

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

Vinicius Dantas Martins

**A OBESIDADE ALTERA A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS À *L. MAJOR* EM
CAMUNDONGOS C57BL/6**

Belo Horizonte
2023

Vinicius Dantas Martins

**A OBESIDADE ALTERA A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS À *L. MAJOR* EM
CAMUNDONGOS C57BL/6**

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

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

Belo Horizonte
2023

043

Martins, Vinicius Dantas.

A obesidade altera a resposta de macrófagos à *L. Major* em camundongos C57BL/6 [manuscrito] / Vinicius Dantas Martins. – 2023.

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

Orientadora: Profa . Dra . Tatiani Uceli Maioli. Coorientadora: Profa . Dra Ana Maria Caetano de Faria.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Obesidade. 3. *Leishmania major*. 4. Infecções. 5. Macrófagos. I. Maioli, Tatiani Uceli. II. Faria, Ana Maria Caetano de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



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 VINICIUS DANTAS MARTINS. Aos dez dias do mês de março de 2023 às 10:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Teams”, 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 "A obesidade altera a resposta de macrófagos à L. major em camundongos C57BL/6", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Tatiani Uceli Maioli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Natalia Tavares (Instituto Gonçalo Muniz - Fiocruz/BA), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Claudia Brodskyn (Instituto Gonçalo Muniz - Fiocruz/BA), aprovado; Dra. Walderez Dutra (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(X) APROVADO

() REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de março de 2023.

Dra. Natalia Tavares (Instituto Gonçalo Muniz - Fiocruz/BA)

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dra. Claudia Brodskyn (Instituto Gonçalo Muniz - Fiocruz/BA)

Dra. Walderez Dutra (UFMG)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria Coorientadora (UFMG)

Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento vai para as duas mulheres que são referência na minha vida: Tati e Ana. Obrigado por todo apoio desde o meu início no LIB em 2013. Todos os clichês que poderia escrever aqui para agradecê-las e elogiá-las seriam cabíveis. Para Tati, que foi a minha primeira orientadora e de quem não desgrudei até aqui, gostaria de dizer que a sua inteligência e parceria são uma mistura única e difícil de se encontrar. À Ana, que está fora da curva da genialidade muito obrigado por abrir as portas do laboratório e por proporcionar um ambiente onde amamos discutir ciência. Às duas, minha gratidão!

Gostaria de agradecer também a professora Leda, que sempre me deu suporte, abrindo as portas para as discussões científicas no LAGI. Por me apoiar e me incentivar em toda etapa da minha jornada acadêmica, inclusive abrindo o seu laboratório para a execução de experimentos.

Um agradecimento especial para entidade LIB, e aos diversos amigos que fiz durante esses quase 10 anos. Ao LIB atual, agradeço à Mini Mari que é a pessoa que com certeza mais aturou as minhas chatices durante todo este tempo. Agradeço à Gio, Cecis e Marcos que nestes últimos anos viraram pessoas chave para um convívio extremamente saudável e um ambiente gostoso de trabalhar. O bandeirão não é igual sem vocês. Ao Caixas, Lícia e Lucas que apesar de não estarem sempre presentes no dia a dia são pessoas importantes na minha jornada e contribuem para que o LIB continue sendo esse laboratório incrível. Aos novos ICs: Laís, Sophia, Juan e Matheus agradeço por toda a ajuda e desejo que vocês bebam a água do LIB e se empolguem com a ciência.

Agradeço ao LIB velha guarda. Às diversas pessoas que continuam presentes na minha vida, ajudam no que for preciso e são pessoas que quero manter esse laço para sempre. Em especial agradeço a Nat, Mari Camila, Lu Lemos, Sara (minha eterna IC) e Helder. Espero que a parceria continue firme e forte

Obrigado aos colaboradores: Léo, Pierre e Mateus pelas diversas ajudas, inúmeras “salvadas” e é claro pela amizade!

Um agradecimento especial à Ildinha e ao Hermes que sempre dão uma solução para os nossos problemas e cuidam dos animais com muito respeito e com uma dedicação única. Em especial a Ildinha tem um carinho comigo que poucas pessoas têm, e tento retribuir da melhor forma.

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

O agradecimento mais importante vai para a família. Aos meus pais, Arminda e Claudio. "Quem tem família tem tudo". Melhor ainda quando a família compra todas as ideias do filho e o apoiam sem pensar duas vezes. Obrigado pelos ensinamentos diários, por propiciarem um ambiente saudável e por acreditarem em mim! Amo vocês! Obrigado às minhas irmãs Tati e Gabi por todo apoio, mas principalmente por me aguentarem em casa após um dia cansativo!

Finalmente, um obrigado especial para minha recém esposa Iara. Esposa, palavra que ainda não me acostumei de usar no meu vocabulário, mas sobre a pessoa já estou acostumado a amar e escolhi para dividir a vida comigo.

RESUMO

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, mostramos que camundongos com obesidade e infectados com *L. major* apresentam lesão mais ulcerada do que camundongos magros após 8 semanas de infecção, e seus macrófagos peritoneais são mais susceptíveis à infecção *in vitro*. Para esclarecer os achados iniciais, neste presente estudo, tivemos como objetivo investigar o efeito da obesidade na resposta imune de macrófagos à infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6. Primeiramente, comparamos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos controle e com obesidade, e infectados *in vitro* sob diferentes estímulos. Os macrófagos derivados de camundongos com obesidade infectados com *L. major* apresentaram maior índice de infecção, produziram menos óxido nítrico e apresentaram maior atividade de arginase em comparação com macrófagos derivados de animais magros. Também observamos que os macrófagos de camundongos com obesidade foram mais permissivos à infecção por *L. major* quando estimulados para a diferenciação dos perfis M1 ou M2. Para avaliar a participação dos macrófagos *in vivo* e a resposta imune inata, camundongos com ou sem obesidade foram submetidos à infecção intradérmica com 2×10^5 *L. major* metacíclicas. Camundongos com obesidade apresentaram lesões mais graves e com maior carga parasitária até 98 dias de infecção. A análise por citometria de fluxo de células na orelha revelou que camundongos com obesidade apresentaram uma frequência menor de neutrófilos nos estágios iniciais da infecção. Após 8 semanas, quando a lesão do obeso é mais significativa, esses animais apresentaram maior frequência de macrófagos residentes CD206⁺. O aumento de macrófagos residentes ocorre em relação a monócitos, células dendríticas e macrófagos CD11c⁺ quando comparado aos camundongos saudáveis. Além disso, observamos que camundongos com obesidade apresentaram maior frequência de macrófagos CD206⁺ no baço, fígado e tecido adiposo, independentemente da infecção. Na orelha, esse aumento se dá exclusivamente com a presença do parasito. Por fim, mostramos que animais CCR2^{-/-}, os quais possuem basicamente macrófagos residentes na lesão, apresentam um perfil de lesão mais grave quando comparado aos controles C57BL/6, e a obesidade potencializa a severidade da lesão nessa linhagem. Portanto, os macrófagos de medula derivados de C57BL/6 com obesidade possuem uma resposta inflamatória

prejudicada permitindo maior sobrevivência de *L. major*. Além disso, nossos dados sugerem que a obesidade pode prejudicar a resposta imune à *L. major* sendo que o aumento da frequência de macrófagos CD206⁺ na orelha é condizente com um prognóstico mais grave da infecção.

Palavras-chave: Obesidade, infecção, *Leishmania major*, macrófagos

ABSTRACT

In previous studies conducted by our group, we showed that mice with obesity and infected with *L. major* had more ulcerated lesions compared to lean mice after eight weeks of infection. Additionally, their peritoneal macrophages were more susceptible to infection *in vitro*. In this present study, we aimed to investigate the effect of obesity on the immune response of macrophages to *L. major* infection in C57BL/6 mice. Firstly, we compared macrophages derived from the bone marrow of control and obese mice that were infected *in vitro* under different stimuli. Macrophages from obese mice infected with *L. major* showed a higher infection index, produced less nitric oxide and presented a higher arginase activity compared to macrophages from lean animals. We also observed that macrophages from obese mice were more permissive to *L. major* infection when stimulated to differentiate into M1 or M2 profiles. To evaluate the participation of macrophages *in vivo* and the innate immune response, mice with or without obesity were subjected to intradermal infection with 2×10^5 *L. major* metacyclic. Obese mice had more severe lesions and higher parasitic burden up to 98 days after infection. Flow cytometry analysis of cells in the ear revealed that obese mice had a lower frequency of neutrophils in the early stages of infection. After 8 weeks, when the lesion in obese mice was more severe, these animals presented a higher frequency of resident CD206⁺ macrophages. The increase in resident macrophages occurred in relation to monocytes, dendritic cells, and CD11c⁺ macrophages when compared to healthy mice. Additionally, we observed that obese mice had a higher frequency of CD206⁺ macrophages in the spleen, liver, and adipose tissue, regardless of infection. In the ear, this increase happens only in the presence of the parasite. Finally, we demonstrated that CCR2^{-/-} animals, which mainly have resident macrophages in the lesion, had a more severe lesion when compared to C57BL/6 controls, and obesity potentialized the severity of the lesion. Therefore, bone marrow-derived macrophages from C57BL/6 mice with obesity have an impaired inflammatory response, allowing for greater *L. major* survival. Furthermore, our data suggest that obesity may impair the immune response to *L. major*. The increase in CD206⁺ macrophage frequency in the ear is consistent with a more severe prognosis of infection.

