Tabela 2: Anticorpos utilizados no painel Caracterização de Linfócitos T, de acordo com o fluorocromo e o tipo de marcação (extra ou intracelular)

Anticorpo	Fluorocromo	Marcação
CD3 (Biolegend #100205)	PE	Extracelular
CD4 (Biolegend #100449)	BV510	Extracelular
GATA3 (Biolegend #653808)	Alexa Fluor 488	Intracelular
RORγ t (BD Horizon #562684)	PE-CF594	Intracelular
T-bet (Biolegend #644806)	PecP/Cy5.5	Intracelular

Painel Caracterização de células T reguladoras

As marcações realizadas para este painel foram destinadas exclusivamente para a identificação e caracterização fenotípica de células T reguladoras, sendo todos os anticorpos utilizados listados na tabela 3. A caracterização fenotípica das Tregs teve como base os marcadores que, de acordo com a literatura, conferem o fenótipo único de Tregs residentes no tecido adiposo (Feurerer, et al., 2009). O processo de marcação extra e intracelular ocorreu da mesma maneira descrita para o *Painel de Caracterização de Linfócitos T*.

Novamente, para iniciar a análise foi delimitado o *gate* de linfócitos, seguido pelo *gate* de células únicas. A partir do *gate* resultante e análise de SSC-A x CD3, seguida de SSC-A x CD4 foi delimitada a população CD3⁺CD4⁺ que após analisada considerando CD25 x Foxp3, resultou na delimitação das células T reguladoras, que são duplo-positivas (Fig. 6). Dentro das células Tregs, foram analisadas isoladamente as populações positivas para LAP, GITR, CD152 e CD134.

Tabela 3: Anticorpos utilizados no painel Caracterização de células T reguladoras, de acordo com o fluorocromo e o tipo de marcação (extra ou intracelular)

Anticorpo	Fluorocromo	Marcação
CD3 (Biolegend #100225)	BV570	Extracelular
CD4 (Biolegend #100449)	BV510	Extracelular
CD25 (Biolegend #102038)	BV650	Extracelular
CD134 (Biolegend #119418)	PE/Dazzle	Extracelular
CD152 (Biolegend #106323)	BV605	Extracelular
Foxp3 (Biolegend #320014)	APC	Intracelular
GITR (Biolegend #120211)	Alexa Fluor 488	Extracelular
LAP (Biolegend #141410)	PercP/Cy5.5	Extracelular

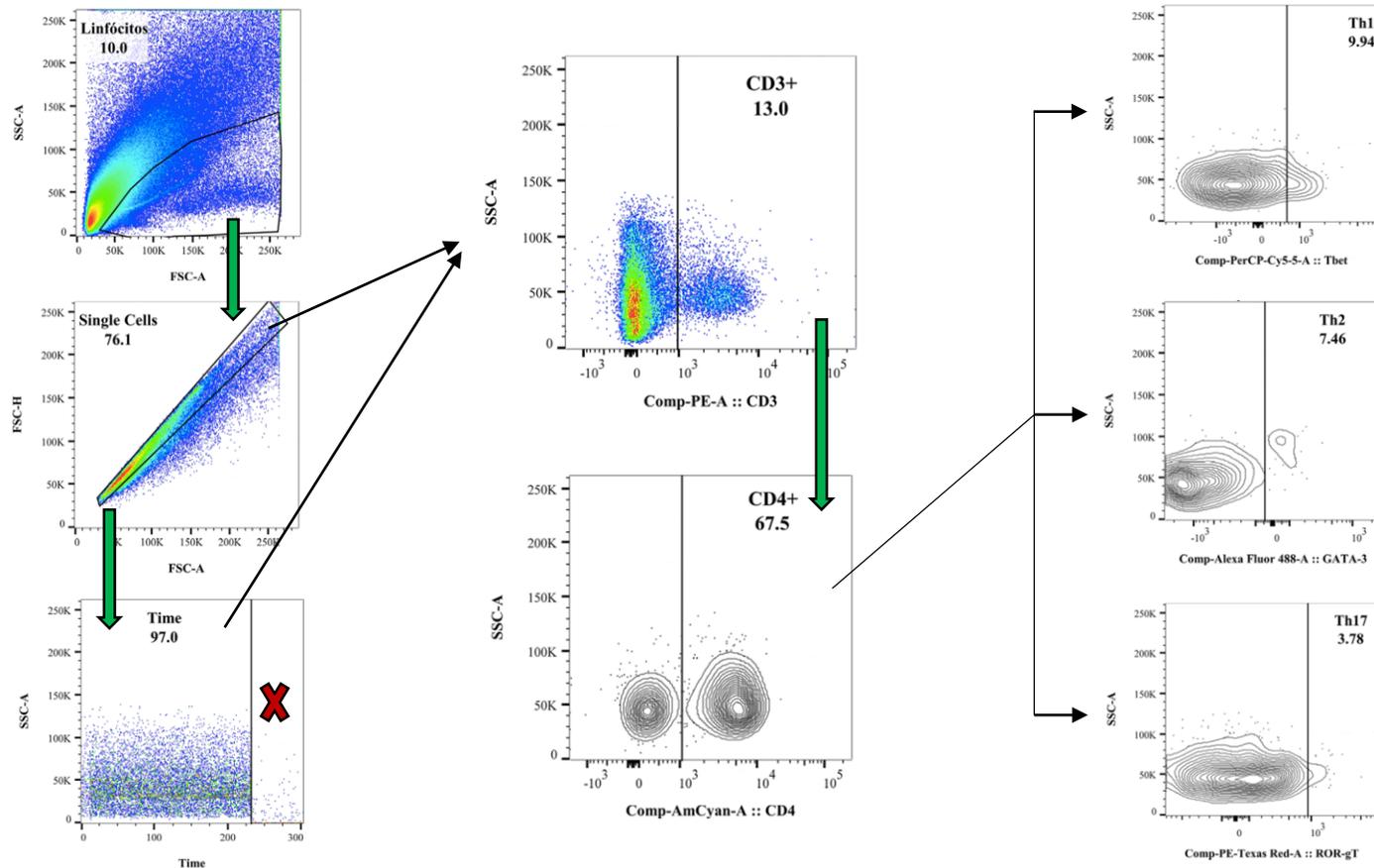


Figura 5: Estratégia de *gate* painel Caracterização de Linfócitos T. Inicialmente foi demarcado o *gate* de linfócitos (SSC-A x FSC-A), e a partir dele delimitado o *gate* de células únicas (FSC-H x FSC-A). Se necessário, a partir do *gate* de *Single Cells*, foi realizado o *gate* de *Time* (SSC-A x *Time*), sendo excluídos os pontos que indicam interrupções na leitura. Da população resultante foram selecionadas as células CD3⁺, seguido pelas CD4⁺, que indicam as células T *helper*. Desta população, foi realizado o *gate* de SSC-A x T-bet/GATA-3/RORγt, que resultou nas populações de Th1, Th2 e Th17, respectivamente.

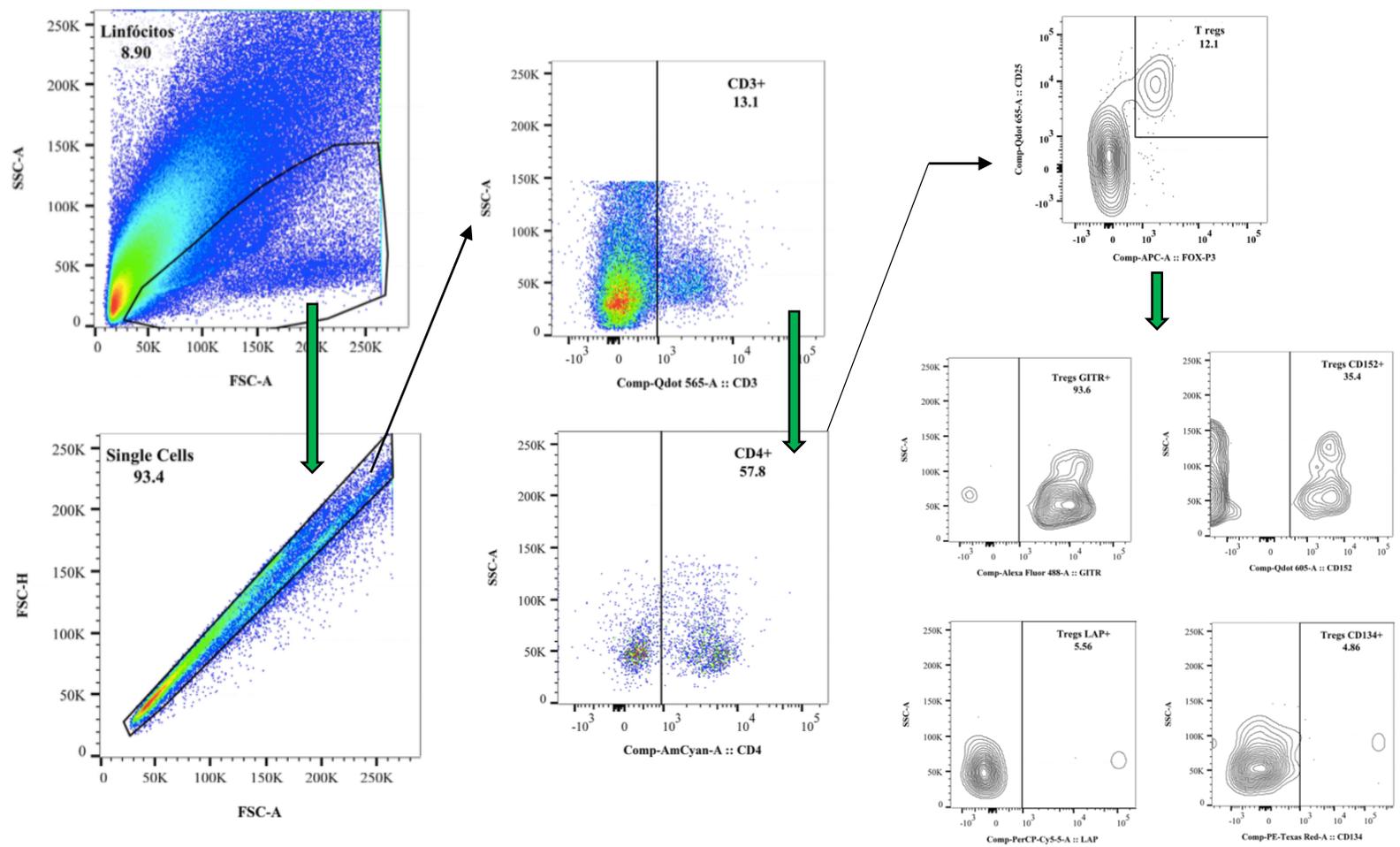


Figura 6: Estratégia de *gate* painel Caracterização das células T reguladoras. Inicialmente foi demarcado o *gate* de linfócitos (SSC-A x FSC-A), e a partir dele delimitado o *gate* de células únicas (FSC-H x FSC-A). Da população resultante foram selecionadas as células CD3⁺, seguido pelas CD4⁺, e CD25⁺ x Foxp3⁺, resultando nas Tregs. Desta população, foi realizado o *gate* de SSC-A x GITR, CD152, LAP e CD134, que resultou nas Tregs positivas para cada um destes marcadores.

3.14. Ensaio funcional de células T reguladoras

Para realizar o ensaio *in vitro* de funcionalidade das Tregs foi necessário separar essa população das outras células do sistema imune presentes na fração estromal isolada previamente. Para isto, foi utilizado o kit *Dynabeads FlowComp Mouse CD4⁺CD25⁺ Treg Cells* (Invitrogen#11463D), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Inicialmente foi adicionado a amostra um mix de anticorpos que se ligam as células não positivas para CD4. *Dynabeads* foram então adicionadas e se ligaram no complexo anticorpo-célula durante curta incubação. Células que se ligaram nas *beads* foram separadas por um ímã e descartadas imediatamente. As células CD4⁺ restantes foram marcadas com anticorpo *FlowComp CD25* e foram positivamente selecionadas também utilizando *beads*. Por fim, durante incubação com tampão específico ocorreu a liberação das células CD4⁺CD25⁺ das *Dynabeads*, estando assim as Tregs prontas para uso. Vale ressaltar que o kit garante pureza de aproximadamente 90%, já que mais de 88% das células CD4⁺CD25⁺ são Tregs, além de viabilidade superior a 95%.

As células T efectoras (Teff) por sua vez, foram isoladas do baço de camundongos controle, ou seja, sem influência de infecção helmíntica e da dieta hiperlipídica. O baço foi inicialmente processado em macerador de tecido e centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos. As células resultantes passaram pelo processo de lise das hemácias (incubação por 2 minutos com solução de cloreto de amônio e bicarbonato de sódio), seguido de nova centrifugação. As células de interesse foram então ressuspensas em 1mL de PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ e suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino. As células Teft também foram isoladas a partir do kit *Dynabeads FlowComp Mouse CD4⁺CD25⁺ Treg Cells* (Invitrogen#11463D), porém foram obtidas da fração de células que não se ligaram ao complexo Bead-Anticorpo CD25.

Após a purificação das populações de interesse, o ensaio de funcionalidade das Tregs foi realizado como descrito na literatura (Collison & Vignali, 2011), sendo a atividade destas

células medida pela taxa proliferação das células Teft marcadas com CFSE. Após o isolamento, as Teft foram lavadas com PBS 1X e marcadas com CFSE por 10 minutos a 37°C (1µL de CFSE em 1000µL de PBS para 1×10^6 células). A reação foi paralisada em geladeira com meio RPMI completo por cinco minutos, e as células foram centrifugadas a 1.500rpm por 10 minutos e ressuspendidas no volume desejado para o plaqueamento ($2,5 \times 10^4$ células em 50µL).

Com as células Teft já marcadas com CFSE, prosseguiu-se para a realização do ensaio. Foram testadas seis proporções de Teft:Treg, iniciando com a razão de 2:1, além de um poço controle no qual não foram inseridas Tregs . Para testar estas razões inicialmente foi realizada uma diluição seriada das células Treg, de forma que o poço mais concentrado ficasse com $1,25 \times 10^4$ células. Após essa diluição, $2,5 \times 10^4$ células Teft foram adicionadas em todos os poços. Por fim, com o intuito de ativar as células Teft foi acrescentado 0,625µL de *Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28* (Life Technologies#11452D) por poço. A placa foi então incubada em estufa com ambiente de 5% CO₂ a 37°C por 72 horas. Após o término da incubação, as células foram adquiridas no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e as análises realizadas com auxílio do programa FlowJo V10.5.3. A análise foi feita utilizando a ferramenta *Proliferation Modeling*, sendo ajustado inicialmente o pico 0 (a partir do poço de células marcadas, porém não estimuladas), seguido de correções no número de picos, distância entre os picos e largura dos picos, gerando um modelo. Após a criação do modelo, o próprio FlowJo gera o resultado da porcentagem de proliferação.

3.15. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 9.0.0. Para comparações múltiplas entre os quatro grupos de estudo, os dados foram submetidos ao teste *Mixed-effects analysis*, enquanto análises entre dois grupos foram

realizadas a partir do *two-tailed Student's test*. Os resultados foram apresentados pela média e erro padrão da média, sendo considerado 5% ($p < 0,05$) como nível de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. A infecção por *Heligmosomoides polygyrus* atenua o ganho de peso nos estágios iniciais do desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica

O efeito da infecção helmíntica sob parâmetros relacionados ao ganho de peso (peso corporal e dos tecidos) e consumo alimentar foi o primeiro alvo de investigação do presente estudo. No geral, constatamos que a infecção previne o ganho exacerbado de peso em animais alimentados com DIO (Fig. 7A) (DIO Ct: $27,16 \pm 1,20$ g; DIO Inf: $23,38 \pm 0,65$ g) e que este efeito não é decorrente de uma redução no consumo alimentar dos animais do grupo DIO Inf ($14,13 \pm 1,19$ kcal/animal/dia) quando comparados aos do DIO Ct ($15,87 \pm 0,79$ kcal/animal/dia) (Fig. 7B). A diferença no ganho de peso entre os dois grupos que receberam DIO é refletida tanto no peso relativo do tecido adiposo epididimal (DIO Ct: $3,52 \pm 0,25\%$; DIO Inf: $1,80 \pm 0,11\%$) quanto no subcutâneo (DIO Ct: $2,16 \pm 0,22\%$; DIO Inf: $1,33 \pm 0,12\%$) (Fig. 7C/D), sendo ambos menores no grupo DIO Inf. Vale ressaltar que esta diferença de peso entre grupos “infectado” e “não infectado” não foi observada no grupo que recebeu dieta controle (AIN) (AIN Ct: $22,39 \pm 0,53$ g; AIN Inf: $21,42 \pm 0,40$ g) (Fig. 7A), sendo possível inferir que a diferença no ganho de peso nos grupos DIO também não ocorre devido à espoliação do parasito. Diante destas evidências podemos afirmar que na ruptura da homeostase devido a administração de dieta hiperlipídica, a infecção por *H. polygyrus* é capaz de exercer influência benéfica no controle do ganho de peso, desde estágios iniciais da indução dos dois estímulos.