Keywords: Obesity, infection, Leishmania major, macrophages

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de resistência à infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6

Figura 2: Diferentes subtipos de macrófagos do tecido adiposo e seus respectivos nichos

Figura 3: Macrófagos derivados da medula óssea e estimulados com glicose, palmitato e possuem menor resposta inflamatória do que macrófagos M1 na infecção por *L. major*

Figura 4: Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com obesidade sob diferentes estímulos são mais suscetíveis à infecção por *L. major*

Figura 5: Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com obesidade apresentam falha na ativação clássica M1 e possuem maior atividade da arginase sob diferentes estímulos

Figura 6: O consumo de dieta hipercalórica alterou o peso corporal e o metabolismo de glicose em camundongos com obesidade induzida por dieta

Figura 7: Camundongos com obesidade apresentam maior lesão e maior carga parasitária quando infectados com *L. major*

Figura 8: O tamanho da lesão correlaciona positivamente ao peso e a glicemia de jejum

Figura 9: Estratégia de análise utilizada para caracterizar as células da imunidade inata da orelha

Figura 10: Análise das frequências das populações de células da imunidade inata da orelha de camundongos controle e com obesidade

Figura 11: Características dos macrófagos residentes na pele da orelha

Figura 12: Capacidade endocítica de células da pele da orelha e do baço

Figura 13: O Aumento de células CD11b+ na orelha de camundongos com obesidade ao longo do curso de infecção, ocorre sem aumento nos monócitos circulantes

Figura 14: Análise da cinética de populações das células da imunidade inata na infecção por *L. major*

Figura 15: A obesidade reduz a chegada dos neutrófilos na lesão no 2º dia de infecção

Figura 16: Macrófagos residentes aumentam na orelha de animais em relação a monócitos, células dendríticas e células CD11c+

Figura 17: Macrófagos residentes são as células com mais parasitos no grupo controle e monócitos e macrófagos residentes de camundongos com obesidade permanecem parasitados na 8ª semana de infecção

Figura 18: A obesidade aumenta a frequência de células CD11b⁺CD206⁺ em outros órgãos

Figura 19: Camundongos CCR2^{-/-} apresentam atraso na resolução da lesão independente do consumo de dieta

Figura 20: Imagem ilustrativa da conclusão do trabalho

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ingredientes das dietas controle e hipercalórica

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

Tabela 3: Painel de anticorpos utilizados na Citometria de Fluxo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

AIN 93G – dieta padrão para roedores

BHT – Hidroxitolueno butilado

BSA – albumina soro bovina

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CD – cluster of differentiation

CRP – proteína C reativas

CCR2 – Receptores de quimiocinas CC

CCL2 – Ligante de quimiocinas 2

DCs – Células dendríticas

DNA – ácido desoxirribonucleico

FFA – ácidos graxos livres

GLUT4 – transportador de glicose 4

GTT – Teste de tolerância oral a glicose

H1N1 – vírus influenza A subtipo H1N1

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HIF1 α – Fator indutor de hipóxia

HDL – lipoproteína de alta densidade

HSB – dieta indutora de obesidade

IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ – interferon *alfa/beta/gama*

IMC – índice de massa corporal

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

Kg/m² – quilogramas por metro ao quadrado

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LPS – lipopolissacarídeo

M1 – macrófagos estimulados in vitro com LPS e IFN-g

M2 – macrófagos estimulados in vitro com IL-4

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

Mme – macrófagos estimulados in vitro com palmitato, glicose e insulina

NF-kB – fator nuclear *kappa B*

NK – Natural *Killer*

NO – óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPD – ortofenileneamina
PLIN2 – perilipina 2
PPAR- γ – Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PCR – proteína C reativa
RNA – ácido ribonucleico
RPMI – meio para cultura de células
RBC – hemácias
STAT – sinal de transdução e ativação de transcrição
SUS – Sistema Único de Saúde
TGF- β – fator de transformação de crescimento *beta*
Th1 – células T *helper* tipo 1
Th2 – células T *helper* tipo 2
TIM-4 – Proteína de membrana da célula T -4
Treg – células T reguladoras
TLR – *toll like receptor*
TNF – fator de necrose tumoral
VAMs – Macrófagos associados aos vasos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Alterações Imunes associadas à Obesidade.....	17
1.2 Obesidade e Infecções	20
1.3 Leishmanioses	23
1.4 Papel dos macrófagos na obesidade e no modelo de infecção por <i>L. major</i>	26
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral:.....	34
2.2 Objetivos específicos:.....	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1 Animais.....	35
3.2 Dieta indutora de obesidade.....	35
3.3 Avaliação do peso e índice de adiposidade.....	36
3.4 Teste de tolerância oral a glicose (GTT)	37
3.5 Cultivo e isolamento de <i>Leishmania major</i>	37
3.6 Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM) para infecção <i>in vitro</i> com <i>L. major</i> ..	38
3.7 ELISA	39
3.8 Detecção de ROS	39
3.9 Medida da atividade de arginase	40
3.10 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de macrófago	41
3.11 Infecção <i>in vivo</i>	41
3.12 Quantificações de parasitos na orelha	42
3.13. Extração das células da orelha	42
3.14 Extração de células do tecido adiposo	43
3.15 Extração de células do sangue	44
3.16 Extração de células do baço	44
3.17 Marcação de células para citometria de fluxo	45
3.18 Microscopia Intravital confocal da orelha.....	47
3.19 Injeção intravenosa de FITC-Dextran	47
3.20 Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1 Macrófagos derivados da medula óssea de C57BL/6 com obesidade são mais suscetíveis à infecção por <i>L. major in vitro</i>	48
4.2 A obesidade prejudica a resistência de C57BL/6 contra a infecção por <i>L. major</i>	52

4.3 Caracterização das populações de células da imunidade inata da pele da orelha em camundongos C57BL/6 controle e com obesidade	56
4.4 A Obesidade altera a frequência de macrófagos residentes na orelha durante o curso da infecção por <i>L. major</i>	60
4.5 Macrófagos residentes em camundongos com obesidade aumentam independentemente da proliferação local e os parasitos persistem nas células	65
4.6 A obesidade aumentou a frequência de macrófagos com a expressão de CD206 em diferentes órgãos nos camundongos C57BL/6	68
4.7 Camundongos CCR2 ^{-/-} apresentam atraso na resolução da lesão e a obesidade potencializa os danos teciduais.....	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO: Artigo	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alterações Imunes associadas à Obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como qualquer acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode ser prejudicial à saúde (WHO, 2022a). De forma objetiva, em humanos também é diagnosticada como índice de massa corporal (IMC) superior a 30kg/m² (WHO, 2023). Porém, o que de fato define o excesso de peso como prejudicial à saúde são as alterações imuno-metabólicas decorrentes dessa condição, a qual afeta drasticamente a homeostasia corporal. O aumento de gordura está associado ao aumento da resistência à insulina e da glicemia, e à produção desbalanceada de citocinas, quimiocinas e hormônios (Kusminski *et al.*, 2016). Juntos, estes fatores contribuem para o surgimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes tipo 2 e outras doenças crônicas, além de predispor os indivíduos a doenças infecciosas.

O Brasil figura entre os 5 países com maior número de pessoas obesas no mundo (Di Cesare *et al.*, 2016). O crescimento acentuado da obesidade é reflexo de uma mudança de hábitos alimentares e do estilo de vida da população, onde o sedentarismo é prevalente, e o consumo de alimentos industrializados ricos em açúcar e gorduras saturadas sobrepõe uma alimentação e estilo de vida saudáveis (Popkin *et al.*, 2012). De modo geral, o balanço entre o consumo e o gasto calórico é fator determinante para a progressão da obesidade, porém, a etiologia da doença é complexa e envolve fatores socioeconômicos, psicológicos, genéticos, dentre outros (Blüher, 2019).

As síndromes associadas a obesidade têm impacto relevante na taxa mundial de mortalidade. Doenças cardiovasculares, câncer e diabetes tipo 2 correspondem a mais de 70% das mortes precoces no mundo (WHO, 2022b). Diversos distúrbios metabólicos e inflamatórios também são associados ao excesso de peso como a hipertensão, síndrome metabólica, doenças respiratórias, esteatose hepática, síndrome do ovário policístico, infertilidade, dislipidemias, neoplasias, acidente vascular cerebral, dentre outras (Van Gaal *et al.*, 2006). Além do mais, a obesidade é fator de risco para diversas infecções microbianas a está associada à diminuição da resposta imune e a falha de vacinas (Painter *et al.*, 2015; Vermund *et al.*, 2021). A

obesidade é considerada uma pandemia global e está associada com a diminuição na expectativa de vida, estimada em 5 a 20 anos (Fontaine *et al.*, 2003).

A expansão do tecido adiposo é fator preponderante para determinar a obesidade. Em homeostasia, este órgão é responsável pela absorção de lipídios, além de ser importante fonte produtora de inúmeros hormônios e citocinas que genericamente são denominadas de adipocinas (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). O tecido adiposo é composto por adipócitos, células estromais e células do sistema imune. A grande maioria são células do sistema imune inato, sendo que os macrófagos correspondem a mais de 30% dessas células (LaMarche *et al.*, 2018). No tecido adiposo saudável, as células contribuem para a secreção das adipocinas, e citocinas como a interleucina-10 (IL-10) e o TGF-beta, que auxiliam no controle da homeostase do órgão, e fornece suporte para as funções vitais do tecido, atuando também na endocitose de metabólitos e na fagocitose de células mortas (Wynn *et al.*, 2013).