Os resultados encontrados pelo presente estudo são corroborados pela literatura tanto em modelos de infecção por *H. polygyrus* (Su, et al., 2018) quanto por outros parasitos, como *S. mansoni* (Hussaarts, et al., 2015) e *N. brasiliensis* (Yang, et al., 2013). Su e colaboradores (2018) demonstraram em um modelo experimental semelhante ao utilizado no presente estudo

(camundongos C57BL/6 e dieta indutora de obesidade com 60% de gordura) que a infecção por *H. polygyrus* exerce efeito no controle do ganho de peso tanto em infecções de curto (30 dias ou 4 semanas), quanto de longo prazo (105 dias ou 15 semanas) (Su, et al., 2018). Em ambos os tempos de infecção, associada a dieta hiperlipídica os autores observaram menor ganho de peso no grupo infectado, assim como menor peso do tecido adiposo gonadal e subcutâneo, sem evidências de alterações no consumo alimentar. Este estudo agrega uma informação importante, pois demonstra que o efeito exercido pela infecção nos estágios iniciais do desenvolvimento de obesidade permanece ao longo do tempo, mesmo em um modelo longo de indução de ganho de peso (Su, et al., 2018). Este estudo prévio corrobora com a ideia de que o que observamos no presente estudo pode ser extrapolado para modelos mais convencionais de indução de obesidade, como 8 ou 16 semanas.

Outros estudos demonstram também o efeito benéfico da infecção helmíntica na obesidade. Por exemplo, a infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta com 45% de gordura resultou em redução no tamanho dos adipócitos, em ganho de peso 62% menor e também em redução de 89% da massa do tecido adiposo (Hussaarts, et al., 2015). No entanto, a infecção por *S. mansoni* apresenta algumas desvantagens ao hospedeiro, já que além de seu ciclo de vida não ocorrer exclusivamente no intestino (passa pela circulação e fígado), a infecção pode ocorrer de forma intensa, gerando sintomas nos modelos experimentais (anemia, perda de peso, diarreia sanguinolenta), podendo acarretar inclusive em exclusões de animais sintomáticos (Doenhoff, et al., 2002). Considerando 14 semanas de infecção por *N. brasiliensis* em camundongos RIP2-Opa1*Ko* alimentados com dieta com 60% de gordura, foi observado redução de 15% no ganho de peso e de 40% no peso do tecido adiposo epididimal e subcutâneo (Yang, et al., 2013). O uso de *N. brasiliensis* como modelo de infecção em estudos associados a obesidade exige a constante reinfecção dos animais já que o sistema imune dos mesmos consegue eliminar completamente a infecção após cerca

de duas semanas (Camberis, Le Gros & Urban Jr, 2003; Yang, et al., 2013). Porém, é interessante observar que mesmo após a eliminação completa do parasito, os animais previamente infectados ganham 9% menos peso que os animais não infectados, ambos alimentados com dieta hiperlipídica (Yang, et al., 2013). Apesar destas outras infecções, demonstrarem resultados benéficos diante a administração de dieta hiperlipídica, as limitações e os possíveis malefícios decorrentes das mesmas fazem com que a infecção por *H. polygyrus* seja um modelo mais adequado para este tipo de estudo.

A associação entre infecção e menor ganho de peso não foi demonstrada apenas em modelos experimentais. Estudos realizados na Indonésia constataram que a presença de infecção por espécies de helmintos transmitidos pelo solo está associada a um menor índice de massa corporal e também menor valor de circunferência de cintura (Wiria, et al., 2013; Wiria, et al., 2015).

Portanto, nossos dados são coerentes com aqueles apresentados na literatura demonstrando que a infecção helmíntica previne o ganho ponderal tanto em modelos experimentais quanto em casos clínicos.

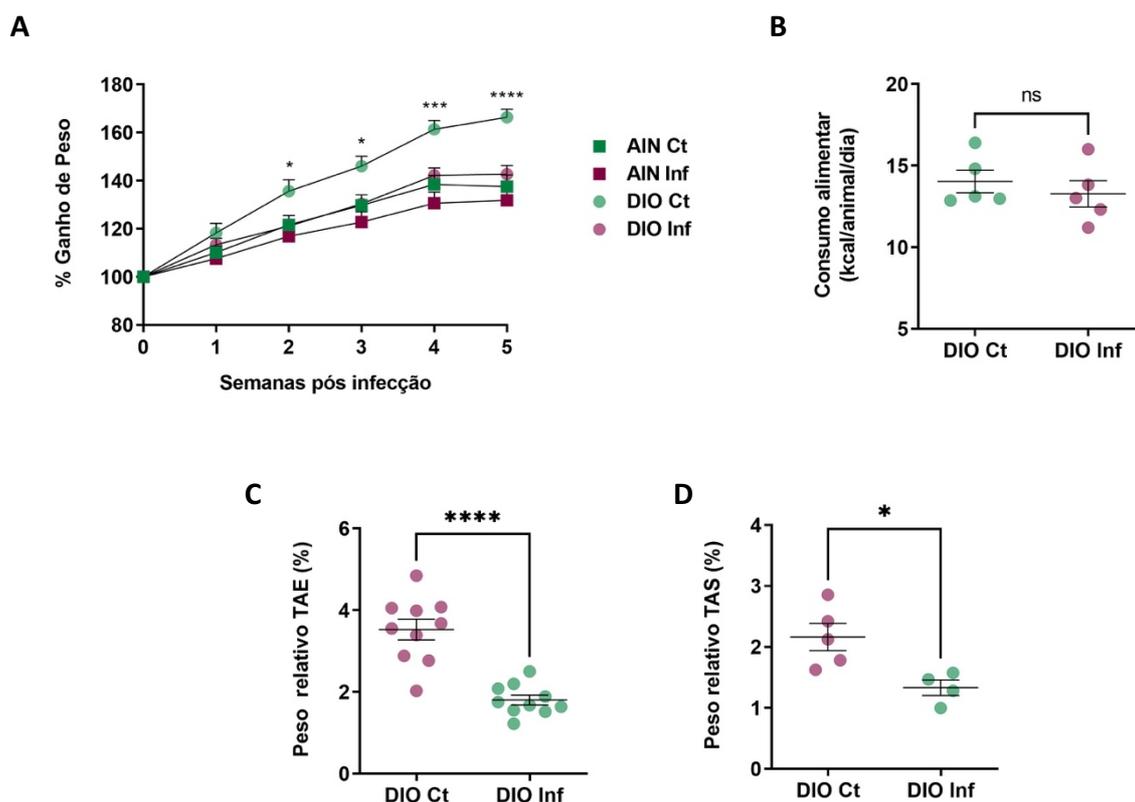


Figura 7: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* atenua o ganho de peso em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica por cinco semanas, apesar de não alterar o consumo calórico. Porcentagem de ganho de peso dos quatro grupos ao longo das cinco semanas de experimentação (A). Média do consumo alimentar (kcal/animal/dia) dos diferentes grupos que receberam DIO (B). Peso relativo em percentual do tecido adiposo epididimal (C) e subcutâneo (D) em relação ao peso corporal final. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de pelo menos três experimentos independentes. A Mixed effects analysis (n=5 por grupo), B, C e D Two-tailed t test (C: n=10, D: n=5). * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001 entre os grupos DIO.

4.2. Parâmetros fisiológicos associados ao estado nutricional são mantidos inalterados tanto na presença de infecção quanto nos estágios iniciais do desenvolvimento de obesidade

Apesar dos efeitos benéficos da infecção helmíntica em diferentes situações de doenças inflamatórias, como alergia das vias aéreas, obesidade e diabetes (Taylor, et al., 2005; Wilson, et al., 2005; Hubner, Stocker & Mitre, 2009; Liu, et al., 2009; Grainger, et al., 2010; Metenou, et al., 2010; Layland, et al., 2013; Yang, et al., 2013; Husaarts, et al., 2015; Berbudi, et al., 2016; Marimoto, et al., 2016; Pace, et al., 2018; Su, et al., 2018; Shimokawa, et al., 2019), por não fazerem parte da microbiota inerente do hospedeiro podem-se surgir questionamentos quanto aos efeitos deletérios destas infecções na saúde do hospedeiro. Um dos órgãos potencialmente mais afetados pela infecção por *H. polygyrus* seria o intestino, já que a maior parte de sua fase adulta ocorre no lúmen do intestino delgado, especificamente no duodeno (Monroy & Enriquez, 1992). Na literatura, o que se sabe sobre o efeito da infecção por *H. polygyrus* no intestino é controverso, sendo que foi demonstrado tanto um efeito deletério através do aumento da permeabilidade (Su, et al., 2011) e consequente redução na absorção de glicose (Marimoto, et al., 2016), quanto efeito protetor de danos na mucosa durante indução de colite (Sutton, et al., 2008). Alterações no intestino, como o aumento da permeabilidade intestinal, também podem ser observadas em modelos de indução de obesidade, o que acaba acarretando no desenvolvimento de inflamação e posteriormente em disfunções no metabolismo de glicose (Cani, et al., 2007). No entanto, estas alterações no intestino associadas à dieta hiperlipídica foram observadas em modelos longos de indução de obesidade, ex. 8 semanas (Sugimura, et al., 2019). Sendo assim, para verificar se a infecção e a administração de dieta hiperlipídica por cinco semanas exercem efeito sob a integridade do intestino no contexto do presente estudo, foi realizado o ensaio de permeabilidade intestinal.

Ao medir a difusão da radioatividade no sangue dos animais de ambos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica, não foi possível observar diferença neste parâmetro entre os grupos DIO Ct ($0,011 \pm 0,0071$ cpm/g) e DIO Inf ($0,012 \pm 0,0062$ cpm/g) (Fig. 8A). Além disso, o resultado obtido para ambos os grupos não difere do descrito na literatura para camundongos controle ($0,010$ cpm/g) (Trindade, et al., 2018), o que sugere que nem a dieta nem a infecção estejam influenciando este parâmetro no modelo experimental do presente estudo.

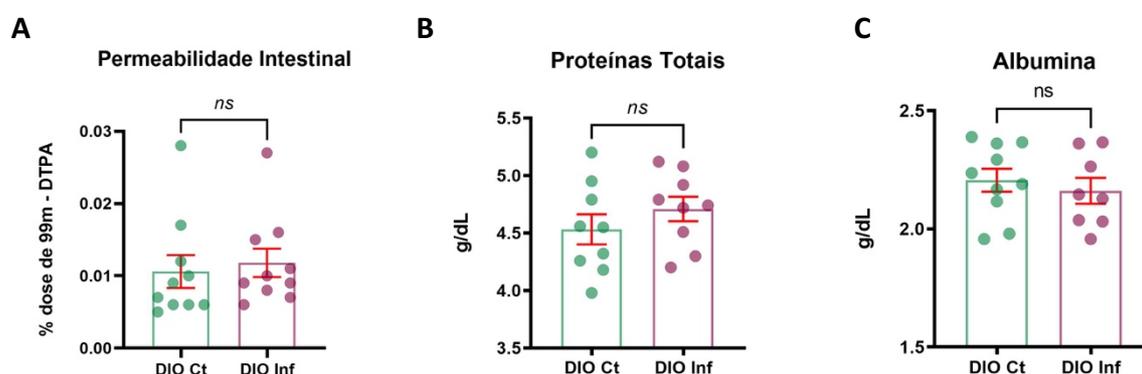


Figura 8: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* e dieta hiperlipídica não alteram parâmetros associados ao estado nutricional de camundongos C57BL/6. Permeabilidade intestinal inferida a partir da difusão da radioatividade no sangue, mensurada pela % da dose de DTPA (contagem de sangue por minuto/contagem por minuto da dose administrada) (A). Nível de proteínas totais (B) e albumina (C) no soro, mensurados a partir de kits enzimáticos, após cinco semanas de administração de dieta hiperlipídica. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (n=10). Two-tailed t test.

Ao não demonstrarmos influência da infecção por *H. polygyrus* na permeabilidade intestinal, observamos um fenômeno diferente do que é descrito em alguns trabalhos na literatura que evidenciam não só o aumento da permeabilidade devido a infecção por *H. polygyrus* (Shea-Donohue, et al., 2001; Chen, et al., 2005), como também alterações nas proteínas de *tigh junction* e e-caderinas (Su, et al., 2011). No entanto, há três fatores comuns entre eles que os diferem do presente estudo: 1. a utilização de camundongos BALB/c; 2; o uso de camundongos fêmeas; e 3. a análise do efeito da infecção após 7 dias da inoculação do parasito (Shea-Donohue, et al., 2001; Chen, et al., 2005; Su, et al., 2011). A que chama mais

atenção é o tempo de análise, já que o dia 7 pós infecção corresponde justamente a curta fase histotrófica da larva (Monroy & Enriquez, 1992). Até aproximadamente o nono dia pós infecção as larvas de *H. polygyrus* permanecem no tecido, podendo de fato estar associado a danos teciduais no hospedeiro (Fig. 9) (Monroy & Enriquez, 1992). Após esta fase, entretanto, as larvas migram para o lúmen do intestino onde permanecem pelo restante do seu ciclo de vida (Monroy & Enriquez, 1992). Sendo assim, podemos inferir que os efeitos observados previamente, 7 dias após a infecção, não estão sendo observados no presente estudo devido ao momento de análise, já que as alterações iniciais na permeabilidade podem ter sido restauradas ao longo do tempo. Essa possibilidade ganha suporte pelo trabalho de Sutton e colaboradores (2008), que demonstra que mesmo no contexto de indução de colite, após 14 dias de infecção, a presença do parasito está associada a um aumento na resistência da mucosa no cólon (Sutton, et al., 2008). Dessa forma, nossos dados contribuem para esclarecer que a infecção por *H. polygyrus* não prejudica a permeabilidade intestinal na fase crônica da infecção, fase relevante para os estudos de imunomodulação, sendo um modelo seguro para os estudos da influência da infecção helmíntica em doenças inflamatórias.

Apesar da literatura mostrar evidências de que o aumento no consumo de gorduras está relacionado com o aumento na permeabilidade intestinal (Brun, et al., 2007; Shea-Donohue, 2018), este efeito não foi observado no grupo DIO Ct. É provável que essa ausência na alteração da permeabilidade intestinal decorra do tempo reduzido em dieta hiperlipídica do nosso estudo, já que os estudos que avaliam o efeito dessa dieta na permeabilidade são realizados com tempo mínimo de 8 semanas (Sugimura, et al., 2019).

Além do teste de permeabilidade intestinal, foi mensurado o nível sérico de albumina, já que a redução na quantidade dessa proteína está associada não só com alterações intestinais, mas também funciona como indicativo de desnutrição (Morbarhan, 1988). Assim como no resultado de permeabilidade, o nível sérico de albumina dos dois grupos DIO não diferiu entre

si, além de estarem dentro do esperado (aproximadamente 2,25g/dL – corresponde a 47% do valor de proteínas totais) (Valor de albumina deve ser entre 46 e 58% do valor de proteínas totais (Zaias, et al., 2009)) (Fig. 8B/C).

A avaliação do estado nutricional dos camundongos é necessária em estudos de infecção helmíntica, pois a literatura mostra que a presença do parasito pode levar a um desbalanço nutricional no hospedeiro (Petkevicius, 2007). O primeiro ponto que vale a pena ressaltar é o fato de que a causa mais comum de desnutrição relacionada a infecções helmínticas ocorre devido a diminuição no consumo alimentar dos animais infectados (Petkevicius, 2007), o que não foi observado no presente estudo (Fig. 7B) e nem outros trabalhos similares (Hussaarts, et al., 2015) (Shimokawa, et al., 2019). Além disso, a literatura mostra que camundongos C57BL/6 são energeticamente mais eficientes na presença de infecção quando comparados com outras linhagens, o que significa que não alteram o gasto energético e nem o consumo calórico, e mesmo assim conseguem manter a estrutura corporal durante a infecção (Wong, et al., 2007). Associado a isso, foi possível observar que os níveis de albumina sérica se mantêm inalterados (Fig. 8C), sendo que a dosagem desta proteína corresponde ao indicador bioquímico mais utilizado para avaliação de desnutrição (Keller, 2019). A associação destes resultados leva a conclusão de que, no nosso estudo, a infecção não está sendo responsável por causar danos nutricionais ao hospedeiro. Outros testes, como de calorimetria indireta, poderiam ser aplicados para agregar informações não apenas a respeito do estado nutricional, mas também sobre a taxa metabólica basal (Even & Nadkarni, 2012), podendo ser considerados como perspectivas para investigações futuras. No entanto, se consideramos a literatura, o trabalho que fez análise de calorimetria indireta, avaliando consumo calórico momentâneo, atividade locomotora, gasto energético e troca respiratória, no contexto de dieta hiperlipídica e infecção por *S. mansoni*, não

observou diferença em nenhum dos parâmetros analisados entre os animais “infectado” e “não infectado” (Hussaarts, et al., 2015).