Com a obesidade, o equilíbrio do organismo é afetado. Os adipócitos podem se expandir tanto em tamanho quanto numericamente, tornando-se menos funcionais, impactando o remodelamento da matriz extracelular e alterando o perfil de substâncias secretadas. Essas respostas exigem que o tecido adiposo reaja dinamicamente as alterações do microambiente, em um processo geralmente referido como remodelamento do tecido (Wernstedt Asterholm *et al.*, 2014). Devido aos limites no armazenamento de gordura dos adipócitos, eles podem sofrer respostas crônicas de estresse e maior taxa de apoptose durante a obesidade, o que leva à inflamação local, com repercussões sistêmicas.

Os primeiros estudos que mostraram que de fato a obesidade é capaz de modificar o sistema imune foram realizados na década de 90, onde foi demonstrado que a expressão de TNF-alfa é aumentada no tecido adiposo em diversos modelos experimentais de obesidade em camundongo (Hotamisligil *et al.*, 1993). Essa citocina é capaz de ativar vias relacionadas com a inflamação, dentre elas, a do fator de transcrição NF-κB, o qual estimula a diferenciação de macrófagos inflamatórios e posteriormente de células T helper do tipo 1 (Th1) (Schutze *et al.*, 1992). O conceito de inflamação crônica de baixa intensidade tornou-se relevante e muitos outros estudos corroboraram essa tese (Gregor and Hotamisligil, 2011). Foi mostrado que a expansão de adipócitos, acompanha-se de uma vascularização ineficaz do tecido,

resultando em redução no aporte de oxigênio para as células e maior expressão do fator de transcrição sensor de hipóxia HIF1 α (He *et al.*, 2011). Além disso, a obesidade é capaz de aumentar a produção de hormônios como a leptina e resistina, e citocinas inflamatórias de maneira geral, como IL-2, IL-6 e IL-17 em detrimento a produção de adiponectinas (Prado *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2015).

Com a expansão do tecido adiposo seguido da secreção de quimiocinas, os neutrófilos são atraídos e pavimentam o caminho para o recrutamento de monócitos que futuramente poderão se diferenciar em macrófagos de acordo com os estímulos do microambiente local (Talukdar *et al.*, 2012). A infiltração de linfócitos TCD8⁺ no tecido adiposo também ocorre durante a obesidade, e precede o acúmulo de macrófagos que aumentam em resposta aos níveis aumentados de ácidos graxos livres (FFA), de glicose e da apoptose de adipócitos (Nishimura *et al.*, 2009). Todos esses eventos contribuem para a produção desbalanceada de citocinas e liberação de proteínas, como a quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL2), criando um ciclo de recrutamento celular contínuo. A teoria mais aceita, é que macrófagos do tecido adiposo de indivíduos saudáveis apresentem um perfil anti-inflamatório e a obesidade induz uma alteração fenotípica dessas células para um perfil pró-inflamatório (Lumeng *et al.*, 2007a).

Além do tecido adiposo, a mucosa intestinal também é bastante afetada. Em pessoas com obesidade ocorre alteração na microbiota e diminuição da expressão de moléculas do complexo das *tight-junctions*, como a zonulina, levando a maior extravasamento de metabólitos e endotoxinas para a corrente sanguínea (Winer *et al.*, 2016). O extravasamento de LPS, FFA e de metabólitos podem ativar receptores relacionados a inflamação, mais notoriamente o receptor de TNF, o qual possui componentes da via de sinalização semelhantes ao receptor da insulina (Baker *et al.*, 2011). O TNF-alfa atua inibindo a expressão celular de GLUT4, o qual implica em aumento da glicemia e na concentração elevada de FFA no sangue, fatores fundamentais para levar a resistência à insulina e gerar alterações sistêmicas no indivíduo (Baker *et al.*, 2011).

Além das doenças crônicas, a obesidade também é um fator de risco bem estabelecido para diversas doenças infecciosas (Karlsson and Beck, 2010), porém, os mecanismos pelos quais a obesidade aumenta o risco de infecções são complexos e multifatoriais. No entanto, há um crescente corpo de evidências indicando que a

disfunção imunológica associada à obesidade desempenha um papel crucial nessa relação. Em particular, o estado crônico de inflamação, pode perturbar o equilíbrio do sistema imune e torná-lo menos eficiente no controle da infecção e na resolução da inflamação. Além disso, o acúmulo de tecido adiposo também pode levar a alterações na distribuição e função fenotípica de células T e macrófagos, exacerbando ainda mais a disfunção imune. Isso destaca a importância de se estudar a relação entre obesidade e outras doenças, como as infecciosas.

1.2 Obesidade e Infecções

A obesidade está associada à ruptura da homeostase, que pode afetar negativamente a capacidade do organismo em montar uma resposta imune eficaz contra agentes infecciosos, como bactérias, vírus e parasitas (Torres *et al.*, 2018). Os mecanismos pelos quais a obesidade afeta a resposta imune referente aos patógenos ainda não estão totalmente elucidados.

Durante a pandemia de Covid-19, ficou claro que o excesso de peso é um importante fator de risco para a progressão de complicações graves da doença, como a síndrome respiratória aguda e tempestade de citocinas (Stefan *et al.*, 2020; Simonnet *et al.*, 2020). De fato, já foi relatado que a obesidade é capaz de exacerbar a tempestade de citocinas em outras infecções (Ramos Muniz *et al.*, 2018), além de resultar em um maior infiltrado inflamatório, e redução da capacidade fagocítica de macrófagos nas vias aéreas com recíproco dano tecidual em modelo agudo de infecção pulmonar (De Maia *et al.*, 2019).

Antes mesmo da pandemia de COVID-19, a obesidade já havia sido estabelecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de complicações e associada a maior taxa de mortalidade por Influenza em humanos (Louie *et al.*, 2011; Nave *et al.*, 2011). Além disso, a obesidade é um preditor conhecido associado a falha e redução da resposta vacinal. Já foi relatado que indivíduos com obesidade ou com sobrepeso vacinados contra influenza podem apresentar diminuição da ativação de células T CD4 e TCD8, além de menor produção de anticorpos (Sheridan *et al.*, 2012).

Camundongos com obesidade infectados com H1N1, também apresentaram maior taxa de mortalidade, com diminuição na secreção dos níveis de importantes citocinas antivirais, como IFN-alfa e IFN-beta, e redução concomitante na

citotoxicidade de células NK, as quais são essenciais para o controle da infecção pelo H1N1 (Karlsson *et al.*, 2010).

O perfil inflamatório sistêmico da obesidade também pode potencializar os efeitos inflamatórios da sepse. Estudos com camundongos mostraram que os animais com obesidade apresentaram respostas inflamatórias microvasculares exageradas que incluem a ativação de células endoteliais e produção elevada de TNF-alfa (Scott *et al.*, 2005; Vachharajani *et al.*, 2005). Já em humanos, em uma ampla meta-análise envolvendo mais de 30 milhões de indivíduos, foi evidenciado que indivíduos com IMC superior a 30 tem maior risco de sepse pós-operatória. Além disso, a presença de comorbidades, como diabetes tipo 2 aumentam ainda mais esse risco (Plaeke *et al.*, 2020).

A relação entre a obesidade e doenças infecciosas é complexa e pouco explorada na literatura. Ainda mais obscuro são as relações entre obesidade e infecções causadas por protozoários. Doenças infecto-parasitárias acometem milhões de pessoas no mundo e normalmente são classificadas como doenças negligenciadas. Estas são infecções que persistem ao longo dos anos principalmente em países tropicais e com o crescimento na incidência global de obesidade, cada vez mais torna-se relevante o estudo da relação entre as duas condições.

Apesar de poucos estudos, já é descrito que o *Trypanosoma cruzi* é capaz de infectar e persistir no interior dos adipócitos (Versiani *et al.*, 2011). O tecido adiposo pode ser considerado um local privilegiado para o parasito, já que trata-se de um importante reservatório energético, que pode fornecer FFAs e lipídeos ao protozoário, possibilitando seu crescimento (Tanowitz *et al.*, 2017). As infecções por protozoários também podem causar efeitos sistêmicos no organismo, pois atuam modulando vias metabólicas do hospedeiro, como a via do metabolismo de lipídios e glicose. A infecção aguda pelo *T. cruzi* pode induzir a lipólise na célula, sendo crucial para a sobrevivência do parasito (Nagajyothi *et al.*, 2012).

O grupo de Herbert Tanowitz foi pioneiro ao estudar os efeitos da obesidade na resposta imune durante a infecção aguda em modelo de doença de Chagas. Eles mostraram que camundongos knockouts para o receptor da leptina (*db/db*) apresentam alterações adversas durante a infecção pelo *T. cruzi*, caracterizadas por aumento da carga parasitária e grave reação inflamatória no coração devido ao aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α (Nagajyothi *et al.*, 2010). Curiosamente, utilizando

dieta rica em gordura para induzir a obesidade e diabetes tipo 2, eles observaram resultados diferentes. Animais com obesidade apresentaram redução da mortalidade, menor parasitemia, redução na carga parasitária miocárdica e dano miocárdico menos grave durante a infecção (Nagajyothi *et al.*, 2014). No caso, o estudo sugere que a obesidade induzida por dieta representa uma “obesidade mais fisiológica” que leva à expansão dos adipócitos, um excelente sítio para a infecção por *T. cruzi*. Sendo assim, argumenta-se que o tecido adiposo sequestre parasitos que, em outra situação, iriam para o coração. Já, em estudo utilizando um modelo de obesidade induzida em camundongos neonatos através de injeções de glutamato monossódico, observou-se que camundongos com obesidade infectados com *Plasmodium berghei* ANKA apresentaram dano cerebral grave devido ao aumento da produção das citocinas relacionadas à resposta Th1, como IL-12 e IFN-gama no encéfalo (de Carvalho *et al.*, 2015). Outro fator interessante é a habilidade do *Plasmodium sp.* de percepção dos nutrientes disponíveis no ambiente. Em modelo de interrupção aguda e transitória de uma dieta rica em carboidratos para uma dieta hiper lipídica, os parasitos se reproduzem menos, resultando em menor dano hepático ao hospedeiro (Zuzarte-Luís *et al.*, 2017). Portanto, da mesma forma que o sistema imune sofre impacto com a hiperglicemia e os estímulos da obesidade, o parasito também tem sua expressão gênica alterada frente aos metabólitos disponíveis.