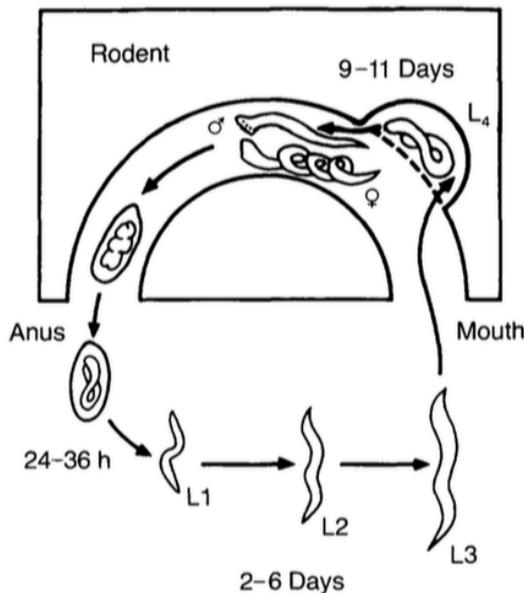


Figura 9: Ciclo de vida do *Heligmosomoides polygyrus*. A infecção ocorre por meio de ingestão de larvas em estágio, L3, que seguem para o intestino, para uma curta fase larval histotrófica. Durante esta fase as larvas amadurecem para L4 e após alguns dias de encistamento, migram para o lúmen do intestino aonde permanecem aderidas. No lúmen, a larva agora em fase adulta, inicia a produção de ovos, que são eliminados nas fezes. Fora do hospedeiro o ovo eclode, se tornando larva (L1) e amadurece no ambiente até o estágio infectante (L3). Fonte: Monroy e Enriquez (1992).

4.3. Infecção por *H. polygyrus* previne o início do desenvolvimento de alterações metabólicas resultantes da dieta hiperlipídica

Além de atenuar o ganho de peso, seria interessante verificar se a infecção seria capaz de prevenir o desenvolvimento de alterações metabólicas associadas a obesidade, já que estas resultam em consequências mais graves como diabetes tipo II, hipertensão e esteatose hepática (Singla, Bardoloi & Parkash, 2010). Inicialmente verificamos o efeito da infecção sob o metabolismo de glicose associado a funcionalidade das células β -pancreáticas. Constatamos que os animais alimentados com dieta hiperlipídica e infectados com *H. polygyrus* apresentaram menor nível sérico de glicemia ($163 \pm 2,9$ mg/dL), após jejum de 6 horas, quando comparados com animais não infectados ($189 \pm 6,1$ mg/dL) (Fig. 10A). Além disso, responderam melhor ao teste de tolerância à glicose retornando mais rapidamente ao nível basal de glicose no sangue (Fig. 10B/C). Ambos resultados indicam que a presença da infecção atenua o início de

disfunções no funcionamento da insulina. A resposta dos animais infectados à administração de insulina também foi mais eficiente que a dos não infectados, sendo a queda de glicose maior no grupo DIO Inf, o que sugere que a infecção melhora a sensibilidade à insulina (Fig. 10D/E).

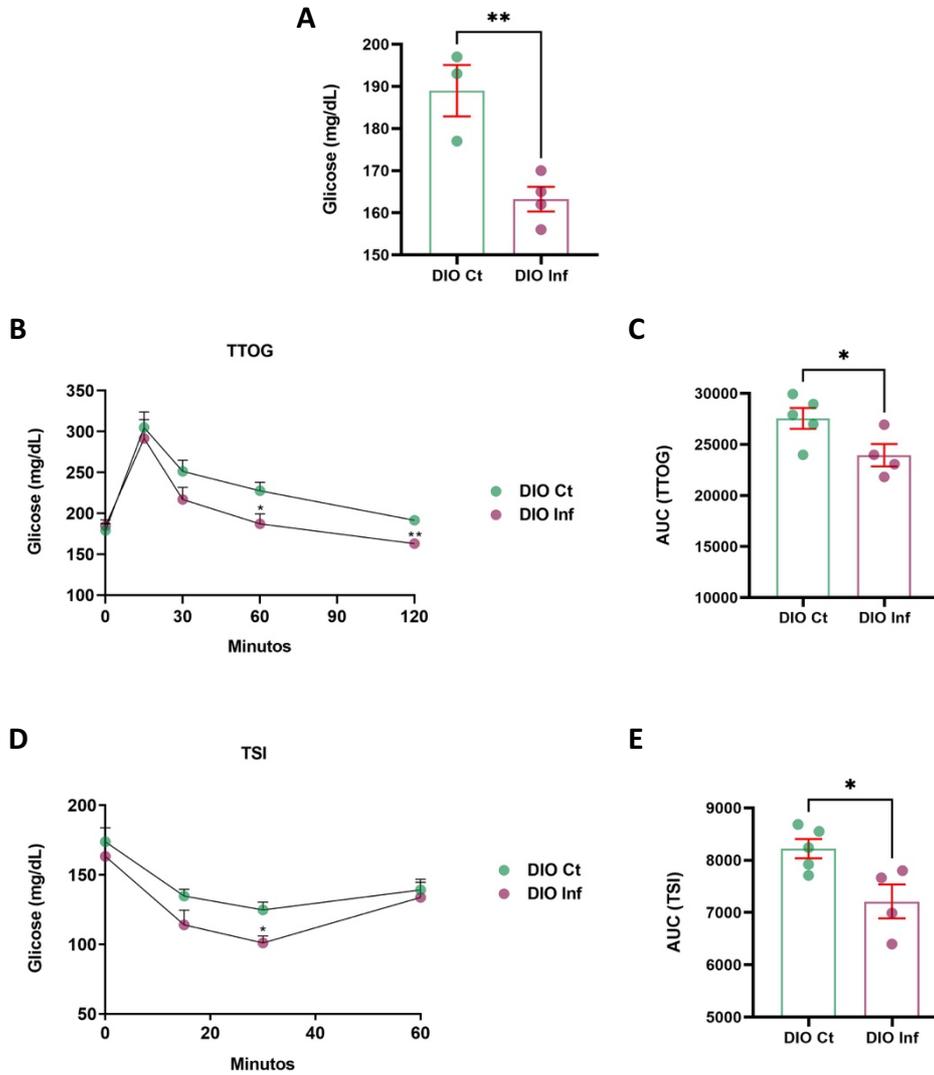


Figura 10: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* previne disfunções metabólicas associadas às células β -pancreáticas mesmo após administração de dieta hiperlipídica. Nível de glicose sérica após jejum de 6 horas (A). Nível de glicose no sangue, ao longo do tempo, após gavagem de glicose (TTOG) (B). Área sobre a curva (AUC) obtida a partir do TTOG (C). Nível de glicose no sangue, ao longo do tempo, após injeção intraperitoneal de insulina (TSI) (D). Área sobre a curva (AUC) obtida a partir do TSI (E). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (A-E n=5). Two-tailed t test. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Melhora na tolerância oral a glicose pós jejum de 6 horas, já foi relatada em estudo de infecção por *Litomosoides sigmodontis* associada à dieta hiperlipídica, tanto com apenas uma infecção quanto em experimento de reinfecções diárias (Berbudi, et al., 2016). No entanto, diferente do trabalho citado anteriormente, nosso estudo, além de observar diferença na tolerância à glicose, observa melhor sensibilidade à insulina (Fig. 10D/E) e controle do peso corporal (Fig. 7A) na presença do parasito. Inclusive o menor ganho de peso nos animais infectados pode ser considerado um dos responsáveis pela melhora no metabolismo de glicose, já que este está diretamente relacionado ao índice de massa corporal (Siegel, et al., 2008). Além disso, a manutenção fisiológica da sensibilidade à insulina é de extrema importância para o metabolismo em geral, pois o desenvolvimento da sua resistência e a consequente desregulação do metabolismo de glicose corresponde ao primeiro passo para desregulação em todo metabolismo energético (Wilcox, 2005). Assim como no presente estudo, outros trabalhos da literatura comprovaram melhorias em parâmetros associados à insulina (nível sérico de insulina e HOMA-IR) decorrentes da infecção tanto por *H. polygyrus* (Marimoto, et al., 2016), quanto por *N. brasiliensis* (Yang, et al., 2013) e *S. mansoni* (Hussaarts, et al., 2015) em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Os resultados vistos nessa seção podem ser comparados com estudos em humanos, já que em indivíduos previamente infectados com *Schistosoma* foi possível observar menores níveis de glicemia de jejum e glicose pós-prandial, assim como menor resistência à insulina (Chen, et al., 2013). Foi observado também em indivíduos diabéticos infectados com *Strongyloides stercoralis* menor nível sérico de insulina e glucagon quando comparado aos indivíduos não infectados, sendo essa diferença perdida após tratamento com anti-helmíntico (Rajamanickam, et al., 2018). Wiria e colaboradores (2015) mostra que na presença de infecção há melhora na sensibilidade à insulina, verificada a partir da diminuição de HOMA-IR em cinco diferentes infecções (*Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*,

Strongyloides stercoralis e *Trichuris trichiura*), além do que indivíduos que apresentaram mais de um parasito tiveram valor de HOMA-IR 0.10 menor para cada infecção adicional (Wiria, et al., 2015).

Após verificar melhora na ação da insulina devido a presença do parasito, surgiu-se a necessidade de averiguar o efeito da infecção no fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, já que este é um importante órgão não só para o metabolismo de glicose, como também para o metabolismo lipídico (Anstee & Goldin, 2006). A influência da infecção pôde ser observada desde o aspecto macroscópico, sendo a massa do fígado dos animais do grupo DIO Inf ($0,94 \pm 0,04$ g) significativamente menor que a dos animais do grupo DIO Ct ($1,10 \pm 0,03$ g) (Fig. 11A). Essa redução na massa reflete diretamente na quantidade de gordura/g deste órgão, já que esta também é menor no grupo DIO Inf (DIO Ct: $49,43 \pm 3,96$ mg; DIO Inf: $32,29 \pm 0,68$ mg) (Fig. 11B). Embora a administração de dieta hiperlipídica por 5 semanas possa parecer curta para a verificação de acúmulo de lipídeos no fígado, já foi demonstrado na literatura que dieta com menor porcentagem de gordura do que a utilizada no presente estudo é capaz de induzir este efeito tão cedo quanto após um mês de alimentação (VanSaun, et al., 2009). Observamos em nosso estudo que além de exercer melhora direta no acúmulo de gordura hepática, a infecção reduziu também o nível sérico de triglicerídeos (DIO Ct: $107,8 \pm 0,80$ mg/dL; DIO Inf: $98,53 \pm 1,61$ mg/dL) (Fig. 11C) e aumentou o de colesterol HDL (DIO Ct: $21,46 \pm 0,61$ mg/dL; DIO Inf: $25,67 \pm 1,13$ mg/dL) (Fig. 11D), apesar de não alterar o de colesterol total (DIO Ct: $209,9 \pm 4,70$ mg/dL; DIO Inf: $203,8 \pm 9,67$ mg/dL) (Fig. 11E).

O efeito protetor de *H. polygyrus* no desenvolvimento de dislipidemia em camundongos alimentados com DIO, já foi observado em estudos de infecção de curta (28 dias) (Shimokawa, et al., 2019) e longa duração (105 dias) (Su, et al., 2018), sendo que neste último foram encontrados resultados similares aos nossos, i.e. diminuição de triglicerídeos e manutenção do nível de colesterol total na presença do parasito. Associado a prevenção da dislipidemia (Fig.

11C), o menor ganho de peso (Fig. 7) e a manutenção do funcionamento da insulina (Fig. 10) podem explicar o menor acúmulo de gordura no fígado dos animais do grupo DIO Inf (Fig. 11B), já que o desenvolvimento da esteatose hepática está relacionado ao ganho exacerbado de peso e às desregulações metabólicas (Anstee & Goldin, 2006). Além disso, estudos prévios demonstraram que o efeito protetor da infecção no desenvolvimento de esteatose hepática pode ser mediado através da redução na expressão de genes associados a lipogênese (*PPAR γ* (Yang, et al., 2013), *Fasn*, *Acly*, *Acaca* (Su, et al., 2018)), já que o excesso de lipogênese leva ao desenvolvimento de esteatose hepática.

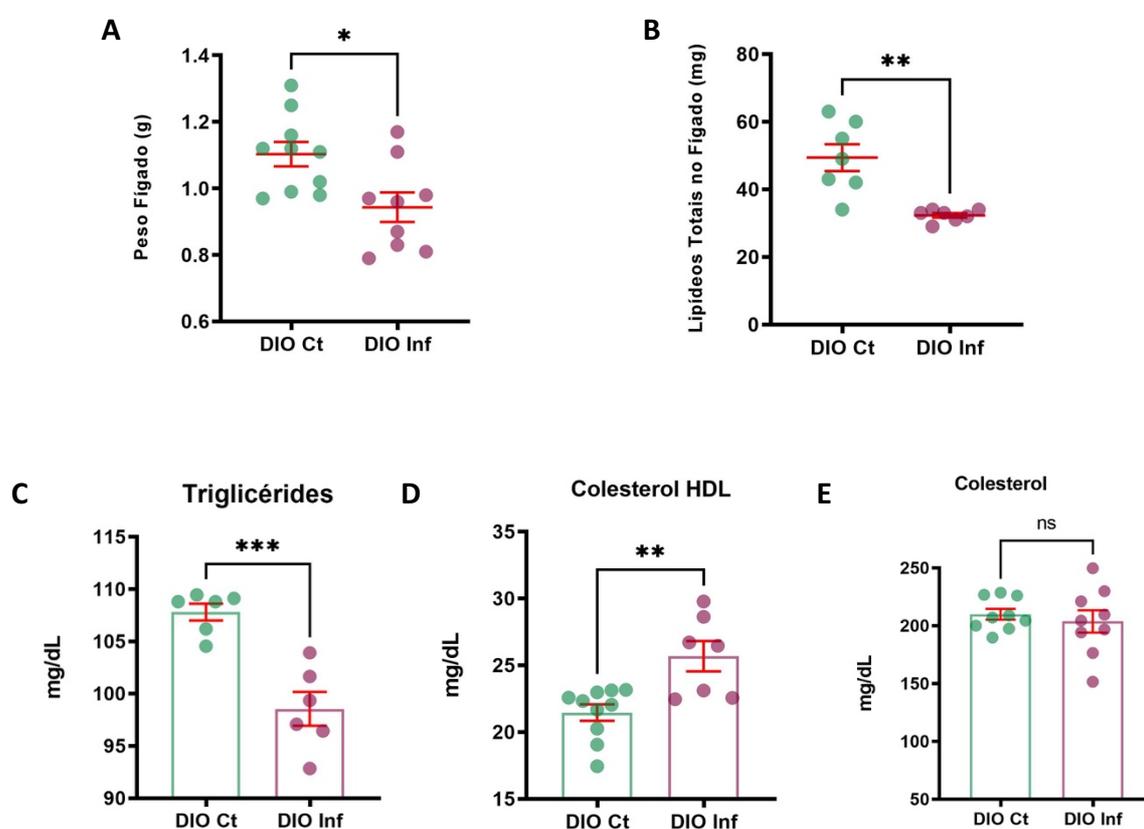


Figura 11: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* exerce papel crítico durante a administração de dieta hiperlipídica, evitando alterações morfológicas no fígado, bem como melhorando parâmetros séricos associados ao metabolismo lipídico. Peso do fígado (A). Quantificação hepática dos lipídeos, extraídos por FOLCH (B). Nível sérico de triglicerídeos (C), colesterol HDL (D) e colesterol total (E) após jejum de 16 horas. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (n=10). Two-tailed t test. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

4.4. Associação entre infecção por *H. polygyrus* e dieta hiperlipídica resulta em aumento da secreção de adipocitocinas reguladoras

Após observar as melhorias associadas ao metabolismo nos animais infectados, surgiu a necessidade de buscar explicações biológicas responsáveis por tais efeitos. Para isto, mensuramos a secreção de adipocitocinas pelas células do tecido adiposo epididimal. O tecido adiposo é o maior órgão endócrino do corpo, sendo responsável pela secreção de diversos hormônios, também chamados de adipocinas; como leptina, adiponectina e resistina, que são essenciais para a manutenção da homeostase metabólica (Tilg & Moschen, 2006; Cao, 2014). A adiponectina por exemplo, é considerada uma das principais adipocinas associadas ao metabolismo de glicose, agindo principalmente no músculo esquelético e fígado, potencializando o efeito da insulina (Berg, et al., 2001; Chandran, et al., 2003). Além das adipocinas, há no tecido adiposo uma elevada secreção de citocinas pelas células imunes presentes neste órgão e é bem claro na literatura que durante o processo de ganho de peso há alterações na secreção destas citocinas, que também acabam sendo responsáveis por gerar alterações metabólicas (Hotamisligil, 2017). Em indivíduos magros, há predominância de citocinas do tipo 2 e reguladoras (IL4, IL5, IL13, IL10), que estão associadas, por exemplo, com a manutenção da sensibilidade a insulina (Patel, Buras & Balasubramanyam, 2013). Já nos indivíduos obesos, ocorre maior produção de citocinas predominantemente de caráter inflamatório, como IFN- γ e IL6, relacionadas a intolerância a glicose (Patel, Buras & Balasubramanyam, 2013). Para se referir em conjunto as adipocinas e citocinas produzidas por células do tecido adiposo, a literatura utiliza a nomenclatura adipocitocina (Cao, 2014), e é devido ao importante papel que exercem no metabolismo que mensuramos o nível das mesmas.