As leishmanioses são um espectro de doenças que também podem ter o controle comprometido pela obesidade. Nosso grupo mostrou que obesidade induzida por dieta compromete a resistência de camundongos à leishmaniose visceral. Os animais alimentados com uma dieta rica em lipídios e carboidratos foram mais suscetíveis à doença, com aumento da carga parasitária visceral, dano tecidual hepático e maior inflamação caracterizada pela elevada produção sistêmica de TNF-alfa, IL-6 e IFN-gama durante a infecção por *L. chagasi* (Sarnáglija *et al.*, 2016). A leishmaniose visceral também altera o metabolismo lipídico do hospedeiro. Similar a obesidade, o elevado nível de ácido graxo no sangue durante a infecção por *L. infantum* sinaliza para formação de corpos lipídicos que podem ser utilizadas como reserva energética para a replicação do parasito (Martínez and Ruiz, 2019).

Nosso grupo também mostrou que a obesidade é um agravante para a leishmaniose cutânea, causada por *L. major*. Neste modelo, é esperado que os animais C57BL/6 curam-se espontaneamente, porém, os animais com obesidade

apresentaram lesões mais severas e uma carga parasitária maior ao final de 8 semanas de infecção. Os resultados ainda revelaram que em cultura de linfonodos drenantes à infecção houve maior produção de IL-17. Também, constatamos que macrófagos peritoneais de animais com obesidade infectados *in vitro* são menos eficientes no controle do parasito. Esses resultados sugeriram que essas células são ineficazes no controle do parasito por apresentam um comportamento duplo, com expressão aumentada da arginase e maior produção de óxido nítrico (Martins *et al.*, 2020).

Por fim, estudos recentes feitos em humanos hiperglicêmicos e obesos relataram uma piora na resposta terapêutica em indivíduos com leishmaniose visceral (Lago *et al.*, 2021). Outros trabalhos também relataram um prolongamento do tempo de resolução da lesão e a diminuição da resposta inflamatória de macrófagos frente a infecção por *L. brasiliensis* e *L. amazonenses* (Bonyek-Silva *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021b).

Portanto, torna-se interessante compreender a correlação existente entre a obesidade e leishmaniose, no que se refere ao comprometimento da resposta imune ao parasito.

1.3 Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por organismos unicelulares pertencentes ao reino Protista, da ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. O vetor dos parasitos são insetos da subfamília *Phlebotominae*, na qual apenas flebotomíneos fêmeas são capazes de transmitir a doença (Bates and Rogers, 2004). Os parasitos são hospedeiros intracelulares obrigatórios que se desenvolvem em células do sistema fagocitário, principalmente em monócitos e macrófagos (Alvar *et al.*, 2012). São consideradas doenças tropicais negligenciadas sendo endêmicas principalmente de regiões subtropicais. Ainda se estima que cerca de 1 milhão de novos casos ocorrem todo ano e aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas com alguma espécie do parasito (Alvar *et al.*, 2012). No Brasil, acontecem cerca de 25.000 novos casos de leishmaniose cutânea e 3.500 casos de leishmaniose visceral todos os anos (WHO, 2022c).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos, ou seja, completam o seu ciclo de vida passando por dois hospedeiros. Os vetores adquirem o parasito quando se alimentam dos hospedeiros ou reservatórios que já estão contaminados. Os insetos se contaminam com as formas amastigotas que não possuem flagelo, são arredondadas, isentas de movimento e se localizam no tecido do mamífero ou nas células do sistema polimorfonuclear (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Já no intestino do vetor, as formas amastigotas se diferenciam para formas promastigotas que são flageladas, alongadas e móveis. Ainda no aparelho intestinal dos flebotomíneos, em um processo denominado metaciclologênese, o parasito passa por mais um estágio de diferenciação, assumindo a forma infectante, a qual é transmitida para o hospedeiro vertebrado quando fêmeas do inseto realizam o repasto sanguíneo (Reiner and Locksley, 1995). No tecido do hospedeiro mamífero, as formas promastigotas são fagocitadas ou infectam ativamente, principalmente neutrófilos, monócitos e macrófagos. No interior da célula os parasitos assumem novamente a forma amastigota, completando o seu ciclo. Dentro das células do sistema fagocitário, mais especificamente em compartimentos denominados fagolisossomas, as amastigotas se dividem e em determinado momento podem se disseminar (Moradin and Descoteaux, 2012).

A leishmaniose cutânea é a forma mais prevalente da doença. O espectro das lesões varia desde lesões individuais, restritas a área da picada, até lesões cutâneas disseminadas, as quais se espalham pelo corpo (Carvalho *et al.*, 1994). Outro tipo de lesão são as que acometem regiões da mucosa do corpo, definidas como leishmaniose mucocutânea. A leishmaniose cutânea pode ser transmitida por várias espécies de leishmania, mas destacam-se, a *L. major*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. braziliensis*.

O modelo de infecção da leishmaniose cutânea, mais especificamente a transmitida pela *L. major*, foi essencial para várias descobertas na ciência. Trata-se de um modelo que retrata bem a dicotomia das repostas Th1/Th2 em C57BL/6 e BALB/c respectivamente, sendo que, a partir dele, muitas descobertas emergiram na imunologia (Mosmann *et al.*, 1986). Com esse modelo, foi descrito que em C57BL/6 as células dendríticas (DCs) em contato com o parasito produzem principalmente IL-12 (Heinzel *et al.*, 1993; Vieira *et al.*, 1994), a qual promove a ativação do fator de transcrição nuclear, T-bet, em células T e propicia a manutenção de uma resposta do

tipo Th1. A contínua produção de IFN-gama e TNF-alfa por essas células ativa a cascata de sinalização para a transcrição do fator nuclear NF- κ B, induzindo um fenótipo de células pró-inflamatórias (Fig.1). Já em camundongos BALB/c a produção contínua de IL-4 favorece a proliferação de células Th2, gerando subtipos de células que não conseguem eliminar o parasito de maneira eficiente.

Outros trabalhos reforçaram que o ambiente inflamatório é essencial para resolução da doença. Estudos com camundongos C57BL/6 *knockouts* para Myd88 (Muraille *et al.*, 2003) e CD40 (Belkaid *et al.*, 2000), comprovaram que a ativação de receptores do tipo *toll* (TLRs), bem como uma sinalização adequada de células Th1, são essenciais para a montagem de uma resposta inflamatória robusta contra o protozoário. Por outro lado, camundongos BALB/c quando *knockouts* para a IL-4 (Kopf *et al.*, 1996) desenvolvem lesões que se curam espontaneamente. A adição de IL-12 (Afonso *et al.*, 1994) e IFN-gama também são capazes de reverter a susceptibilidade em diferentes tipos modelos de leishmaniose (Heinzel *et al.*, 1993; Bacellar *et al.*, 1996).

O paradigma da resposta Th1 e Th2 foi por muito tempo o único recurso utilizado para explicar a variação de prognósticos de leishmaniose cutânea em humanos e camundongos, na qual se observa desde casos de infecção sem lesão, até casos onde as lesões são disseminadas por todo corpo dos pacientes com graves consequências (Pirmez *et al.*, 1993). Hoje sabe-se que apesar da dicotomia Th1/Th2 ser imprescindível para o entendimento da leishmaniose cutânea, ela não explica totalmente a fisiopatologia da doença. Por exemplo, as células NK são importantes para manutenção inicial de IFN-gama e para induzir a produção de IL-12, porém não são essenciais para levar a morte de *L. major* (Scharton and Scott, 1993). Similarmente, as células T CD8+ são importantes no estabelecimento do ambiente inflamatório e do fenótipo Th1 na infecção com baixas doses de *L. major* (Belkaid *et al.*, 2002). Apesar dessas células poderem favorecer a cura em animais resistentes, em humanos elas podem mediar um aumento na ulceração das lesões (Novais and Scott, 2015).

Portanto, muitos fatores implicam em alterações no curso da infecção e o impacto irá variar de acordo com diferentes modelos de infecção, hospedeiro e cepas. Neste contexto, a infecção de camundongos C57BL/6 com *L. major* pode ser útil para

estudar a interação parasito-hospedeiro em situações de quebra da homeostase no hospedeiro, como a obesidade.