Observamos que não há diferença na secreção das citocinas inflamatórias IL17A (DIO Ct: $0,32 \pm 0,15$ pg/mL; DIO Inf: $0,51 \pm 0,16$ pg/mL) (Fig. 12A), TNF (DIO Ct: $40 \pm 4,6$ pg/mL; DIO

Inf: $42 \pm 5,9 \text{ pg/mL}$) (Fig. 12B) e IL6 (DIO Ct: $7 \pm 0,79 \text{ pg/mL}$; DIO Inf: $7,6 \pm 1,4 \text{ pg/mL}$) (Fig. 12C) pelas células do tecido adiposo, de animais infectados ou não submetidos a dieta indutora de obesidade. No entanto, a concentração de TNF e IL6 apresenta valores aumentados quando comparados com animais em homeostase, de acordo com o que é descrito na literatura. Para TNF o valor basal secretado por células provenientes do tecido adiposo corresponde a 20 pg/mL (Santos, et al., 2019), enquanto para IL6 espera-se concentração entre 0,5 e 5 pg/mL (O'Neill, et al., 2013). Quando mensuramos as adipocitocinas associadas a homeostase, IL10 (DIO Ct: $1,3 \pm 0,44 \text{ pg/mL}$; DIO Inf: $3,9 \pm 0,74 \text{ pg/mL}$) (Fig. 12D) e adiponectina (DIO Ct: $197 \pm 70 \text{ pg/mL}$; DIO Inf: $1081 \pm 232 \text{ pg/mL}$) (Fig. 12E), verificamos que ambas apresentaram valores superiores nos animais infectados quando comparados aos não infectados.

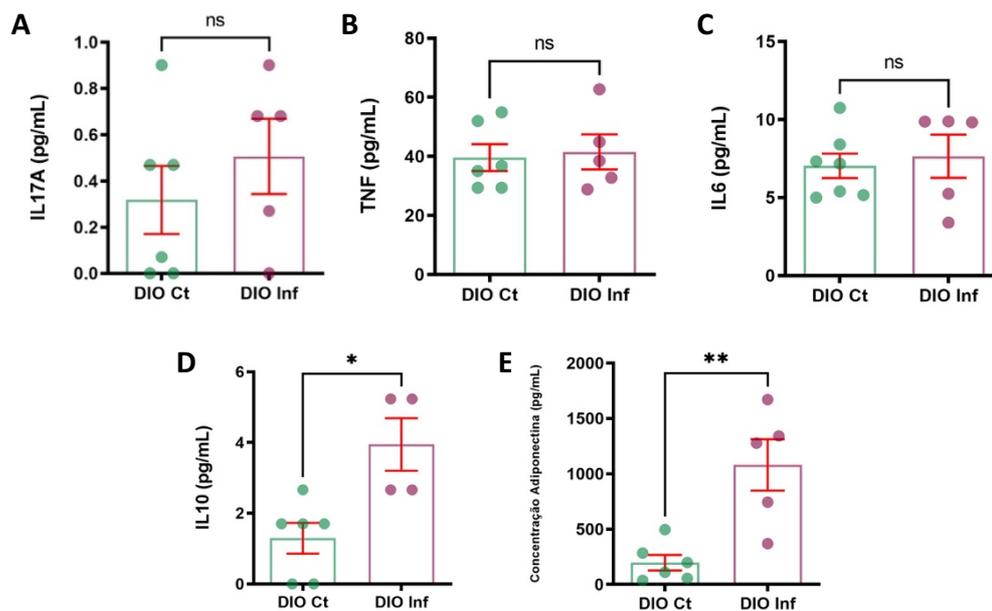


Figura 12: Infecção por *Heligmosomoides polygyrus* aumenta a secreção de adipocitocinas anti-inflamatórias, apesar de manter inalterada a produção das inflamatórias. Concentração em pg/mL, medido em ensaio de *Cytometric Bead Array*, das adipocitocinas IL17A (A), TNF (B), IL6 (C) e IL10 (D) no sobrenadante de cultura de células provenientes do tecido adiposo epididimal. Concentração de Adiponectina mensurada por ELISA no sobrenadante de cultura de adipócitos isolados do tecido adiposo epididimal. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (n=7). Two-tailed t test. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

O aumento de TNF e IL6 no tecido adiposo é um fenômeno observado em diversos trabalhos que utilizam dieta hiperlipídica (O'Neill, et al., 2013; Kern, et al., 2019; Santos, et al., 2019), inclusive em associação com infecção (Hussaarts, et al., 2015; Su, et al., 2018). IL6 é descrita por exercer papel deletério no metabolismo de glicose, já que o aumento na secreção desta citocina está associado ao início do estabelecimento de uma inflamação crônica, que leva a disfunções nas ilhotas pancreáticas, que a longo prazo ocasionam no desenvolvimento de diabetes tipo 2 (O'Neill, et al., 2013). No presente estudo observamos aumento na secreção de IL6 em ambos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica, porém a pior resposta a insulina só foi observada no grupo DIO Ct, sendo este efeito prevenido pela infecção com *H. polygyrus* (Fig. 10).

A secreção de TNF durante o processo de ganho de peso, leva a ativação de c-Jun N terminal kinase 1 e IKK que inibem a fosforilação em serina do IRS-1, levando a alterações na sensibilidade à insulina (Aguirre, et al., 2000). Observamos a secreção de níveis consideráveis de TNF em ambos os grupos, infectado e não infectado, que receberam dieta hiperlipídica no presente estudo, fenômeno que já foi observado em infecção por *S. mansoni* (Hussaarts, et al., 2015). Husaarts e colaboradores (2015) demonstram que apesar do aumento de TNF associado à dieta hiperlipídica, a infecção helmíntica melhora a resposta do TTOG e TSI, além de melhorar o nível sérico de insulina, o que demonstra que o aumento isolado desta citocina não é suficiente para induzir os efeitos deletérios no metabolismo. Junto ao aumento de TNF, o aumento de IL4 e IL5 no tecido adiposo gonadal, que estão associados a melhora na sensibilidade à insulina (Patel, Buras & Balasubramanyam, 2013), podem estar contrabalanceando o efeito de TNF (Hussaarts, et al., 2015). No caso do presente estudo, observamos aumento de IL10 (Fig. 12D) e adiponectina (Fig. 12E) no tecido adiposo. O aumento de IL10 é descrito em praticamente todos os estudos que demonstram os efeitos benéficos da infecção na indução de obesidade, sendo associado ao controle no

desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Marimoto, et al., 2016), melhora nos níveis séricos de triglicerídeos (Su, et al., 2018) e melhor sinalização e sensibilidade à insulina (Pace, et al., 2018). Dentre estes efeitos da IL10 descritos na literatura, a melhora no nível sérico de triglicerídeos e na sensibilidade à insulina foram também observados nos animais infectados do presente estudo, podendo o aumento desta citocina no grupo DIO Inf estar associado a estas melhorias. Além disso, o aumento na secreção de IL10 pode também estar auxiliando no menor acúmulo de gordura no fígado dos animais infectados, pois é descrito na literatura que a diminuição da secreção de IL10 em associação com o aumento de TNF torna o fígado mais sensível ao desenvolvimento de esteatose hepática (Day, 2002). O aumento na secreção de citocinas reguladoras devido a infecção não é observado em humanos, sendo que as melhorias metabólicas, como prevenção de diabetes tipo 2, estão associadas com menor secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Aravindhan, et al., 2010; Rajamanickam, et al., 2020).

A adiponectina é encontrada em abundância no plasma de pessoas saudáveis e suas elevadas concentrações indicam uma relação inversa com diversas alterações morfológicas e metabólicas como circunferência da cintura, quantidade de gordura visceral, nível de triglicerídeos, glicemia em jejum e insulina sérica, e também com o desenvolvimento de diabetes tipo II (Arita, et al., 1999; Ryo, et al., 2004; Li, et al., 2009). Além disso, o nível de colesterol HDL parece estar diretamente relacionado com a quantidade de adiponectina (Ryo, et al., 2004). Considerando a influência da adiponectina sobre os parâmetros citados anteriormente, menor ganho de peso (Fig. 7A), menor peso do tecido adiposo visceral (Fig. 7C) e subcutâneo (Fig. 7D), redução no nível sérico de glicose em jejum (Fig. 10A) e triglicerídeos (Fig. 11C), e aumento de colesterol HDL (Fig. 11D) foram efeitos que também observamos nos animais infectados no presente estudo, podendo estar associadas a maior secreção de adiponectina. O efeito indireto da importância da infecção na secreção de adiponectina e a

consequente influência desse hormônio no metabolismo de glicose também foi demonstrado em humanos, sendo que o tratamento com anti-helmíntico diminui a concentração de adiponectina, além de aumentar a de leptina, contribuindo para o aumento da resistência a insulina (Tahapary, et al., 2017).

4.5. Infecção helmíntica aumenta o número de células T reguladoras no tecido adiposo, além de evitar a migração de células inflamatórias para o mesmo tecido durante administração de dieta hiperlipídica

O estabelecimento e a manutenção da inflamação no tecido adiposo devido a alterações no infiltrado celular, que deixa de ter caráter regulador e anti-inflamatório e passa a ser pró-inflamatório, consiste no principal fator responsável pelo desenvolvimento de obesidade e suas doenças associadas (Gregor & Hotamisligil, 2011). Em contrapartida, a modulação do sistema imune devido a presença do parasito, ex. aumento de Th2/Tregs/Bregs, é descrita como a responsável por diminuir a inflamação e impedir o desenvolvimento das consequências associadas a doenças tipicamente inflamatórias (Bach, 2002). Ao observarmos menor ganho de peso e melhora no perfil metabólico no grupo DIO Inf, hipotetizamos que a infecção estaria sendo responsável por modular o sistema imune, reduzindo a migração de células inflamatórias e aumentando as células reguladoras. Para testar esta hipótese realizamos análises de citometria de fluxo, com ênfase nas subpopulações de células T, para caracterizar o perfil celular tecidual de cada grupo.

Considerando as subpopulações de células T auxiliares constatamos uma redução nas populações de caráter inflamatório Th1 (Fig. 13A/B) e Th17 (Fig. 13C/D) apenas no grupo que recebeu infecção por *H. polygyrus*. Além disso, o número de células Th2 por grama de tecido adiposo (Fig. 13E/F) foi maior no grupo DIO Inf, como já era esperado, pois infecções helmínticas de fato induzem este subtipo celular (Monroy & Enriquez, 1992). Por fim,

observamos uma maior quantidade de células Tregs, importante célula secretora de IL10, no grupo DIO Inf (Fig. 14).

Ao buscarem mecanismos imunológicos associados aos benefícios das diversas infecções helmínticas no ambiente de desenvolvimento de obesidade, vários estudos investigam a indução da ativação alternativa de macrófagos (Yang, et al., 2013; Hussaarts, et al., 2015; Berbudi, et al., 2016; Marimoto, et al., 2016; Pace, et al., 2018; Su, et al., 2018) pelo seu efeito no controle do peso corporal (Yang, et al., 2013; Hussaarts, et al., 2015; Su, et al., 2018), na manutenção da sensibilidade à insulina (Lumeng, Bodzin & Saltiel, 2007; Patel, Buras & Balasubramanyam, 2013), na tolerância à glicose (Berbudi, et al., 2016), na redução da inflamação (Viola, et al., 2019) e até na regulação da microbiota (Pace, et al., 2018). Dois subtipos celulares induzidos por infecções helmínticas podem auxiliar na diferenciação destes macrófagos: os eosinófilos e os linfócitos Th2. Os eosinófilos são uma das maiores fontes produtoras de IL4 sendo considerados o principal responsável pela manutenção dos macrófagos M2 no tecido adiposo (Wu, et al., 2011). A relação entre eosinófilos e macrófagos M2 é tão bem estabelecida que a maioria dos estudos que observam aumento de ativação alternativa de macrófagos, na conjuntura de dieta hiperlipídica e infecção, também demonstram aumento de eosinófilos (Hussaarts, et al., 2015; Berbudi, et al., 2016). Por outro lado, surpreendentemente poucos estudos investigaram a proporção e o efeito das células Th2 na obesidade associada a infecção, apesar destas células também serem importantes produtoras de citocinas responsáveis pela indução de macrófagos M2 (Kang, et al., 2008). Mesmo o presente estudo não verificando alterações na abundância de células da imunidade inata na infecção por *H. polygyrus* associada à dieta hiperlipídica, podemos inferir que uma possível explicação para os benefícios observados anteriormente (Figs. 7/10/11) seja a ação de células Th2, na ativação de eosinófilos e macrófagos. Além disso, o aumento na diferenciação de Th2 no tecido adiposo dos animais infectados pode também estar auxiliando na regulação negativa de células Th1 e Th17, cujo

aumento está associado a alimentação com dieta hiperlipídica (Ignacio, Kim & Kim, 2014) e com a disfunção metabólica (Zeng, et al., 2012). Essa redução de células inflamatórias no tecido adiposo do grupo DIO Inf, pode ainda ser mais um fator que contribui para a melhora observada no metabolismo lipídico, sendo, por exemplo, a proporção de Th1 descrita como negativamente correlacionada com o nível de colesterol HDL (Cheng, et al., 2019; Cai, Jin & Chen, 2021), exatamente como visto na Figura 13B e Figura 11D.

A ação das células Th2 também parece ser essencial para garantir uma menor deposição de gordura no fígado, já que camundongos deficientes em STAT6, um fator de transcrição essencial para o estabelecimento da resposta Th2, desenvolvem esteatose hepática quando alimentados com dieta hiperlipídica, mesmo na presença de infecção helmíntica (Yang, et al., 2013). Apesar disso, nesses mesmos camundongos há melhora no metabolismo de glicose, sugerindo que os efeitos da infecção advêm também de outros mecanismos independentes de Th2/M2 (Yang, et al., 2013). Alguns trabalhos avaliaram o papel de células Foxp3⁺ nos efeitos metabólicos associados a helmintos, porém obtiveram resultados ainda incertos. Berbudi e colaboradores (2016) mostraram que a administração de antígenos de *L. sigmodontis* resulta em aumento na transcrição de Foxp3 no tecido adiposo epididimal, porém a depleção das Tregs não implicou em reversão dos efeitos do helminto no metabolismo de glicose, inferindo que estas células não são responsáveis pelos benefícios observados (Berbudi, et al., 2016). Su e colaboradores (2018) por sua vez, apesar de verem resultados similares ao do presente estudo, como a diminuição na transcrição de T-bet, ROR γ t e aumento de GATA3 no linfonodo mesentérico, não observam alterações na transcrição de Foxp3 também neste órgão, em camundongos C57BL/6 infectados com *H. polygyrus* e alimentados com dieta hiperlipídica (Su, et al., 2018). Embora estes estudos prévios não demonstrem uma influência de células Tregs no contexto de infecção e dieta hiperlipídica, acreditamos que elas devem ser investigadas mais a fundo, até porque foi observada uma maior proporção destas células no grupo DIO Inf, além

do que a diminuição de Tregs é um efeito clássico induzido pela obesidade (Feuerer, et al., 2009).

O ambiente inflamatório estabelecido no tecido adiposo durante a obesidade é desfavorável para as Tregs que tendem a sair do tecido nestas condições (Feuerer, et al., 2009). Essa diminuição de Tregs além de estar associada com a manutenção da inflamação (Feuerer, et al., 2009), também influencia no desenvolvimento da resistência periférica à insulina e da aterosclerose (Cipolletta, et al., 2011). Como observado por este estudo, de fato o grupo que apresenta menor número de Tregs no tecido (Fig. 14) também tem maior proporção de células inflamatórias no tecido adiposo (Fig. 13B/D) e resistência periférica à insulina (Fig. 10D/E). Em contrapartida, no grupo infectado há maior número destas células, que podem estar sendo induzidas justamente pela presença de *H. polygyrus* (McSorley & Maizels, 2012). O aumento das Tregs no grupo DIO Inf esteve associado ao menor infiltrado inflamatório no tecido adiposo e a manutenção da homeostase metabólica, que já foi comprovada por estar associada a sustentação no número destas células (Feuerer, et al., 2009; Pereira, et al., 2014). Além disso, essas Tregs podem ser responsáveis pela maior produção de IL10 (Fig. 12D), já que foi comprovado que as Tregs residentes no tecido adiposo secretam altas quantidade desta citocina, maiores inclusive que as provenientes dos linfonodos, baço e pulmão (Feuerer, et al., 2009). Outros estudos também têm demonstrado o efeito benéfico de Tregs no metabolismo lipídico, já que a proporção de Tregs parece estar associada aos níveis plasmáticos de HDL (Rodriguez-Perea, et al., 2015; Cai, Jin & Chen, 2021). Este fato foi observado no presente estudo sendo que o grupo DIO Ct tem menor nível de colesterol HDL e menor número de Tregs, enquanto o oposto ocorre no grupo DIO Inf, maior nível sérico de HDL e maior porcentagem de Tregs no tecido adiposo.