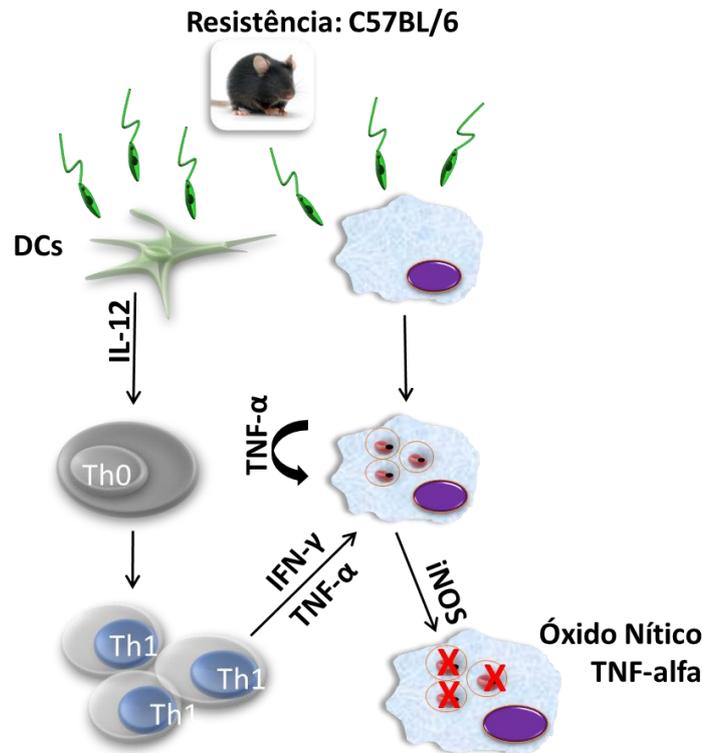


Figura 1: Modelo de resistência à infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6

As células dendríticas dos camundongos C57BL/6 ao entrarem em contato com o parasito produzem principalmente IL-12, que induzem a proliferação de células Th1, a qual através da produção de citocinas como IFN-gama e TNF-alfa, mantêm um ambiente inflamatório capaz de ativar iNOS que habilita a produção de óxido nítrico em macrófagos e monócitos, produto tóxico ao parasito.

1.4 Papel dos macrófagos na obesidade e no modelo de infecção por *L. major*

Em sua descoberta sobre os macrófagos, Metchnikoff observou: “essas células errantes no corpo da larva da estrela do mar, absorvem partículas de alimento, englobam grânulos de carmim – mas devem comer microrganismos também” (Tauber and Chernyak, 1991). Apesar de por muito tempo ser tratada como uma célula dedicada a defesa do organismo, a própria descrição de Metchnikoff traz a sua noção sobre a função homeostática dos macrófagos. No contexto de um organismo primário, os macrófagos provavelmente surgiram exercendo funções vitais como absorção de

partículas, fagocitose de corpos apoptóticos e então, eventualmente evoluíram para lidar com microrganismos.

Havia o consenso de que macrófagos se originavam apenas de monócitos circulantes. Hoje sabe-se que existem macrófagos residentes, que possuem origem exclusiva ou parcialmente embrionária. Em casos de macrófagos residentes como a micróglia (Ginhoux *et al.*, 2010) ou como os macrófagos alveolares (Guilliams *et al.*, 2013), a origem vem do saco vitelínico ou do fígado fetal, e essas células se mantem majoritariamente por proliferação local na vida adulta, enquanto em outros órgãos são gradualmente substituídas por células derivadas da medula óssea (Yona *et al.*, 2013). Trata-se de células heterogêneas, pois cada tecido possui sua própria subpopulação que fornece suporte específico ao órgão, além de exercer funções comuns como reparo tecidual, captação de moléculas sanguíneas e fagocitose de corpos apoptóticos. Além de possuírem função tecido-específica, os macrófagos residentes tem capacidade limitada de modificar seu fenótipo, mantendo o seu papel homeostático mesmo em situações de estresse (Lee *et al.*, 2020). Por outro lado, os macrófagos também podem se originar de monócitos circulantes e nesse caso possuem maior adaptabilidade. Macrófagos derivados de monócitos são capazes de também exercer muitas funções homeostáticas, além de povoar rapidamente os tecidos em resposta a diversos insultos. No contexto de uma infecção ou até mesmo na obesidade, estímulos como LPS e FFA atuam no recrutamento de monócitos que nessas condições tendem a gerar macrófagos com um perfil mais inflamatório (Misharin *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019). Portanto, a ontogenia da célula pode estar intimamente relacionada com sua função.

Os diversos receptores de superfície dos macrófagos conseguem reconhecer uma ampla gama de ligantes endógenos e exógenos, tendo papel na eliminação de células senescentes, na remodelação e reparação de tecidos após lesão ou infecção. Dentre os receptores expressos nos macrófagos estão o receptor de manose (CD206), TLRs, CD36, TIM-4, CD163, FcRs, de modo que tais receptores medeiam a captação de lipoproteínas modificadas, contribuem para o processo inflamatório e de reparo, bem como atuam na fagocitose de partículas microbianas e células mortas (Taylor *et al.*, 2005). A variedade de receptores combina com a grande complexidade de perfis de macrófagos em diferentes órgãos e as diferentes funções dessa célula dependente do tecido, da origem e da condição do microambiente.

Considerando o grau de plasticidade observado em macrófagos, no contexto da obesidade, essas células estão sujeitas a grandes alterações fenotípicas. No tecido adiposo de indivíduos com obesidade, os macrófagos podem aumentar em até 50% em relação aos indivíduos eutróficos (Weisberg *et al.*, 2003). Durante a obesidade, a maioria dos macrófagos formam estruturas em coroa, circundando os adipócitos mortos, que ao fagocitar o excesso de lipídios e resíduos celulares, tornam os macrófagos do tecido adiposo células com citoplasma maior do que os macrófagos de outros tecidos (Cinti *et al.*, 2005).

Ao longo dos anos, a teoria mais aceita na literatura aponta para uma mudança fenotípica dessas células na obesidade. Os macrófagos que apresentam um perfil condizente com a homeostasia no tecido saudável, durante a obesidade assumiriam um caráter mais pró-inflamatório, já que entram em contato com estímulos como LPS e FFA em excesso, logo aumentando a sinalização para secreção de citocinas como TNF-alfa, 1L-1beta e IL-6 (Lumeng *et al.*, 2007b; Gomez-Hernandez *et al.*, 2016).

Estudos recentes trouxeram novas descobertas sobre a alteração fenotípica e a origem do excedente de macrófagos no tecido adiposo de indivíduos com obesidade. Em uma criteriosa avaliação das células imunes do tecido adiposo, foi demonstrado que de fato, os macrófagos mais abundantes no órgão saudável possuem um perfil anti-inflamatório evidente (Silva *et al.*, 2019). Esses macrófagos estão intimamente associados aos vasos sanguíneos (VAMs), são marcados pela expressão do receptor de manose e possuem excelente capacidade endocítica. No mesmo trabalho, ao investigar camundongos com obesidade, verificou-se que o aumento expressivo de macrófagos pró-inflamatórios é proveniente de monócitos circulantes. Surpreendentemente, os autores verificaram que o aumento de macrófagos inflamatórios é proporcional, já que também foi constatado um aumento significativo de macrófagos residentes por proliferação local. No mais, a exposição crônica a LPS e FFAs tornou os macrófagos residentes menos funcionais, alterando por completo a assinatura gênica e prejudicando a sua capacidade endocítica. Deste modo, células expostas a um ambiente obesogênico podem ter suas funções danificadas, bem como seus processos inflamatórios/resolutivos alterados (Silva *et al.*, 2019).

Outros estudos, inclusive feito em humanos, corroboraram para grande diversidade de subtipos de macrófagos existentes no tecido adiposo. Os macrófagos

que formam estruturas em coroa estão bastante aumentados durante a obesidade se ligam constantemente a lipídios diversos, e assim podem ser denominados de macrófagos associados a lipídio (LAM) (Hill *et al.*, 2018). Estas células expressam receptores como CD36, CD63 e TREM2, e sob o estado de inflamação crônica, ao interagirem constantemente com padrões moleculares associados a danos (DAMPs), tendem assumir um perfil pró-inflamatório marcado pela expressão de CD11c. Estas células são ricas em corpúsculos lipídicos e também secretam quimiocinas atraentes de leucócitos e citocinas como IL-6 e TNF-alfa. Existem outros subtipos de macrófagos que podem ter origem embrionária ou de monócitos circulantes que estão associadas a terminações nervosas e são capazes de regular a lipólise e o metabolismo de glicose (Jaitin *et al.*, 2019; Hildreth *et al.*, 2021). Por fim, macrófagos perivascularres de origem embrionária expressam CD206, e em resposta a hipóxia são capazes de produzir fatores angiogênicos como PDGF, EGFR e VEGF (Silva *et al.*, 2021a; Cao *et al.*, 2022). Cada tipo de macrófago povoa um nicho específico dentro do tecido adiposo e possuem capacidade de adaptar dinamicamente aos estímulos presentes no microambiente, sofrendo alterações fenotípicas relevantes principalmente durante a obesidade (Figura 2) (Jaitin *et al.*, 2019; Hildreth *et al.*, 2021).

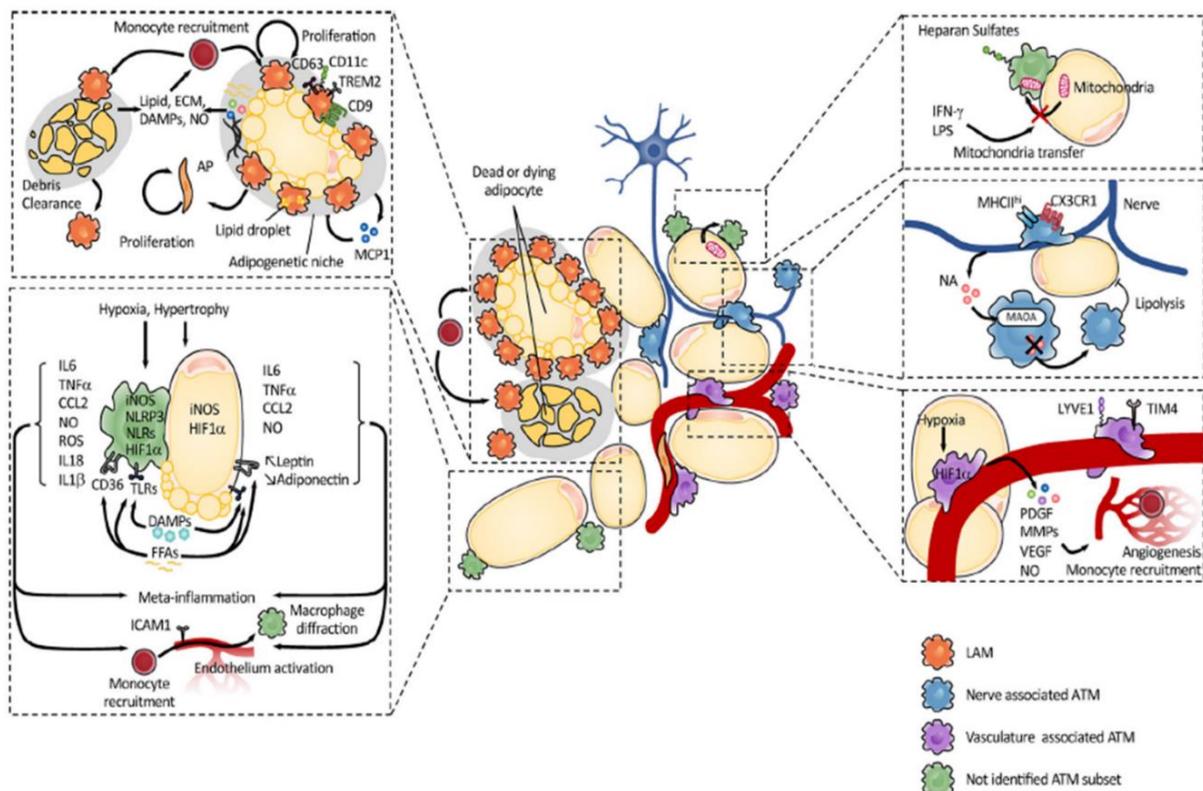


Figura 2: Diferentes subtipos de macrófagos do tecido adiposo e seus respectivos nichos

LAMs (macrófagos associados a lipídeos) estão localizados ao redor de adipócitos mortos, formando estruturas em coroa e interagindo constantemente com lipídeos e DAMPs, que induzem a inflamação. O microambiente adipogênico criado pela morte celular e recrutamento de macrófagos, por sua vez, induz o recrutamento de monócitos e proliferação de macrófagos; A hipóxia e a hipertrofia dos adipócitos aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, aumentando a meta-inflamação associada à obesidade. Além das citocinas, os adipócitos secretam adipocinas como a leptina e a adiponectina. Outras populações de macrófagos estão intimamente associadas a terminações nervosas e neurônios e são capazes de regular a lipólise. Macrófagos de origem embrionária expressam CD206, LYVE1, TIM4 e são encontrados em contato próximo com a vasculatura do tecido. Em resposta à hipóxia, eles são capazes de produzir fatores angiogênicos como PDGF e VEGF. (Chakarov *et al.*, 2022)

A ativação e a polarização de macrófagos foram extensamente estudadas em condições *in vitro*. Macrófagos cultivados em meio de cultura sob estimulação de IFN-gama e LPS, são denominados classicamente ativados, e tem maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que habilita a produção óxido nítrico (NO), e a produção de citocinas inflamatórias como o TNF-alfa (Nathan *et al.*, 1983). Posteriormente, foi descoberto que a macrófagos expostos a IL-4 assumem um perfil alternativo, na qual a enzima arginase é mais expressa, gerando macrófagos que

expressam CD206 e com característica de reparo tecidual (Stein *et al.*, 1992). Em menção a nomenclatura utilizada para linfócitos Th1 e Th2, a terminologia M1 e M2 foi cunhada para fazer referência a esses dois extremos de ativação (Mills *et al.*, 2000).

Embora útil para estudos *in vitro* e em alguns contextos específicos, os termos M1 e M2 podem causar desentendimento quando utilizada indiscriminadamente. Extrapolar que macrófagos de um determinado tecido exibe perfil M1 ou M2 pode ser uma grande simplificação. Quando se pensa no macrófago de um tecido, seja a célula residente ou não, esta apresenta um fenótipo condizente com o tecido, localização e com os estímulos que com ela interage, e muito provavelmente possui um perfil diverso e não condizente com o perfil M1 e M2 observado em cultura celular.

Outros estudos realizados *in vitro*, utilizaram componentes que mimetizam o sangue e o tecido adiposo de indivíduos com obesidade para comparar a ativação de macrófagos (Kratz *et al.*, 2014). Observou-se que a ativação metabólica é independente da ação pró-inflamatória, levando a um aumento parcial na produção de citocinas inflamatórias, além de induzir um aumento na expressão do fator de transcrição PPAR- γ e a expressão de genes como CD36 e PLIN2, que são marcadores de células fagocíticas e com características predominantemente anti-inflamatórias. O termo “inflamação metabólica” foi então utilizado para descrever as células que estão sob ambiente crônico de estresse metabólico, caracterizado pela constante estimulação por ácidos graxos livres e carboidratos, ambiente característico da obesidade.

A participação dos macrófagos também foi bastante estudada em diversos modelos de infecção por leishmania. Os extremos de polarização de macrófagos M1-M2 refletem também em perfis respectivamente de resistência e suscetibilidade dessas células na infecção. No entanto, o curso da infecção varia de acordo com a linhagem do camundongo, a espécie ou cepa do parasito, dose e local da infecção. O microambiente *in vivo* é mais complexo, de modo que vários fatores têm papel fundamental no prognóstico da doença, desde o tipo de tecido onde ocorre o início da infecção, às citocinas e quimiocinas secretadas, a saliva do vetor (Belkaid *et al.*, 1998), e a microbiota da pele infectada (Singh *et al.*, 2021).

Os diferentes subtipos de macrófagos no tecido interagem com os estímulos no local da lesão e respondem a eles. Em modelos de resistência, monócitos e macrófagos ao longo do curso da infecção produzem TNF-alfa, IFN-gama, IL1-beta e

expressam iNOS que catalisa a oxidação da L-arginina em L-citrulina, habilitando a produção de óxido nítrico, produto tóxico para o parasito (Charmoy *et al.*, 2016; Schleicher *et al.*, 2016). Além da essencial produção de óxido nítrico, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante no controle do parasito (Carneiro *et al.*, 2018). Por outro lado em um ambiente onde células dendríticas produzem predominantemente IL-4, IL-10 e IL-13, há indução de um fenótipo de macrófagos com perfil distinto de inflamação, favorecendo a hidrólise da L-arginina pela enzima Arginase 1, gerando produtos como a ureia e a ornitina, fundamental para a síntese de poliaminas e sobrevivência do parasito (Kane and Mosser, 2001; Roberts *et al.*, 2004).

A lesão cutânea intradérmica causada pela *L. major* induz o recrutamento de neutrófilos minutos após o inóculo (Peters *et al.*, 2008). Logo após os momentos iniciais da infecção, monócitos inflamatórios (LY6C⁺CCR2⁺) migram para a lesão substituindo a grande população inicial de neutrófilos, também sendo eficientes para fagocitose e para a eliminação do parasito (Romano *et al.*, 2017). Mesmo entre os monócitos há diferença na resposta contra o parasito. As células que expressam o receptor Ly6C são mais eficientes no *killing* de parasitos do que monócitos de patrulha, caracterizados pela expressão do receptor de fractalcina (CX3CR1) (Goncalves *et al.*, 2011). Diferentemente dos monócitos que possuem papel mais ativo na eliminação do patógeno, neutrófilos podem fagocitar os parasitos, embora, na maioria das vezes não sejam capazes de eliminá-los, podendo se tornar portas de entrada para a posterior infecção de macrófagos (Laufs *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2008).

Além dos monócitos inflamatórios, os macrófagos recém derivados de monócitos e os macrófagos residentes são os principais agentes ativos no curso da infecção por leishmanias. Tais células podem ser ativamente infectadas pelos parasitos, realizar fagocitose através de receptores específicos para moléculas do protozoário, ou ainda fagocitar neutrófilos ou células apoptóticas contendo o parasito, no modelo conhecido como “Cavalo de Tróia” (Laskay *et al.*, 2003). Os macrófagos derivados da medula óssea atuam de forma mais contundente na manutenção do ambiente inflamatório produzindo mediadores como TNF-alfa e IFN-gama, possuindo papel central na eliminação ativa do patógeno, enquanto macrófagos residentes podem favorecer a replicação das leishmanias (Bogdan, 2020).

Recentemente, o grupo de David Sacks mostrou que os macrófagos residentes da pele, caracterizados pela expressão do receptor de manose, são as principais células infectadas em um modelo de infecção por *L. major* no camundongo C57BL/6 (Chaves *et al.*, 2020). Além do mais, foi demonstrado que a cepa *L. major* (Seidman [*LmSd*]), a qual induz lesões cutâneas graves e incuráveis em camundongos C57BL/6, infecta preferencialmente os macrófagos dermais residentes e que a depleção destes gerou lesões que se curam espontaneamente (Lee *et al.*, 2018). Vale ressaltar que nesse caso, o ambiente inflamatório Th1 não foi suficiente para repolarizar os macrófagos residentes, de modo que os parasitos persistem nas células ao longo da infecção.

O modelo da infecção causada por *L. major* apresenta-se como uma ferramenta valiosa para o estudo de diversas áreas da pesquisa, incluindo aquelas relacionadas à obesidade. Por exemplo, atualmente há uma lacuna sobre como ocorre o processo migratório das células em indivíduos com obesidade. Também não se sabe como os macrófagos residentes atuam nos processos imunes durante a infecção, ou mesmo como um organismo com inflamação sistêmica já pré-estabelecida responde um patógeno.