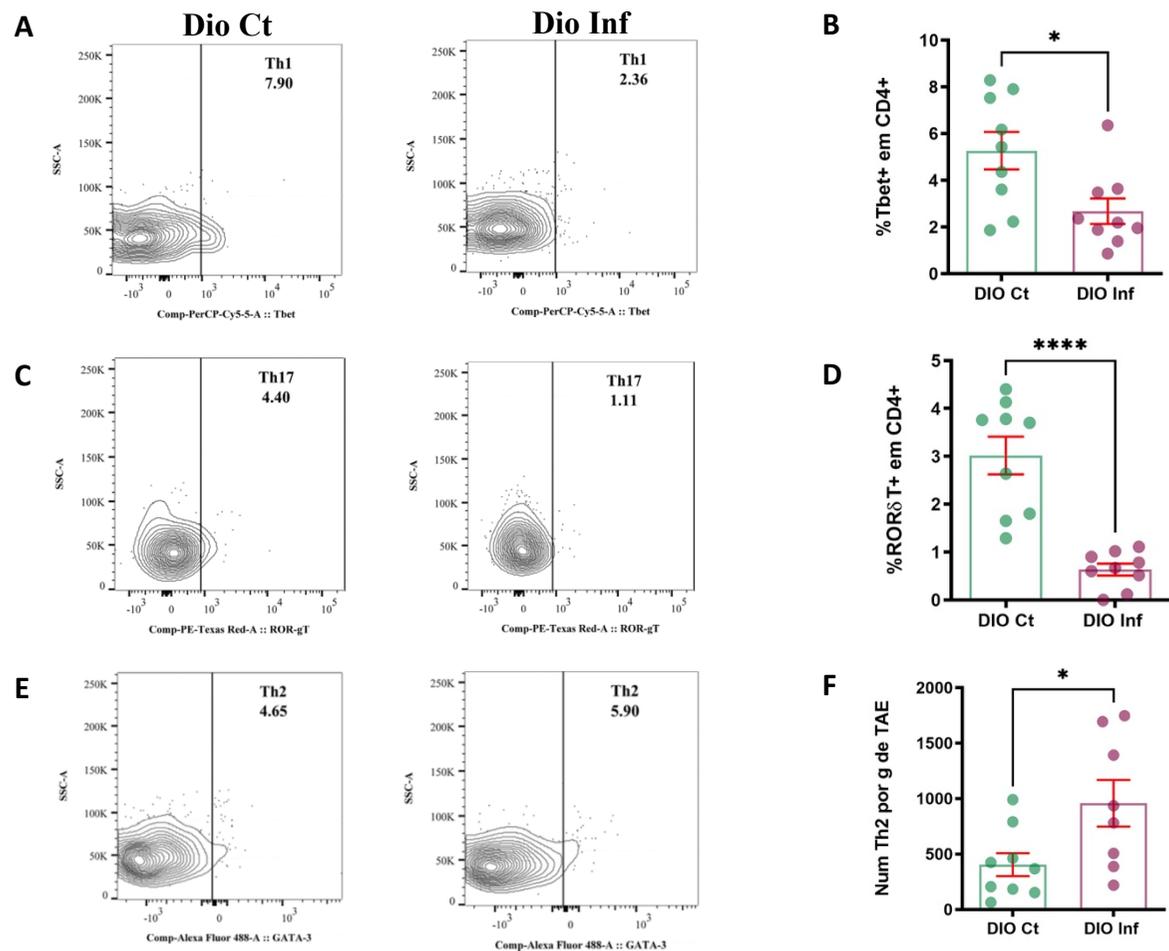


Figura 13: Infecção helmíntica altera o infiltrado inflamatório do tecido adiposo durante alimentação com dieta hiperlipídica, diminuindo a migração de células tipicamente inflamatórias Th1 e Th17, e aumentado a de Th2. *Contour Plots* representativos e porcentagem ou número de células/g de Th1 (A/B), Th17 (C/D) e Th2 (E/F) no tecido adiposo dos dois grupos estudados, obtidos através de análises de citometria de fluxo (n=10). Two-tailed t test. * p<0,05 ** p<0,0001.**

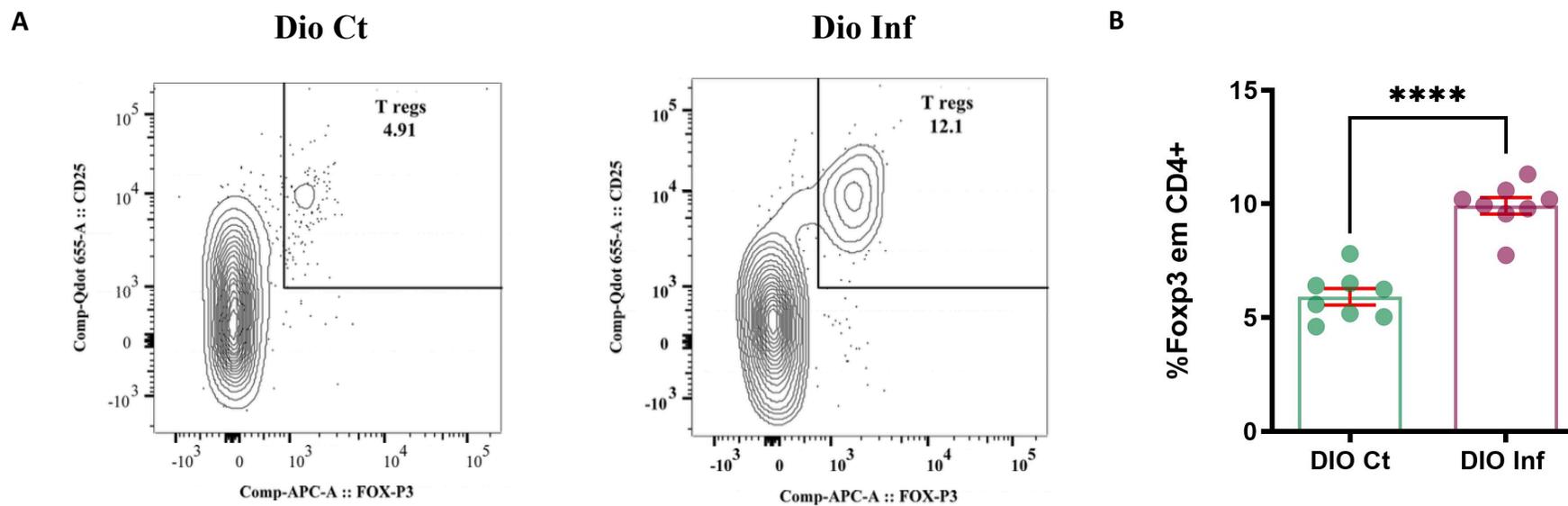


Figura 14: Infecção helmíntica impede a redução de células reguladoras no tecido adiposo de animais submetidos a dieta hiperlipídica. *Contour Plots* representativos (A) e porcentagem (B) de células Tregs no tecido adiposo dos dois grupos estudados, obtidos através de análises de citometria de fluxo (n=10). Two-tailed t test. **** p<0,0001.

4.6. Infecção helmíntica associada a dieta indutora de obesidade altera a expressão de marcadores de superfícies de células T reguladoras residentes no tecido adiposo

Com o intuito de compreender melhor a influência da infecção helmíntica no fenótipo das Tregs na obesidade, avaliamos a expressão de marcadores de superfícies altamente expressos nas Tregs residentes do tecido adiposo epididimal. Dentre os marcadores investigados, GITR, CD134 e CD152, estão associados com a funcionalidade de Tregs através da interação célula-célula (Feuerer, et al., 2009), enquanto o LAP é um marcador da secreção de TGF- β (Khalil, 1999). Esta avaliação do fenótipo é de extrema importância no contexto de dieta hiperlipídica, pois é discutido na literatura que o fenótipo das células Foxp3⁺ do tecido adiposo exerce influência nos parâmetros metabólicos (Feuerer, et al., 2009). Dentre os marcadores analisados, GITR (Fig. 15A/B/C) e CD152 (Fig. 15D/E/F) não apresentaram diferença em porcentagem, no número de células positivas/g de TAE e nem em MFI entre os grupos estudados. Já LAP (Fig. 15G/H/I) e CD134 (Fig. 15J/K/L) estão mais expressos em células Foxp3⁺ proveniente do grupo DIO Inf quando comparados com o grupo que não recebeu infecção. Ambos os parâmetros apresentam diferença na porcentagem de células (Fig. 15G/J) e MFI (Fig. 15I/L), porém apenas LAP também está aumentado quando se considera o número de células/g de TAE (Fig. 15H).

É descrito pela literatura que a alta expressão de GITR nas Tregs ocorre de maneira constitutiva, e está associada a ativação destas células (You, et al., 2009). De fato, observamos uma elevada expressão dessa proteína em ambos os grupos de estudo alcançando positividade em 90% das Tregs e se consideramos ela como um marcador de ativação, podemos inferir que as Tregs residentes no TAE estão sendo ativadas independentemente da infecção. Alguns trabalhos de infecção helmíntica mostram elevada regulação de GITR na superfície das Tregs (Taylor, et al., 2005; White, McManus & Maizels, 2020), o que contribui para a manutenção

do parasito, já que a inibição da expressão da mesma foi associada ao aumento da resposta de expulsão (Taylor, et al., 2005; D'Elia, et al., 2009). Como não observamos redução na expressão de GITR, podemos especular que essa característica das Tregs pode contribuir com a permanência crônica de *H. polygyrus* no hospedeiro. Já em relação ao metabolismo, foi demonstrado que o aumento da expressão de GITR induz a expansão de Tregs o que ocasiona atraso/prevenção do desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD (Cari, et al., 2020). Apesar da elevada expressão de GITR em ambos os grupos, como não houve diferença nesse parâmetro entre eles é possível inferir que os efeitos da infecção no metabolismo de glicose no grupo DIO Inf (Fig. 10) não estejam relacionadas com a expressão desse receptor.

CD152 também denominado de CTLA-4, corresponde a outro marcador de ativação das Tregs. O CTLA-4 ao se ligar a CD80 ou CD86 nas células dendríticas, inibe a ativação de células T efectoras pelas mesmas (White, McManus & Maizels, 2020). O aumento da expressão de CTLA-4 na superfície das Tregs é demonstrado em diversas infecções helmínticas como *Brugia malayi* (McSorley, et al., 2008), *L. sigmodontis* (Taylor, et al., 2007), *S. mansoni* (Walsh, Smith & Fallon, 2007), *Trichinella spiralis* (Ahn, et al., 2016) e *N. americanus* (Ricci, et al., 2011), estando associado a imunossupressão do hospedeiro o que contribuiu para a cronificação da infecção. Trabalhos que neutralizam CTLA-4, observam maior eliminação do parasito (Taylor, et al., 2007; Tang, et al., 2014), induzida pela acelerada e prolongada ativação de mastócitos e aumento de citocinas do tipo 2 (Blankenhaus, et al., 2011). White e colaboradores (2020) discutem que este aumento de CTLA-4 nas Tregs implica em células mais ativas, que poderiam potencialmente ser eficientes supressoras em doenças inflamatórias (White, McManus & Maizels, 2020). No presente estudo não foi possível verificar aumento dessa proteína nos animais infectados, o que mostra que assim como GITR, a indução desse marcador não parece ser responsável pela diminuição de células Th1 e Th17 no grupo DIO Inf. Como reforço disso, já foi descrito que a imunossupressão induzida por *H. polygyrus* é

dependente de CTLA-4 apenas nos estágios iniciais da infecção, sendo que após 21 dias estas moléculas passam a não exercer mais influência (Bowron, et al., 2020).

LAP se liga fortemente ao TGF- β de membrana, e quando entra em contato com outra célula leva a ativação desta citocina e a indução da resposta celular (Nakamura, Kitani & Strober, 2001). Nesse contexto, a indução da conversão de células CD4⁺ *naive* em Tregs, através da expressão de Foxp3, corresponde a uma das ações realizadas por estas células LAP⁺ (Zhao, Liao & Kang, 2017). Como no presente estudo observamos aumento de células LAP⁺ no tecido adiposo dos camundongos infectados, seria possível supor que a ativação dessa molécula estivesse levando ao aumento no número de Tregs no mesmo tecido. Extrapolando a influência desta célula para o metabolismo, a presença da mesma parece exercer efeito benéfico, sendo que em camundongos deficientes para leptina (ob/ob – modelo para estudos de diabetes tipo 2), a indução de Tregs LAP⁺ está associada a melhora no nível de glicose, e a redução da secreção de mediadores inflamatórios (IL6, IL17 e IFN- γ), além da diminuição da hiperplasia da células β -pancreáticas, do acúmulo de gordura no fígado e da inflamação do tecido adiposo (Ilan, et al., 2010; Cipolletta, et al., 2011). Já em camundongos ApoE^{-/-}, células CD4⁺ LAP⁺ estão associadas a melhora na aterosclerose (Ying-zhong, et al., 2013). Alguns desses efeitos induzidos por células LAP⁺ foram observados no presente estudo no grupo DIO Inf como melhorias no metabolismo de glicose (Fig. 10), menor esteatose hepática (Fig. 11) e menor inflamação no TAE (Figs. 12/13/14). Sendo assim, no presente contexto, as Tregs induzidas pela infecção parecem estar exercendo efeito, pelo menos parcial, nos parâmetros metabólicos e inflamatórios observadas, através da ação de LAP.

Por fim, CD134 ou Ox40, corresponde a outro marcador de ativação de Tregs, muito estudado no ambiente tumoral (Piconese, et al., 2014; Timperi, et al., 2016; Pacella, et al., 2018). A sinalização por Ox40 é conhecida por sustentar o funcionamento de Tregs, promovendo a expansão de células previamente quiescentes, em células estáveis e supressivas,

responsáveis por garantir a homeostase (Piconese, et al., 2010; Piconese, et al., 2014; Deng, et al., 2019). Assim como LAP, foi observado aumento na expressão de Ox40 no grupo DIO Inf e devido às suas características podemos sugerir que este receptor também está associado não só com o aumento no número de Tregs no TAE, bem como com a capacidade supressora das mesmas, observada através da redução das células inflamatórias Th1 e Th17.

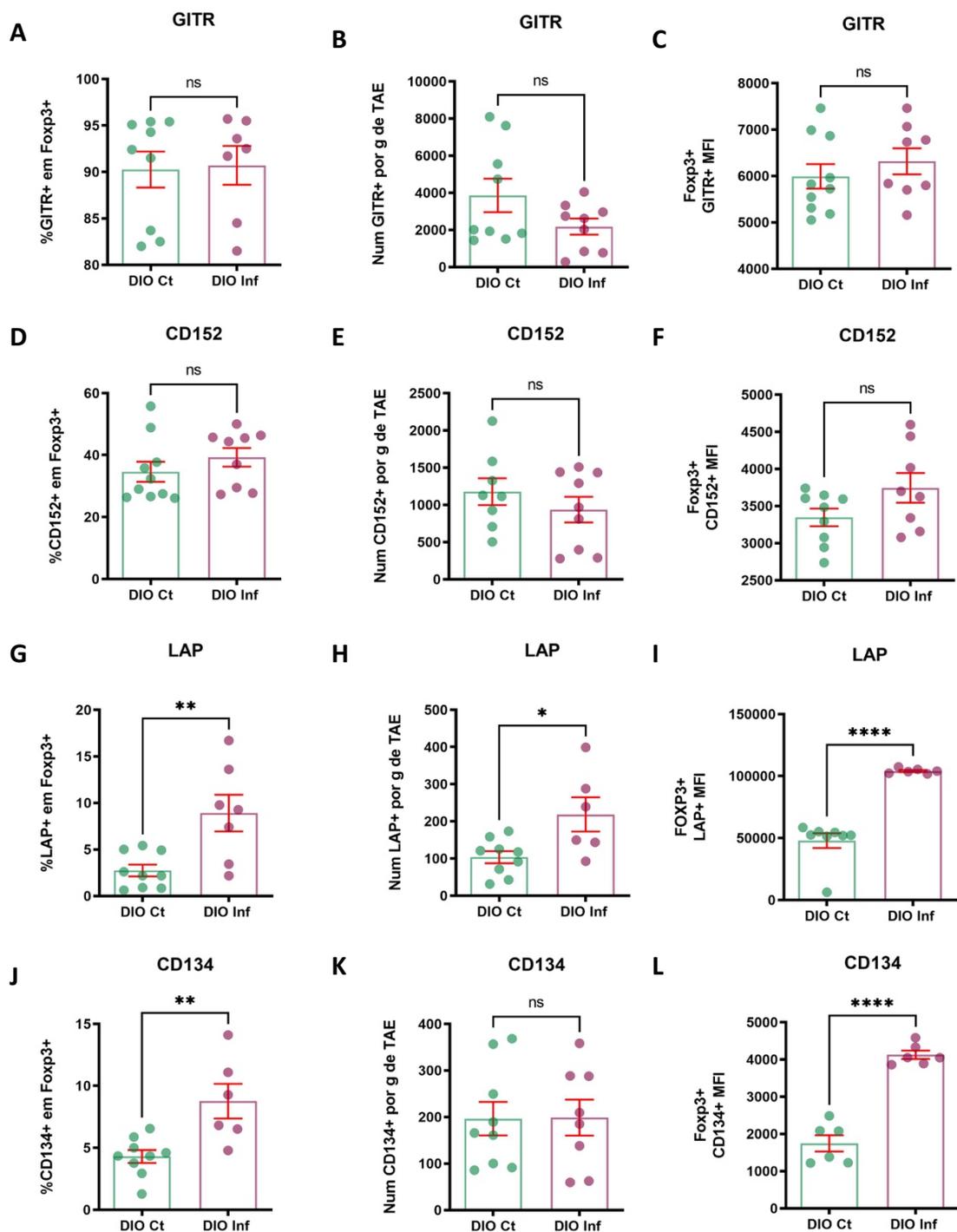


Figura 15: Infecção helmíntica induz a expressão de LAP e CD134 nas Tregs residentes no tecido adiposo, o que pode estar associado às melhorias metabólicas e inflamatórias observadas anteriormente. Porcentagem, número de células/g de TAE e MFI de Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^+Fosp3^+$) $GITR^+$ (A/B/C), $CD152^+$ (D/E/F), LAP^+ (G/H/I) e $CD134^+$ (J/K/L), dos dois grupos de estudo, obtidos através de citometria de fluxo. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (n=10). Two-tailed t test. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$.

4.7. Infecção por *H. polygyrus* protege as células Tregs de perder a capacidade supressiva induzida pela dieta hiperlipídica

A influência do microambiente nas células imunes não está restrita a alterações fenotípicas, sendo descrito na literatura, por exemplo, que células Foxp3⁺ podem perder a função supressora e de controle imune em condições inflamatórias (Barbi, Pardoll & Pan, 2014). Como visto no presente estudo, a infecção helmíntica é capaz de alterar a expressão de marcadores fenotípicos de Tregs, mesmo em uma condição tipicamente inflamatória, como no caso de alimentação com dieta hiperlipídica. Dentre estas alterações fenotípicas, observamos o aumento de células Ox40⁺ (Fig. 15J/L) e, devido ao fato desse receptor estar associado a capacidade supressiva das Tregs (Piconese, et al., 2014; Timperi, et al., 2016), surgiu a necessidade de compreendermos se a influência da infecção helmíntica no fenótipo das Tregs estende-se também à imunocompetência destas células. Para isto realizamos ensaio *in vitro*, com diferentes proporções de Tregs e Teft, no qual o intuito foi verificar a capacidade das células reguladoras em inibir a proliferação das efetoras.

A proliferação basal das células Teft foi de cerca de 40% (Fig. 16). Observamos que os camundongos do grupo DIO Ct desenvolveram importante disfunção das células Tregs e foram incapazes de inibir a proliferação das células Teft em todas as concentrações utilizadas. Por outro lado, a infecção com *H. polygyrus* foi capaz de reverter essa disfunção e observamos inibição da proliferação nas proporções 4:1 e 2:1.

O aumento na secreção de citocinas inflamatórias, especialmente IL6 e TNF, tem sido discutido como um dos fatores associados a perda de função das Tregs (Barbi, Pardoll, & Pan, 2014). A produção de IL6 pode não só impedir a indução de Tregs (Kimura & Kishimoto, 2010) como também alterar a transcrição de genes dessas células, fazendo com que adquiram perfil similar às Th17, inclusive secretando IL17 (Zheng, Wang & Horwitz, 2008). Já TNF é um regulador negativo da função de Tregs, podendo desestabilizar a expressão de Foxp3 e resultar

na deficiência de indução, frequência e estabilidade fenotípica das Tregs (Valencia, et al., 2006; Barbi, Pardoll, & Pan, 2014). De fato, no presente estudo, observamos aumento na produção destas citocinas em ambos os grupos de estudo (Fig. 12B/C), porém estas parecem estar exercendo efeito apenas nas Tregs dos animais não infectados, provavelmente devido ao contrabalanço de outros parâmetros anti-inflamatórios presentes no grupo DIO Inf, como o aumento na secreção de IL10 (Fig. 12D) e no número células Th2 (Fig. 13F). Um outro mecanismo interessante descrito na literatura é a capacidade de células Foxp3⁺ expressarem GATA3, sendo essa expressão crucial para a estabilidade, acúmulo e funcionalidade das Tregs (Wang, Su & Wan, 2011; Wohlfert, et al., 2011; Rudra, et al., 2012). Considerando este fato, já que a infecção é capaz de aumentar células Th dependentes de GATA3, talvez ela possa induzir a expressão dessa molécula também nas Tregs, o que acarretaria na manutenção do funcionamento das células Tregs no grupo DIO Inf mesmo na presença de citocinas inflamatórias. Essa especulação pode ser uma ideia interessante a ser investigada em estudos futuros.

A perda da capacidade supressora das Tregs já foi descrita por influenciar diferentes efeitos em contextos diversos, como por exemplo nos transplantes. Liu e colaboradores (2020) buscaram explicar porquê pessoas que têm hepatite autoimune apresentam pior prognóstico pós transplante hepático quando comparados com pacientes que apresentaram falha no fígado devido a hepatite B e constataram que este fato está relacionado com a perda de função das Tregs (Liu, et al., 2020). Em obesidade, Smith e colaboradores (2020) demonstraram que Tregs provenientes do tecido adiposo, mas não do sangue periférico, de indivíduos obesos apresentam menor capacidade supressora associada ao maior nível de expressão de marcadores de exaustão, com PD-1 (Smith, et al., 2020). Este estudo aponta ainda que a maior exaustão das Tregs poderia também explicar a diminuição da abundância das Tregs no tecido adiposo. Para camundongos, um outro estudo demonstrou que PPAR γ exerce papel crítico na acumulação,

fenótipo e função das Tregs, sendo necessário inclusive para restaurar a sensibilidade à insulina em camundongos obesos (Cipolletta, et al., 2012). Ambos os estudos trazem conceitos importantes para o presente trabalho, já que as alterações observadas nas Tregs (acúmulo, fenótipo e função), poderiam ser explicadas por um ou os dois mecanismos.

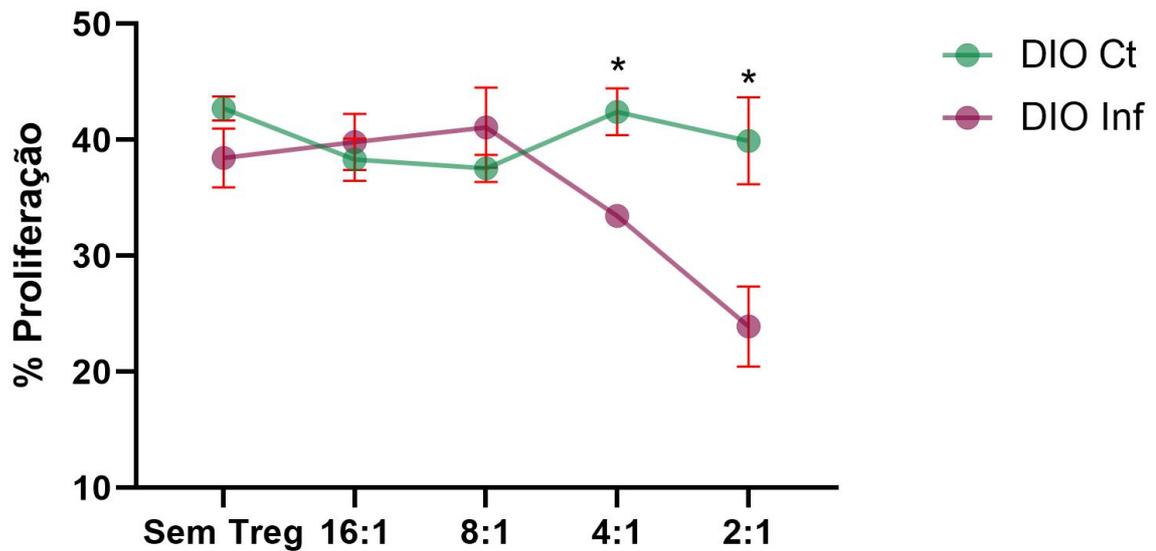


Figura 16: Infecção por *H. polygyrus* evita perda de função das células Tregs, residentes no tecido adiposo, ocasionada pela alimentação com dieta indutora de obesidade. Porcentagem de proliferação das células T efetoras (Teff), em ensaio *in vitro* com diferentes proporções de células T reguladoras. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média e representativos de um experimento (n=10). Two-tailed t test. * p<0,05.

5. CONCLUSÃO

A influência benéfica mediada por infecções diversas, principalmente helmínticas, no desenvolvimento de doenças alérgicas e autoimunes é discutida na literatura desde os anos 90, sendo corroborada por várias evidências epidemiológicas e experimentais. No entanto, o efeito das infecções no contexto de doenças metabólicas ainda é incipiente e controverso, especialmente em relação aos mecanismos imunológicos induzidos pelos parasitos, que acabam modificando o perfil imunometabólico. O presente trabalho vem corroborar com o fato de que a infecção por *Heligmosomoides polygyrus*, é capaz de prevenir o ganho exacerbado de peso, mesmo na administração de dieta hiperlipídica, além de observar melhora no metabolismo lipídico e de glicose, bem como menor evidência de inflamação. No entanto, é a primeira vez na literatura que foi demonstrado que estes efeitos benéficos parecem estar fortemente relacionados a manutenção no número e funcionalidade das células T reguladoras, além da modulação no fenótipo das mesmas, que passam a expressar mais marcadores associados a ativação (Ox40) e secreção de TGF- β (LAP). Acreditamos que a indução de células T reguladoras, pela presença do helminto, regula o estabelecimento de inflamação, induzida pela dieta hiperlipídica, aumentando por exemplo a secreção de IL10 e impedindo o efeito deletério da ação de citocinas inflamatórias no metabolismo de glicose. Esse aumento na secreção de IL10, adiponectina, bem como a ativação das células LAP⁺ já foram descritos na literatura por estarem associados com efeitos metabólicos benéficos como melhor resposta à insulina e a prevenção de dislipidemia. Células LAP⁺ e OX40⁺ também estão associadas a inibição de células inflamatórias Th1 e Th17. Além disso, há aumento de células Th2 também induzido pela infecção que, além de auxiliar na produção da IL10, pode também estar relacionado a indução de macrófagos M2, que por sua vez são conhecidos por auxiliar no controle do ganho

de peso, na resposta a insulina e na diminuição do acúmulo de gordura no fígado. O resumo destes mecanismos está representado na figura 17.

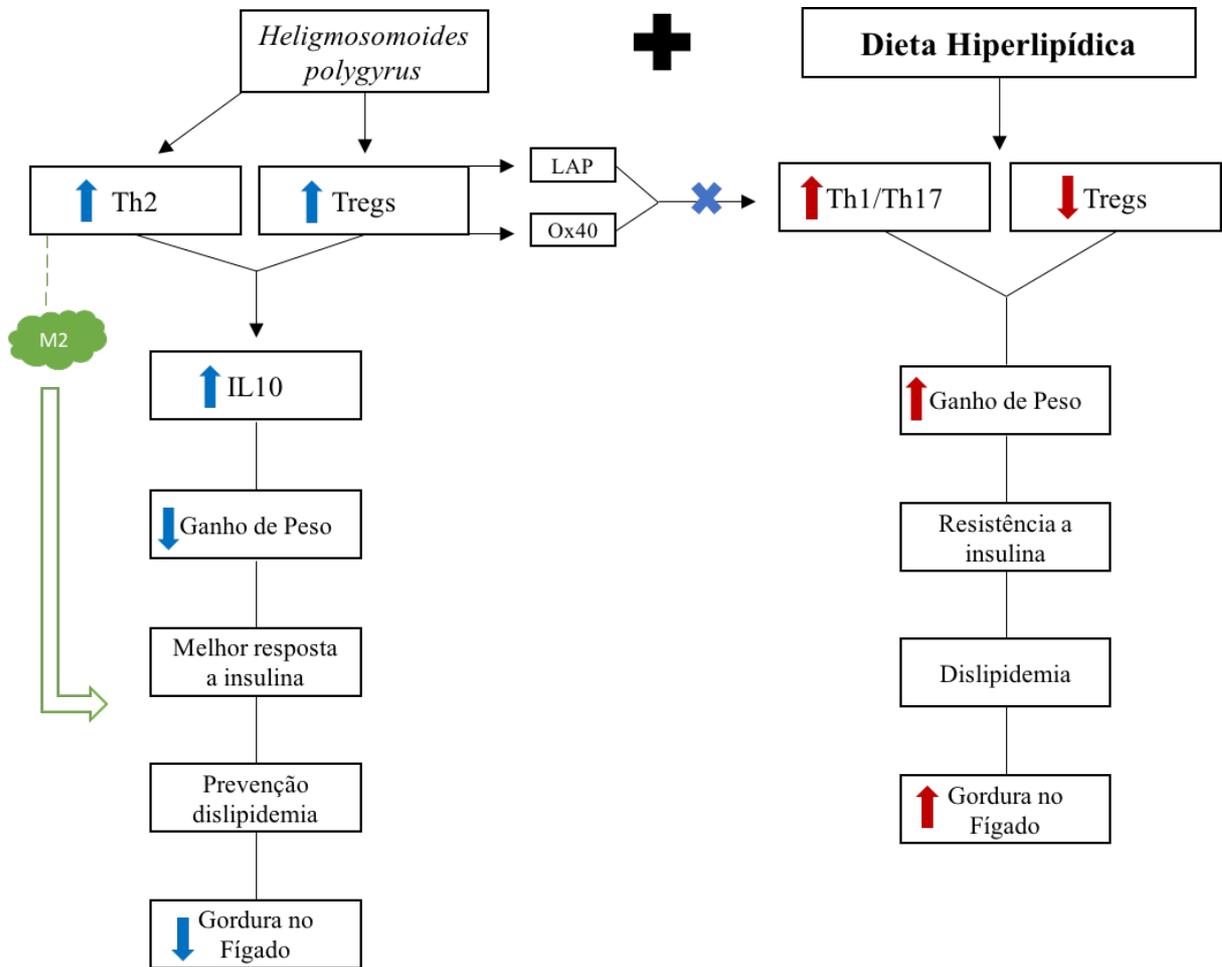


Figura 17: Modelo hipotético representando os potenciais mecanismos pelos quais *Heligmosomoides polygyrus* modula o ganho de peso e o metabolismo do hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 275, pp. 9047-54.
- Ahn, J. B., Kang, S. A., Kim, D. H., & Yu, H. S. (2016). Activation and Recruitment of Regulatory T Cells via Chemokine Receptor Activation in *Trichinella spiralis*-Infected Mice. *KOREAN J PARASITOL*, 54, pp. 163-171.
- Akagiri, S., Naito, Y., Ichikawa, H., Mizushima, K., Takagi, T., Handa, O., & et al. (2008). A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr*, 42, pp. 150-157.
- Allain, C. C., Poon, L. S., Cicely, S. G., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin Chem*, 20, pp. 470-475.
- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol*, 11, pp. 375-388.
- Anstee, Q. M., & Goldin, R. D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*, 87, pp. 1-16.
- Aravindhan, V., Mohan, V., Surendar, J., Rao, M. M., Pavankumar, N., Deepa, M., & et al. (2010). Decreased Prevalence of Lymphatic Filariasis among Diabetic Subjects Associated with a Diminished Pro-Inflammatory Cytokine Response (CURES 83). *PLoS Negl Trop Dis*, 4, p. e707.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., & et al. (1999). Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257, pp. 79-83.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 347, pp. 911-20.
- Bach, J. F. (2018). The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol*, 18, pp. 105-120.
- Bager, P., Arved, J., Ronborg, S., Wohlfahrt, J., Poulsen, L. K., Tine, W., & et al. (2010). *Trichuris suis* ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*, 125, pp. 123-30.
- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., & Wright, A. L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med*, 343, pp. 538-43.
- Bansemir, A. D., & Sukhdeo, M. V. (1994). The food resource of adult *Heligmosomoides polygyrus* in the small intestine. *J Parasitol*, 80, pp. 24-28.
- Barbi, J., Pardoll, D. M., & Pan, F. (2014). Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol Rev*, 259, pp. 115-139.
- Bellantuono, I., de Cabo, R., Ehninger, D., Di Germanio, C., Lawrie, A., Miller, J., & et al. (2020). A toolbox for the longitudinal assessment of healthspan in ageing mice. *Nat Protoc*, 15, pp. 540-574.