Portanto, o estudo do efeito da obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6 e infectados com *L. major* podem contribuir para compreensão desses questionamentos. O entendimento da resposta de macrófagos em situações crônicas de estresse, podem auxiliar no delineamento de novas estratégias terapêuticas, principalmente pensando na modulação do perfil de macrófagos de indivíduos com obesidade que são grupo de risco para inúmeras infecções.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar se macrófagos de camundongos com obesidade apresentam alterações na resposta à *L. major* em modelo de infecção *in vitro* e *in vivo*, com intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na associação entre obesidade e maior susceptibilidade à infecção por esse parasito.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar o perfil de macrófagos derivados da medula óssea de animais C57BL/6 na infecção por *L. major in vitro*, quando estimulados com componentes presentes em excesso na obesidade (glicose, insulina, palmitato);
- Avaliar o perfil de macrófagos derivados da medula óssea de animais com obesidade induzida por dieta quando infectados por *L. major*, sob estímulos como LPS, IFN-gama e IL-4
- Analisar o desenvolvimento da lesão e avaliar a carga parasitária nos camundongos com obesidade induzida por dieta infectados
- Caracterizar os subtipos de células inatas na pele de camundongos controle e com obesidade (com ou sem infecção), com base na expressão de receptores, taxa de proliferação e capacidade endocítica;
- Avaliar a frequência dos subtipos celulares 2 dias, 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas após a infecção;
- Identificar a presença de macrófagos residentes na lesão causada por *L. major* nos camundongos com obesidade;
- Verificar se os macrófagos residentes estão envolvidos na susceptibilidade aumentada à *L. major* na obesidade.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 fornecidos pelo biotério central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia da UFMG em gaiolas de plástico, com livre acesso à água contendo no máximo 5 animais/gaiola. Os animais foram pareados com base na idade (8 semanas) e peso, para então receberem a dieta controle (AIN93G) ou dieta indutora de obesidade (HSB) (Tabela1) a vontade por 12 semanas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo de submissão número 338/ 2012 (Anexo 1). Animais C57BL/6-LySM-GFP foram cordialmente cedidos pelo professor Flávio Almeida, da UFMG. Os camundongos C57BL/6-CCR2^{-RFP} foram cordialmente cedidos pelo professor Gustavo Menezes da, UFMG. Ambas as linhagens de camundongo foram pareados com seus respectivos controles e mantidos nas mesmas condições que os C57BL/6 antes e durante os experimentos.

3.2 Dieta indutora de obesidade

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

Tabela 1 – Ingredientes das dietas controle e hipercalórica

	Controle (AIN 93G)	HSB (hipercalórica)
Amido de milho (g)	397,5	208,6
Caseína (g)	200	200
Amido dextrinizado (g)	132	0
Açúcar (g)	100	232
Óleo de soja (g)	70	70
Celulose (g)	50	50
Mix mineral (g)	35	35
Mix de vitaminas (g)	10	10

Cistina (metionina) (g)	3	3
Bitartarato de colina (g)	2,5	2,5
BHT (g)	0,014	0,014
Manteiga (g)	0	188,9
TOTAL (g)	1000	1000

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

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

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

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

3.3 Avaliação do peso e índice de adiposidade

Ao longo das 20 semanas o peso corporal dos animais foi aferido no mesmo dia da semana e horário para reduzir a variabilidade na aferição. A temperatura do biotério foi mantida em aproximadamente 26°C, para proporcionar a manutenção da temperatura corporal dos animais mais constante possível de forma e manter a estabilidade do ganho de peso.

Para avaliar o índice de adiposidade, os camundongos foram pesados no momento do sacrifício depois de anestesiados. Em seguida, retirou-se o tecido adiposo epididimal, inguinal e mesentérico, para a pesagem do tecido. Os dados foram calculados de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de adiposidade} = \text{peso do tecido adiposo} / \text{peso corporal}$$

3.4 Teste de tolerância oral a glicose (GTT)

Para o teste de tolerância oral a glicose, os camundongos ficaram em jejum por 6 horas e posteriormente foram pesados para que a quantidade de glicose fosse definida individualmente. Foi estabelecido um consumo de 2g/kg de D-glicose anidra (Synth, Diadema, SP, Brasil). A glicemia de jejum dos animais foi mensurada em mg/dl com glicômetro de tiras (Accu-Chek Performa) e em seguida foi administrada a solução de glicose por meio de gavagem (glicose/kg de peso). A glicemia foi medida retirando uma gota de sangue da cauda do camundongo nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos.

3.5 Cultivo e isolamento de *Leishmania major*

Os parasitos utilizados, da espécie *Leishmania (Leishmania) major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivados em meio de cultura Grace's (GIBCOBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) pH 6.2 suplementado com 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 20µg/mL de sulfato de gentamicina (Schering-Plough – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2mM de L-glutamina (GIBCO), mantidos em estufa a 25°C. Os parasitos que expressam proteína fluorescente vermelha (RFP) (*L. major*-RFP) foram mantidos em meio 199 (GIBCO) completo suplementado com 0,01% de geneticina (GIBCO, e foram cordialmente fornecidos pelo professor Dr. David Sacks (NIAID, NIH, Bethesda, EUA).

Os repiques foram feitos a cada três dias de cultivo. Em condições estéreis, os inóculos foram preparados com culturas de cinco dias, fase estacionária do crescimento, tempo em que a cultura está rica em formas promastigotas metacíclicas. Para separação das metacíclicas a cultura com *L. major* em fase estacionária é centrifugado a 1500 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante, então, desprezado e o *pellet* recuperado em 2mL de salina tamponada com 0,01 M de fosfato de sódio pH 7,2 (PBS). Em seguida as formas promastigotas metacíclicas foram separadas por gradiente de Ficoll (Ficoll® 400, Sigma- Aldrich, INC., St Louis, MO, EUA). Em um tubo cônico de 15mL, foram colocados 2mL de Ficoll 20%, em seguida 2mL de Ficoll 10%, escorrendo pela parede do tubo, sem homogeneizar as duas soluções, formando duas fases distintas (gradiente de Ficoll). Finalmente, a suspensão de *Leishmania*, foi acrescentada escoando com cuidado pela parede do tubo formando a

terceira fase. Essa mistura trifásica foi centrifugada a 800 x g por 10 min a 4° C. Formou-se um anel branco e todo o sobrenadante acima dele, correspondendo às fases Ficoll 10% e *Leishmania* em PBS, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Em outro tubo, adicionou-se 10mL de PBS ao sobrenadante coletado e essa suspensão foi centrifugada a 1500 x g por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante formado foi desprezado e o sedimento foi recuperado em 2mL de PBS. Foi retirada uma alíquota diluída 1:100 em PBS contendo formalina a 4% e o número de parasitos foi contado em câmara de Neubauer.

3.6 Obtenção de macrófagos de medula óssea (BMDM) para infecção *in vitro* com *L. major*

As células da medula óssea de animais C57BL/6 foram obtidas através da lavagem do fêmur e tíbia dos animais com PBS complementado com 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (GIBCO). As células precursoras da medula óssea foram incubadas em placa de Petri (Jprolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 2mM de L-glutamina (GIBCO) e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, os quais produzem o fator M-CSF responsável pela diferenciação das células precursoras em macrófagos. As células foram mantidas em 10mL de meio DMEM F12 (GIBCO) por quatro dias, após esse período foram adicionados mais 5mL do meio DMEM F12 (GIBCO). No sétimo dia de cultura, removeram-se 5mL do sobrenadante da cultura e foram adicionados mais 5mL de meio de cultura. Finalmente, após nove dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado, a concentração celular foi ajustada para necessidade de cada ensaio a ser feito com os macrófagos obtidos. Durante todo o processo de diferenciação e para todos os ensaios as células foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ (Eppendorf, Hamburg, Alemanha)(Zhang *et al.*, 2011).

As células foram plaqueadas nas concentrações adequadas de cada ensaio e foram deixadas na estufa por 16 horas em placas contendo meio de cultura DMEM F12 completo sem sobrenadante de cultura L929. Após esse período as células não aderentes foram removidas por lavagem dos poços com PBS aquecido a 37°C,

procedimento repetido por três vezes. Novamente foi adicionado meio F12 completo, sem o fator L929, assim como os estímulos: 10ng/mL de IFN-gama (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA), 100ng/mL de LPS (InvivoGen, Toulouse, France) e 10ng/mL de IL-4 (BD). Outros estímulos também foram utilizados: glicose (30 mM), insulina (10nM) e palmitato (0.4mM). Após 2 horas na presença destes estímulos, foi feita a infecção *in vitro* destas células. Para o índice de infecção a proporção foi de 1:5 (macrófago/*L. major* metacíclicas) e as culturas incubadas por mais 4 horas. Após esse período de infecção, as placas foram lavadas três vezes com PBS para remoção dos parasitos extracelulares fixadas e incubadas novamente em meio DMEM por 48 e 72 horas. As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção: (porcentagem de células infectadas x número de amastigotas/número total de células).

Após 24 horas foi coletado o sobrenadante para dosagem de TNF-alfa por ELISA e óxido nítrico. Após 48 horas realizamos o ensaio da atividade de arginase e a coleta do sobrenadante de cultura para medição de IL-10 por ELISA.

3.7 ELISA

A medida da concentração do TNF-alfa em sobrenadantes de cultura de macrófagos coletado 24h após o cultivo. Para a IL-10 a coleta de sobrenadantes foi após de 48h de cultivo. Foi utilizada a técnica de Elisa de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, MTA00B – TNF-alfa; DY417-05- IL10 Minneapolis, MN, USA).