- Berbudi, A., Surendar, J., Ajendra, J., Gondorf, F., Schmidt, D., Neumann, A. L., & et al. (2016). Filarial Infection or Antigen Administration Improves Glucose Tolerance in Diet-Induced Obese Mice. *J Innate Immun*, 8, pp. 601-616.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 8, pp. 947-953.
- Bhargava, P., Li, C., Stanya, K. J., Jacobi, D., Dai, L., Liu, S., & et al. (2012). Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nature Medicine*, 18, pp. 1665-1672.
- Blankenhaus, B., Klemm, U., Eschbach, M.-L., Sparwasser, T., Huehn, J., Kuhl, A. A., & et al. (2011). *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *J Immunol*, 186, pp. 4295-305.
- Bodansky, H. J., Staines, A., Stephenson, C., Haigh, D., & Cartwright, R. (1992). Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ*, 304, pp. 1020-1022.
- Bordes, F., & Morand, S. (2009). Coevolution between multiple helminth infestations and basal immune investment in mammals: cumulative effects of polyparasitism? *Parasitol Res*, 106, pp. 33-37.
- Bowron, J., Aiyaratne, A., Luzzi, M. C., Szabo, E., & Finney, C. A. (2020). Suppressive mechanisms by *Heligmosomoides polygyrus*-induced Tregs in C57BL/6 mice change over time and differ to that of naïve mice. *Eur J Immunol*, 50, pp. 1167-1173.
- Broadhurst, M. J., Leung, J. M., Lim, K. C., Girgis, N. M., Gundra, U. M., Fallon, P. G., & et al. (2012). Upregulation of Retinal Dehydrogenase 2 in Alternatively Activated Macrophages during Retinoid-dependent Type-2 Immunity to Helminth Infection in Mice. *PLoS Pathog*, 8, p. e1002883.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V. D., Buda, A., Pinzani, M., Palu, G., & et al. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, pp. G518-25.
- Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52, pp. 102-110.
- Cai, F., Jin, S., & Chen, G. (2021). The Effect of Lipid Metabolism on CD4⁺ T Cells. *Mediators of Inflammation*, 2021, p. 6634532.
- Camberis, M., Le Gros, G., & Urban Jr, J. (2003). Animal Model of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Current Protocols in Immunology*, 55, pp. 19.12.1-19.12.27.
- Camilleri, M., Malhi, H., & Acosta, A. (2017). Gastrointestinal Complications of Obesity. *Gastroenterology*, 152, pp. 1656-1670.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., & et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, pp. 1761-72.
- Cao, H. (2014). Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. *J Endocrinol*, 220, pp. T47-T59.

- Cardwell, C. R., Stene, L. C., Joner, G., Bulsara, M., Cinek, O., Rosenbauer, J., & et al. (2011). Birth order and childhood type 1 diabetes risk: a pooled analysis of 31 observational studies. *Int J Epidemiol*, *40*, pp. 363-374.
- Cari, L., Montanucci, P., Basta, G., Petrillo, M. G., Ricci, E., Pescara, T., & et al. (2020). Microencapsulated G3C Hybridoma Cell Graft Delays the Onset of Spontaneous Diabetes in NOD Mice by an Expansion of Gitr + Treg Cells. *Diabetes*, *69*, pp. 965-980.
- Chandran, M., Phillips, S. A., Ciaraldi, T., & Henry, R. R. (2003). Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone? *Diabetes Care*, *26*, pp. 2442-2450.
- Chen, C. C., Louie, S., McCormick, B. A., Walker, W. A., & Shi, H. N. (2005). Concurrent infection of an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric *Citrobacter rodentium* and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. *Infect Immun*, *73*, pp. 5468-5481.
- Chen, Y., Lu, J., Huang, Y., Wang, T., Xu, Y., Li, M., & et al. (2013). Association of Previous Schistosome Infection With Diabetes and Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study in Rural China. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*, pp. E283-E287.
- Cheng, L., Yang, F., Cao, X., Li, G. Q., Lu, T. T., Zhu, Y. Q., & al, e. (2019). The effect of short-term intensive insulin therapy on circulating T cell subpopulations in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, *149*, pp. 107-114.
- Cipolletta, D., Feuerer, M., Li, A., Kamei, N., Lee, J., Shoelson, S. E., & et al. (2012). PPAR γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose-tissue Treg cells. *Nature*, *486*, pp. 549-553.
- Cipolletta, D., Kolodin, D., Benoist, C., & Mathis, D. (2011). Tissue Tregs: A unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism. *Seminars in Immunology*, *23*, pp. 431-437.
- Collison, L. W., & Vignali, D. A. (2011). In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol Biol*, *707*, pp. 21-37.
- Cooper, P. J., Espinel, I., Paredes, W., Guderian, R. H., & Nutman, T. B. (1998). Impaired Tetanus-Specific Cellular and Humoral Responses following Tetanus Vaccination in Human Onchocerciasis: A Possible Role for Interleukin-10. *J Infect Dis*, *178*, pp. 1133-1138.
- Cording, S., Medvedovic, J., Aychek, T., & Eberl, G. (2016). Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat Immunol*, *17*, pp. 755-757.
- Croese, J., Giacomini, P., Navarro, S., Clouston, A., McCann, L., Dougall, A., & et al. (2015). Experimental hookworm infection and gluten microchallenge promote tolerance in celiac disease. *J Allergy Clin Immunol*, *135*, pp. 508-16.
- Croese, J., O'Neils, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W., Pritchard, D., & et al. (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut*, *55*, pp. 136-137.
- Crowe, J., Lumb, F. E., Doonan, J., Broussard, M., Tarafdar, A., & Pineda, M. A. (2019). Parasitic worm-derived ES-62 promotes health- and life-span in high calorie diet-fed mice. *bioRxiv*.

- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*, *23*, pp. 804-814.
- Daveson, J. A., Jones, D. M., Gaze, S., McSorley, H., Clouston, A., Pascoe, A., & et al. (2011). Effect of Hookworm Infection on Wheat Challenge in Celiac Disease – A Randomised Double-Blinded Placebo Controlled Trial. *PLoS One*, *6*, p. e17366.
- Day, C. P. (2002). Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *16*, pp. 663-678.
- DeFuria, J., Belkina, A. C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J. D., Nersesova, Y. R., & et al. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci USA*, *110*, pp. 5133-8.
- D'Elia, R., Behnke, J. M., Bradley, J. E., & Else, K. J. (2009). Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival. *J Immunol*, *182*, pp. 2340-8.
- Deng, T., Suo, C., Chang, J., Yang, R., Li, J., Cai, T., & et al. (2019). ILC3-derived OX40L is essential for homeostasis of intestinal Tregs in immunodeficient mice. *Cell Mol Immunol*, *17*, pp. 163-177.
- Doenhoff, M. J., Stanley, R. G., Griffiths, K., & Jackson, C. L. (2002). An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology*, *125*, pp. 415-421.
- Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A.-C., & Genuneit, J. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *N Engl J Med*, *364*, pp. 701-709.
- Elliott, D. E., & Weinstock, J. V. (2017). Nematodes and human therapeutic trials for inflammatory disease. *Parasite Immunol*, *39*.
- Even, P. C., & Nadkarni, N. A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *303*, pp. R459-R476.
- Fader, A. N., Arriba, L. N., Frasure, H. E., & von Gruenigen, V. E. (2009). Endometrial cancer and obesity: Epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol*, *114*, pp. 121-127.
- Fan, R., Toubal, A., Goni, S., Drareni, K., Huang, Z., Alzaid, F., & et al. (2016). Loss of the co-repressor GPS2 sensitizes macrophage activation upon metabolic stress induced by obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*, *22*, pp. 780-91.
- Farre, R., Fiorani, M., Rahiman, S. A., & Matteoli, G. (2020). Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. *Nutrients*, *12*, p. 1185.
- Feary, J. R., Venn, A. J., Mortimer, K., Brown, A. P., Hooi, D., Falcone, F. H., & et al. (2010). Experimental hookworm infection: a randomized placebo-controlled trial in asthma. *Clin Exp Allergy*, *40*, pp. 299-306.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., & et al. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*, *15*, pp. 930-9.
- Finlay, C. M., Stefanska, A. M., Walsh, K. P., Kelly, P. J., Boon, L., Lavelle, E. C., & et al. (2016). Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia. *J Immunol*, *196*, pp. 703-14.

- Fleming, J. O., & Weinstock, J. V. (2015). Clinical trials of helminth therapy in autoimmune diseases: rationale and findings. *Parasite Immunol*, 37, pp. 277-92.
- Fleming, J., Hernandez, G., Hartman, L., Maksimovic, J., Nace, S., Lawler, B., & et al. (2019). Safety and Efficacy of Helminth Treatment in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis: Results of the HINT 2 Clinical Trial. *Mult Scler*, 25, pp. 81-91.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, pp. 497-509.
- Fossati, P., & Prencipe, L. (1982). Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*, 28, pp. 2077-80.
- Freedland, S. J., & Platz, E. A. (2007). Obesity and Prostate Cancer: Making Sense out of Apparently Conflicting Data. *Epidemiol Rev*, 29, pp. 88-97.
- Frezza, E. E., Waschtel, M. S., & Chiriva-Internati, M. (2006). Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*, 55, pp. 285-291.
- GBD Causes of Death. (2018). Global Burden of Disease study. *The Lancet*, 392, pp. 1683-2138.
- Girgis, N. M., Gundra, U. M., & Loke, P. (2013). Immune Regulation during Helminth Infections. *PLoS Pathog*, 9, p. e1003250.
- Grainger, J. R., Smith, K. A., Hewitson, J. P., McSorley, H. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., & et al. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *J Exp Med*, 207, pp. 2331-41.
- Greenwood, B. M. (1969). Polyarthritis in West Nigeria. *Ann rheum Dis*, 28, pp. 488-495.
- Greenwood, B. M., Herrick, E. M., & Voller, A. (1970). Suppression of Autoimmune Disease in NZB and (NZB \times NZW)F1 Hybrid Mice by Infection with Malaria. *Nature*, 226, pp. 266-267.
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, pp. 415-445.
- Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G., & Raybould, H. E. (2015). Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 308, pp. G840-G851.
- Hams, E., Bermingham, R., Wurlod, F. A., Hogan, A. E., O'Shea, D., Preston, R. J., & et al. (2015). The helminth T2 RNase ω 1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33- and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. *The FASEB Journal*, 30(2).
- Hays, R., Esterman, A., Giacomini, P., Loukas, A., & McDermott, R. (2015). Does *Strongyloides stercoralis* infection protect against type 2 diabetes in humans? Evidence from Australian Aboriginal adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 107, pp. 355-361.
- Holt, P. G. (1994). A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. *The Lancet*, 344, pp. 456-458.
- Hotamisligil, G. (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542, pp. 177-185.
- Houzen, H., Niino, M., Hirotsu, M., & Fukazawa, T. (2012). Increased prevalence, incidence, and female predominance of multiple sclerosis in northern Japan. *J Neurol Sci*, 323, pp. 117-122.

- Howorth, P. J. (1971). Determination of serum albumin in neonatal jaundice. The albumin saturation index. *Clinica Chimica Acta*, 32, pp. 271-278.
- Hubner, M. P., Stocker, J. T., & Mitre, E. (2009). Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*, 127, pp. 512-22.
- Hussaarts, L., Garcia-Tardon, N., van Beek, L., Heemskerk, M. M., Haeberlein, S., van der Zon, G. C., & et al. (2015). Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *The FASEB Journal*, 29(7).
- Ignacio, R. M., Kim, C. S., & Kim, S. K. (2014). Immunological Profiling of Obesity. *J Lifestyle Med*, 4, pp. 1-7.
- IHME. (8 de Novembro de 2018). *Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioral, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the GBD Study 2017*. Acesso em 8 de Março de 2021, disponível em <http://www.healthdata.org/research-article/global-regional-and-national-comparative-risk-assessment-84-behavioral-0>
- Ilan, Y., Maron, R., Tukpah, A. M., Maioli, T. U., Murugaiyan, G., Yang, K., & al, e. (2010). Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, pp. 9765-70.
- Jackson, J. A., Friberg, I. M., Little, S., & Bradley, J. E. (2008). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology*, 126, pp. 18-27.
- Kang, K., Reilly, S. M., Karabacak, V., Gangl, M. R., Fitzgerald, K., Hatano, B., & et al. (2008). Adipocyte-Derived Th2 Cytokines and Myeloid PPAR δ Regulate Macrophage Polarization and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism*, 7, pp. 485-495.
- Keller, U. (2019). Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. *J Clin Med*, 8, p. 775.
- Kern, L., Mittenbuhler, M. J., Vesting, A. J., Ostermann, A. L., Wunderlich, C. M., & Wunderlich, F. T. (2019). Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation—Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers (Basel)*, 11, p. 24.
- Khalil, N. (1999). TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*, 1, pp. 1255-63.
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40, pp. 1830-5.
- King, C. L., Medhat, A., Malhotra, I., Nafeh, M., Helmy, A., Khaudary, J., & et al. (1996). Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *J Immunol*, 156, pp. 4715-21.
- Kuehni, C. E., Strippoli, M. P., Low, N., & Silverman, M. (2007). Asthma in young south Asian women living in the United Kingdom: the importance of early life. *Clin Exp Allergy*, 37, pp. 47-53.
- Laber, K. E., & Swindle, M. M. (2002). Biology and Diseases of Swine. Em *Laboratory Animal Medicine*. James G. Fox, Lynn C. Anderson, Fred W. Quimby.

- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, *96*, pp. 1457-1461.
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer*, *97*, pp. 1005-1008.
- Layland, L. E., Straubinger, K., Ritter, M., Loffredo-Verde, E., Garn, H., Sparwasser, T., & et al. (2013). Schistosoma mansoni-Mediated Suppression of Allergic Airway Inflammation Requires Patency and Foxp3+ Treg Cells. *PLoS Negl Trop Dis*, *7*, p. e2379.
- Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L., & van Dam, R. M. (2009). Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, *302*, pp. 179-188.
- Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clement, K., Glickman, J. N., & et al. (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*, *15*, pp. 940-945.
- Liu, Q., Sundar, K., Mishra, P. K., Mousavi, G., Liu, Z., Gaydo, A., & et al. (2009). Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun*, *77*, pp. 5347-58.
- Liu, Z., Gu, J., Qin, Z., Yang, C., Yu, S., Dai, X., & et al. (2020). Decreased Foxp3 and function of Tregs caused immune imbalance and liver injury in patients with autoimmune liver diseases post-liver transplantation. *Ann Transl Med*, *8*, p. 534.
- Lopes-Virella, M. F., Stone, P., Ellis, S., & Colwell, J. A. (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem*, *23*, pp. 882-884.
- Loukas, A., Hotez, P. J., Diemert, D., Yazdanbakhsh, M., McCarthy, J. S., Correa-Oliveira, R., & et al. (2016). Hookworm infection. *Nat Rev Dis Primers*, *8*, p. 16088.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, *117*, pp. 175-84.
- Lund, M. E., O'Brien, B. A., Hutchinson, A. T., Robinson, M. W., Simpson, A. M., Dalton, J. P., & et al. (2014). Secreted Proteins from the Helminth Fasciola hepatica Inhibit the Initiation of Autoreactive T Cell Responses and Prevent Diabetes in the NOD Mouse. *PLoS One*, *9*, p. e86289.
- Lynch, N. R., Hagel, I., Perez, M., Di Prisco, M. C., Lopez, R., & Alvarez, N. (1993). Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol*, *92*, pp. 404-11.
- Maizels, R. M., & McSorley, H. J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*, *138*, pp. 666-675.
- Marimoto, M., Azuma, N., Kadowaki, H., Abe, T., & Suto, Y. (2016). Regulation of type 2 diabetes by helminth-induced Th2 immune response. *J Vet Med Sci*, *78*, pp. 1855-1864.
- McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clin Microbiol Rev*, *25*, pp. 585-608.
- McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D., & Maizels, R. M. (2008). Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite Brugia malayi. *J Immunol*, *181*, pp. 6456-66.

- Metenou, S., Dembele, B., Konate, S., Dolo, H., Coulibaly, S. Y., Coulibaly, Y. I., & et al. (2010). At Homeostasis Filarial Infections Have Expanded Adaptive T Regulatory but Not Classical Th2 Cells. *J Immunol*, *184*, pp. 5375-5382.
- Meulemans, O. (1960). Determination of total protein in spinal fluid with sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid. *Clin Chim Acta*, *5*, pp. 757-61.
- Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., & et al. (2003). Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors. *JAMA*, *289*, pp. 76-79.
- Monroy, F. G., & Enriquez, F. J. (1992). Heligmosomoides polygyrus: a model for chronic gastrointestinal helminthiasis. *Parasitol Today*, *8*, pp. 49-54.
- Morbarhan, S. (1988). The role of albumin in nutritional support. *J Am Coll Nutr*, *7*, pp. 445-52.
- Nakamura, K., Kitani, A., & Strober, W. (2001). Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4+Cd25+Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor β . *J Exp Med*, *194*, pp. 629-644.
- Nguyen, M. T., Favelyukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., & al, e. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*, *282*, pp. 35279-92.
- Nishimura, S., Manabe, I., Takaki, S., Nagasaki, M., Otsu, M., Yamashita, H., & et al. (2013). Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab*, *18*, pp. 759-766.
- Oldstone, M. B. (1988). Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science*, *239*(4839), pp. 500-502.
- Olsen, C. M., Green, A. C., Whiteman, D. C., Sadeghi, S., Kolahdooz, F., & Webb, P. M. (2007). Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, *43*, pp. 690-709.
- O'Neill, C. M., Lu, C., Corbin, K. L., Sharma, P. R., Dula, S. B., Carter, J. D., & et al. (2013). Circulating Levels of IL-1B+IL-6 Cause ER Stress and Dysfunction in Islets From Prediabetic Male Mice. *Endocrinology*, *154*, pp. 3077-3088.
- Pace, F., Carvalho, B. M., Zanutto, T. M., Santos, A., Guadagnini, D., Silva, K. L., & et al. (2018). Helminth infection in mice improves insulin sensitivity via modulation of gut microbiota and fatty acid metabolism. *Pharmacological Research*, *132*, pp. 33-46.
- Pacella, I., Procaccini, C., Focaccetti, C., Miacci, S., Timperi, E., & Faicchia, D. (2018). Fatty acid metabolism complements glycolysis in the selective regulatory T cell expansion during tumor growth. *PNAS*, *115*, pp. E6546-6555.
- Pan, S. Y., DesMeules, M., Morrison, H., & Wen, S. W. (2006). Obesity, High Energy Intake, Lack of Physical Activity, and the Risk of Kidney Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *15*, pp. 2453-2460.
- Patel, P. S., Buras, E. D., & Balasubramanyam, A. (2013). The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *J Obes*, *2013*, pp. 1-9.
- Pereira, S., Teixeira, L., Aguilar, E., Oliveira, M., Savassi-Rocha, A., Palaez, J. N., & et al. (2014). Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF- in metabolically healthy class III obese individuals. *Nutrition*, *30*, pp. 784-790.

- Perellegrinelli, V., Carobbio, S., & Vidal-Puig, A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia*, *59*, pp. 1075-1088.
- Petkevicius, S. (2007). The interaction between intestinal helminth infection and host nutrition. *Veterinarija ir Zootechnika*, *37*, pp. 53-60.
- Piconese, S., Pittoni, P., Burocchi, A., Gorzanelli, A., Care, A., Tripodo, C., & et al. (2010). A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *Eur J Immunol*, *40*, pp. 2902-13.
- Piconese, S., Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Tripodo, C., Rossi, M., & et al. (2014). Human OX40 tunes the function of regulatory T cells in tumor and nontumor areas of hepatitis C virus-infected liver tissue. *Hepatology*, *60*, pp. 1494-507.
- Qin, H. Y., & Singh, B. (1997). BCG vaccination prevents insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice after disease acceleration with cyclophosphamide. *J Autoimmun*, *10*, pp. 271-8.
- Rajamanickam, A., Munisankar, S., Bhootra, Y., Dolla, C., Thiruvengadam, K., Nutman, T. B., & et al. (2018). Metabolic Consequences of Concomitant Strongyloides stercoralis Infection in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Inf Dis*, *69*, pp. 697-704.
- Rajamanickam, A., Munisankar, S., Dolla, C., Menon, P. A., Thiruvengadam, K., Nutman, T., & et al. (2020). Helminth infection modulates systemic pro-inflammatory cytokines and chemokines implicated in type 2 diabetes mellitus pathogenesis. *Plos Neglect Trop D*, *14*, p. e0008101.
- Ramanan, D., Bowcutt, R., Lee, S. C., Tang, M. S., Kurtz, Z. D., Ding, Y., & et al. (2016). Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. *Science*, *352*, pp. 608-12.
- Reynolds, L. A., Filbey, K. J., & Maizels, R. M. (2012). Immunity to the model intestinal helminth parasite Heligmosomoides polygyrus. *Semin Immunopathol*, *34*, pp. 829-846.
- Ricci, N. D., Fiuza, J. A., Bueno, L. L., Cançado, G. G., Gazzinelli-Gimares, P. H., Martins, V. G., & et al. (2011). Induction of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation. *PLoS Negl Trop Dis*, *5*, p. e1383.
- Rodbell, M. (1964). Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, *239*, pp. 375-380.
- Rodriguez-Perea, A. L., Montoya, C. J., Olek, S., Chougnat, C. A., & Velilla, P. A. (2015). Statins increase the frequency of circulating CD4+ FOXP3+ regulatory T cells in healthy individuals. *J Immunol Res*, *2015*, p. 762506.
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Skip Nav Destination Article Navigation Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition*, *11*, pp. 77-91.
- Romagnani, S. (1992). Human TH1 and TH2 Subsets: Regulation of Differentiation and Role in Protection and Immunopathology. *98*, pp. 279-85.
- Rosche, B., Wernecke, K. D., Ohlraun, S., Dorr, J. M., & Paul, F. (2013). Trichuris suis ova in relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome (TRIOMS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, *14*, p. 112.

- Rudra, D., deRoos, P., Chaudhry, A., Niec, R., Arvey, A., Samstein, R. M., & et al. (2012). Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol*, *13*, pp. 1010-1019.
- Ryan, S. M., Eichenberger, R. M., Ruscher, R., Giacomini, P. R., & Loukas, A. (2020). Harnessing helminth-driven immunoregulation in the search for novel therapeutic modalities. *PLoS Pathog*, *16*, p. e1008508.
- Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Nagai, M., & et al. (2004). Adiponectin as a Biomarker of the Metabolic Syndrome. *Circ J*, *68*, pp. 975-981.
- Sandborn, W. J., Elliott, D. E., Weinstock, J., Summers, R. W., Landy-Wheeler, A., Silver, N., & et al. (2013). Randomised clinical trial: the safety and tolerability of *Trichuris suis* ova in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, *38*, pp. 255-63.
- Santos, E. W., Oliveira, D. C., Hastreiter, A., Silva, G. B., Beltran, J. S., Rogero, M. M., & et al. (2019). Short-term high-fat diet affects macrophages inflammatory response, early signs of a long-term problem. *Braz J Pharm Sci*, *55*, p. e17561.
- Santos, S. H., Fernandes, L. R., Mario, E. G., Ferreira, A. V., Porto, I. C., & Alvarez-Leite, J. I. (2008). Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, *57*, pp. 340-347.
- Sewell, D. L., Reinke, E. K., Hogan, L. H., Sandor, M., & Fabry, Z. (2002). Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunol Lett*, *82*, pp. 101-10.
- Shea-Donohue, T. (2018). Consequences of Chronic Impairment of Mucosal Barrier Function. *Em Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Sixth Edition ed., pp. 641-661).
- Shea-Donohue, T., Sullivan, C., Finkelman, F. D., Madden, K. B., Morris, S. C., Goldhill, J., & et al. (2001). The role of IL-4 in *Heligmosomoides polygyrus*-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *J Immunol*, *167*, pp. 2234-9.
- Shimokawa, C., Obi, S., Shibata, M., Ochiai, A., Imai, T., Suzue, K., & et al. (2019). Suppression of Obesity by an Intestinal Helminth through Interactions with Intestinal Microbiota. *Infect Immun*, *87*, pp. e00042-19.
- Siegel, D., Meier, J., Maas, C., Lopez, J., & Swislocki, A. L. (2008). The effect of body mass index on fasting blood glucose after initiation of thiazide therapy in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, *21*, pp. 438-442.
- Singla, P., Bardoloi, A., & Parkash, A. A. (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*, *1*, pp. 76-88.
- Smith, A. J., Liu, J., Yilmaz, A., Wright, V., Bradley, D., & Hsueh, W. A. (2020). Obesity contributes to a dysfunctional regulatory T Cell phenotype within adipose tissue. *J Immunol*, *204*, p. 145.38.
- Smith, K. A., Hochweller, K., Hammerling, G. J., Boon, L., MacDonald, A. S., & Maizels, R. M. (2011). Chronic Helminth Infection Promotes Immune Regulation In Vivo through Dominance of CD11c^{lo}CD103⁺ Dendritic Cells. *J Immunol*, *186*, pp. 7098-7109.
- Solinas, G., & Karin, M. (2010). JNK1 and IKK: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*, *24*, pp. 2596-2611.
- Stephenson, G. D., & Rose, D. P. (2009). Breast Cancer and Obesity: An Update. *Nutr Cancer*, *45*, pp. 1-16.

- Stienstra, R., Joosten, L. A., Koenen, T., van Tits, B., van Diepen, J. A., van den Berg, S. A., & et al. (2010). The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab*, 12, pp. 593-605.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J*, 299, pp. 1259-60.
- Strachan, D. P. (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax*, 55, pp. S2-S10.
- Su, C. W., Chen, C. Y., Li, Y., Long, S. R., Massey, W., Vijaya, D., & et al. (2018). Helminth infection protects against high fat diet-induced obesity via induction of alternatively activated macrophages. *Scientific reports*, 8, p. 4607.
- Su, C., Cao, Y., Kaplan, J., Zhang, M., Li, W., & Conroy, M. (2011). Duodenal Helminth Infection Alters Barrier Function of the Colonic Epithelium via Adaptive Immune Activation. *Infect Immun*, 79, pp. 2285-2294.
- Sugimura, N., Otani, K., Watanabe, T., Nakatsu, G., Shimada, S., Fujimoto, K., & et al. (2019). High-fat diet-mediated dysbiosis exacerbates NSAID-induced small intestinal damage through the induction of interleukin-17A. *Sci Rep*, 9, p. 16796.
- Summers, R. W., Elliott, D. E., Qadir, K., Urban, J. F., Thompson, R., & Weinstock, J. V. (2003). *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 98, pp. 2034-2041.
- Sutton, T. L., Zhao, A., Madden, K. B., Elfrey, J. E., Tuft, B. A., Sullivan, C. A., & et al. (2008). Anti-Inflammatory Mechanisms of Enteric Heligmosomoides polygyrus Infection against Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in a Murine Model. *Infect Immun*, 76, pp. 4772-4782.
- Tahapary, D. L., Ruiters, K. d., Martin, I., Brienen, E. A., van Lieshout, L., Djuardi, Y., & et al. (2017). Effect of anthelmintic treatment on leptin, adiponectin and leptin to adiponectin ratio: a randomized-controlled trial. *Nutrition & Diabetes*, 7, p. e289.
- Takei, I., Asaba, Y., Kasatani, T., Maruyama, T., Watanabe, K., Yanagawa, T., & et al. (1992). Suppression of development of diabetes in NOD mice by lactate dehydrogenase virus infection. *J Autoimmun*, 5, pp. 665-673.
- Tang, C. L., Lei, J. H., Guan, F., Li, Y. L., Liu, R., Grevelding, C. G., & et al. (2014). Effect of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 on CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in murine schistosomiasis japonica. *Exp Parasitol*, 136, pp. 74-8.
- Taylor, M. D., Harris, A., Babayan, S. A., Bain, O., Culshaw, A., Allen, J. E., & et al. (2007). CTLA-4 and CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibit Protective Immunity to Filarial Parasites In Vivo. *J Immunol*, 179, pp. 4626-4634.
- Taylor, M. D., LeGoff, L., Harris, A., Malone, E., Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2005). Removal of Regulatory T Cell Activity Reverses Hyporesponsiveness and Leads to Filarial Parasite Clearance In Vivo. *J Immunol*, 174, pp. 4924-4933.
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, pp. 772-738.
- Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., & et al. (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 5, p. e1175800.

- Trindade, L. M., Martins, V. D., Rodrigues, N. M., Souza, E. L., Martins, F. S., & Costa, G. M. (2018). Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Benef Micro*, *9*, pp. 1-10.
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M., & Lipsky, P. E. (2006). TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*, *108*, pp. 253-261.
- van den Berg, S. M., van Dam, A. D., Kusters, P. J., Becjers, L., Den Toom, M., van der Velden, S., & et al. (2017). Helminth antigens counteract a rapid high-fat diet-induced decrease in adipose tissue eosinophils. *J Mol End*, *59*, pp. 245-255.
- van der Biggelaar, A. H., van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G., & et al. (2000). Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet*, *356*, pp. 1723-7.
- van der Vlugt, L. E., Labuda, L. A., Ozir Fazalalikhani, A., Liewers, E., Gloudemans, A. K., Liu, K.-Y., & al, e. (2012). Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. *PLoS One*, *7*, p. e300883.
- VanSaun, M. N., Lee, I. K., Washington, M. K., Matrisian, L., & Gorden, D. L. (2009). High Fat Diet Induced Hepatic Steatosis Establishes a Permissive Microenvironment for Colorectal Metastases and Promotes Primary Dysplasia in a Murine Model. *Am J Pathol*, *175*, pp. 355-364.
- Viola, A., Munari, F., Sanchez-Rodriguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*, *10*, p. 1462.
- Voldsgaard, A., Bager, P., Garde, E., Akeson, P., Leffers, A. M., & Madsen, C. G. (2015). *Trichuris suis* ova therapy in relapsing multiple sclerosis is safe but without signals of beneficial effect. *Mult Scler*, *21*, pp. 1723-9.
- von Mutius, E., Martinez, F. D., Fritzschn, C., Nicolai, T., Roell, G., & Thiemann, H. H. (1994). Prevalence of Asthma and Atopy in Two Areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*, *149*, pp. 358-364.
- Walk, S. T., Blum, A. M., Ewing, S. A., Weinstock, J. V., & Young, V. B. (2011). Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth, *Heligmosomoides polygyrus*. *Inflamm Bowel Dis*, *16*, pp. 1841-1849.
- Walsh, C. M., Smith, P., & Fallon, P. G. (2007). Role for CTLA-4 but not CD25⁺ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunol*, *29*, pp. 293-308.
- Wang, C. C., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. (2001). Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy*, *31*, pp. 495-503.
- Wang, Y., Su, M. A., & Wan, Y. Y. (2011). An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells. *Immunity*, *35*, pp. 337-348.
- Wells, J. M. (2011). Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact*, *10*, p. S17.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., & al, e. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*, *12*, pp. 408-15.

- White, M. P., McManus, C. M., & Maizels, R. M. (2020). Regulatory T-cells in helminth infection: induction, function and therapeutic potential. *Immunology*, *160*, pp. 248-260.
- WHO. (1 de Abril de 2020). *Obesity and overweight*. Acesso em 25 de November de 2020, disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- WHO. (2 de Março de 2020). *Soil-transmitted helminth infections*. Acesso em 16 de Novembro de 2020, disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*, *26*, pp. 19-39.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., & Karp, C. L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Reviews*, *1*, pp. 69-75.
- Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A., Lamb, J. R., & Maizels, R. M. (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med*, *202*, pp. 1199-1212.
- Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., & et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med*, *17*, pp. 610-7.
- Winer, D. A., Winer, S., Chng, M. H., Shen, L., & Engleman, E. G. (2014). Lymphocytes in obesity- related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci*, *71*, pp. 1033-1043.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., & Bahrami, J. (2009). Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nat Med*, *15*, pp. 921-929.
- Wiria, A. E., Hamid, F., Wammes, L. J., Prasetyani, M. A., Dekkers, O. M., May, L., & et al. (2015). Infection with Soil-Transmitted Helminths Is Associated with Increased Insulin Sensitivity. *PLoS One*, *10*, p. e0127746.
- Wiria, A. E., Wammes, L. J., Hamid, F., Dekkers, O. M., Prasetyani, M. A., May, L., & et al. (2013). Relationship between Carotid Intima Media Thickness and Helminth Infections on Flores Island, Indonesia. *PLoS One*, *8*, p. e0054855.
- Wohlfert, E. A., Grainger, J. R., Bouladoux, N., Konkel, J. E., Oldenhove, G., Ribeiro, C. H., & et al. (2011). GATA3 controls Foxp3+ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*, *121*, pp. 4503-4515.
- Wong, T., Hildebrandt, M. A., Thrasher, S. M., Appleton, J. A., Rexford, S. A., & Wu, G. D. (2007). Divergent Metabolic Adaptations to Intestinal Parasitic Nematode Infection in Mice Susceptible or Resistant to Obesity. *Gastroenterology*, *133*, pp. 1979-1988.
- Wu, D., Molofsky, A. B., Liang, H.-E., Ricardo-Gonzalez, R. R., Jouihan, H. A., Bando, J. K., & et al. (2011). Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science*, *332*, pp. 243-247.
- Yang, H., Youm, Y. H., Vandanmagsar, B., Ravussin, A., Gimble, J. M., Greenway, F., & al, e. (2010). Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*, *185*, pp. 1836-45.

- Yang, Z., Grinchuk, V., Smith, A., Qin, B., Bohl, J. A., Sun, R., & et al. (2013). Parasitic nematode-induced modulation of body weight and associated metabolic dysfunction in mouse models of obesity. *Infection and Immunity*, 81, pp. 1905-1914.
- Ying-zhong, L., Shan-he, L., Zheng-de, L., Huang, Y., Shi, Y., Liu, L., & et al. (2013). Downregulation of CD4+LAP+ and CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Acute Coronary Syndromes. *Mediator of Inflammation*, 2013, p. 764082.
- You, S., Poulton, L., Cobbold, S., Liu, C. P., Rosenzweig, M., Ringler, D., & al, e. (2009). Key Role of the GITR/GITRLigand Pathway in the Development of Murine Autoimmune Diabetes: A Potential Therapeutic Target. *PLoS One*, 4, p. e7848.
- Zaccone, P., Fehervari, Z., Jones, F. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D. W., & et al. (2003). Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol*, 33, pp. 1439-49.
- Zaias, J., Mineau, M., Cray, C., Yoon, D., & Altman, N. H. (2009). Reference Values for Serum Proteins of Common Laboratory Rodent Strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 48, pp. 387-390.
- Zeng, C., Shi, X., Zhang, B., Liu, H., Zhang, L., Ding, W., & et al. (2012). The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med*, 90, pp. 175-186.
- Zhao, H., Liao, X., & Kang, Y. (2017). Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front Immunol*, 2017, p. 01578.
- Zheng, S. G., Wang, J., & Horwitz, D. A. (2008). Cutting edge: Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. *J Immunol*, 180, pp. 7112-6.