3.8 Detecção de ROS

Para avaliar a produção de ROS por macrófagos em ensaios de luminometria, as células foram obtidas como descrito previamente, e ressuspendidas em meio RPMI sem vermelho fenol. Um milhão de células foram acrescentadas a cada poço de placas opacas de 96 poços (NUNC, Rochester, NY, USA). Em seguida foi adicionado

a cada poço 0,05mM de 17luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona, Sigma-Aldrich), 50 U/mL de IFN-gama (BioLegend, San Diego, CA), 100 ng/mL de LPS e promastigotas metacíclicas de *L. major* na proporção 10:1 (parasitos/macrófago). As leituras foram realizadas durante 90 minutos, com intervalos de 2 minutos entre cada uma. A produção de ROS foi expressa como unidades relativas de luz, representada pela área sob a curva da intensidade de luz gerada durante a reação entre ROS e Luminol.

3.9 Medida da atividade de arginase

A atividade da enzima arginase I foi mensurada a partir da homogeneização de células como descrito por Corraliza (CORRALIZA et al., 1994), com algumas modificações (KROPF et al., 2005). As culturas de células infectadas ou não, foram homogenizadas com 50µL de Triton X-100 (Sigma- Aldrich) por 30 minutos em agitação e 35µL foram utilizados para o ensaio. Após a lise celular, a Arginase I foi ativada com a adição de seus co-fatores: 50µL de 10mM MnCl₂ (Sigma- Aldrich) e 50µL de 50mM TrisHCl (Sigma- Aldrich) (pH7,5) a 55°C por 10 minutos. Em seguida a amostra obtida foi transferida para outra placa de 48 poços em duas diferentes concentrações. Em um dos poços foi feita a transferência da amostra pura, 55µL, e a partir desta foi feita uma diluição de 1:10 (5µL de amostra + 45µL de H₂O destilada). Para que fosse mensurada a atividade da enzima foi adicionado às amostras o seu substrato, 50µL de 0,5 mM de L-arginina (Sigma Aldrich) (pH 9,7). Após, as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Em seguida a reação foi parada com a adição de 400µL de uma solução de ácidos (H₂SO₄-H₃PO₄-H₂O) na proporção de 1:3:7. Foram então adicionados 25µL de α- isonitrosopropiofenol (Sigma Aldrich) 9% em etanol 100%. A placa foi então incubada a 95°C por 45 minutos. A curva padrão foi feita a partir de ureia (Sigma Aldrich) mg/mL diluída sucessivamente 1:2. Após os 45 minutos de incubação a 95°C, 100µL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada leitura em leitor de microplacas a 540nm. O resultado é expresso como unidade de atividade de arginase por órgão. Cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1µmol ureia/minuto.

3.10 Dosagem de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de macrófago

Para a medida da concentração de óxido nítrico produzida, os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram coletados 24h após a infecção *in vitro*. A produção de óxido nítrico foi avaliada a partir de nitrito em liberado no sobrenadante de cultura usando a reação de Griess (Bryan and Grisham, 2007).

Em resumo, 50 μL das amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços e o padrão nitrito de sódio (250 μM), que foi diluído (1:2) nos poços posteriores. Poços em branco consistiam apenas de meio DMEM F12 (GIBCO) completo. Em seguida, foram adicionados 100 μL de solução de Griess em todos os poços ocupados da placa. A placa foi mantida no escuro por 10 minutos e a densidade ótica foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System, modelo SPECTRAmax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.11 Infecção *in vivo*

Camundongos machos C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas foram separados em quatro grupos: animais controles, alimentados com dieta AIN93G; animais com obesidade. Alimentados com dieta indutora de obesidade; animais controles e infectados e animais com obesidade infectados. Em média, a dieta foi oferecida por durante 20 semanas. Na 12^a semana de consumo de dieta, quando obesidade está bem estabelecida e a maioria dos efeitos metabólicos decorrentes dessa condição já estão bem definidos (Maioli *et al.*, 2016), os animais foram infectados com uma dose de 2×10^5 promastigotas metacíclicas de *L. major* e acompanhados até a oitava semana de infecção. Semanalmente, os animais tiveram o peso corporal e glicemia acompanhados. Os animais foram eutanasiados 2 dias, 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas após a infecção.

Para infecção, foram utilizados 2×10^5 promastigotas metacíclicas obtidas após 5 dias de cultivo, na fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram inoculados por via intradérmica na orelha esquerda de cada animal (10 μL). Os animais do grupo controle que foram avaliados 2 dias após a infecção, receberam a o mesmo volume (10 μL) de PBS na orelha esquerda. Com auxílio de um paquímetro (Starret, SP,

Brasil), avaliou-se o curso de infecção semanalmente por meio do cálculo da diferença entre o diâmetro e a espessura da orelha infectada e da orelha não infectada.

3.12 Quantificações de parasitos na orelha

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

3.13. Extração das células da orelha

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg) (definidos pelo CEUA UFMG), e eutanasiados por deslocamento cervical. As orelhas foram retiradas, os pelos excedentes foram removidos, e as orelhas ficaram por 3 minutos imersas em etanol 70%. As orelhas foram divididas em duas porções (ventral e dorsal) e colocadas em poços individuais, em placa de 24 poços. A primeira incubação foi realizada com 500µL de solução com 62,5 µg/mL de Liberase TL – complexo de enzimas digestivas (Roche, Indianapolis, IN, USA) em meio de cultura RPMI, para dissociação do tecido rico em colágeno. As orelhas ficaram incubadas em estufa de CO₂ por 1 hora e 30 minutos à 37°C, sob constante agitação. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida com solução de RPMI acrescido de 5% de Soro Fetal Bovino e 0,05% de

desoxiribonuclease I (Sigma-Aldrich). O tecido e o líquido foram transferidos para uma placa de 6 poços e as orelhas foram maceradas sobre o filtro de células de 50µm (Sigma-Aldrich); o homogenato foi mantido em gelo. Após maceradas, as células foram coletadas em tubos cônicos de 15 mL, e centrifugadas por dez minutos à 1200g em centrífuga refrigerada à 4°C. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

3.14 Extração de células do tecido adiposo

O procedimento de extração de células do tecido adiposo sucedeu com adaptações como descrito anteriormente (Cho *et al.*, 2014). Os animais foram anestesiados por via i.p com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg), e eutanasiados por deslocamento cervical. Primeiramente, foi feita a desinfecção da pele com etanol 70%. O tecido adiposo perigonadal foi exposto com técnica estéril, e as gônadas removidas. Aproximadamente 500mg do tecido foi pesado e posteriormente lavado com PBS para remoção de contaminantes. Em tubos de 1,5mL, o tecido adiposo foi picotado em pedaços pequenos com tesoura (43prox. 3-5 mm de tamanho). Após picotados, deve-se adicionar 2ml da solução de colagenase: RPMI, 2mg/mL de Colagenase tipo II (Sigma-Aldrich) e 150µg/mL desoxiribonuclease I (Sigma-Aldrich). O tecido picotado foi colocado sob algum recipiente fechado, e submetido a vigorosa agitação à 37°C por uma hora. Após o período de agitação, o tecido ficou no gelo por 5 minutos para interromper a reação de digestão da colagenase. Com auxílio de uma seringa, o homogenato foi sugado e expelido por uma agulha (22G), com intuito de remover os adipócitos (procedimento deve ser repetido por 4 vezes). O homogenato então foi filtrado em filtro de células de 100µm e colocados em tubos cônicos de 50mL. Todo material remanescente no filtro, foi lavado com meio RPMI contendo 5% de SFB, até completar 10mL no tubo. Os tubos com as soluções foram centrifugados a 500xg por 10 minutos à 4°C. A camada de gordura fica no sobrenadante, enquanto os leucócitos no infranadante e no pellet. O sobrenadante foi aspirado gentilmente e descartado. Por fim, o pellet foi desfeito junto ao infranadante, o homogenato transferido para tubos cônicos de 15mL e o volume total acertado com RPMI acrescido de 5% de SFB para 2mL. Os tubos foram

centrifugados por dez minutos à 1200xg em centrífuga refrigerada à 4°C. As células que ficaram sedimentadas, foram ressuspensas em meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

3.15 Extração de células do sangue

Os animais de cada grupo foram eutanasiados por superdosagem anestésica; utilizando 180 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilasina, administrada via intraperitoneal. O sangue foi coletado por pulsão cardíaca, utilizando EDTA como anticoagulante, em tubos de polietileno que já continham os anticorpos previamente diluídos e incubados no dia antecedente. Os tubos foram homogeneizados e incubados novamente, ao abrigo da luz, por 30 minutos à 4°C. Antes de usar o sangue para análise de citometria de fluxo, os glóbulos vermelhos (RBC) foram lisados. Para lise de hemácias, utilizou-se solução de lise de hemácias (RBC lysis Buffer – eBioscience, San Diego, CA, USA). Para cada 100µL de sangue, adicionou-se 2mL da solução de lise. Os tubos foram incubados novamente por 10 minutos ao abrigo da luz à 4°C. Após a lise, foram adicionados 1mL de PBS em cada tubo, completando o volume para 3mL. Os tubos foram centrifugados a 500xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado e homogeneizado em 200µL de meio RPMI. As células viáveis foram quantificadas por meio de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Tripán a 0,4%.

3.16 Extração de células do baço

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg), e eutanasiados por deslocamento cervical. O baço foi retirado, então, o órgão foi macerado, e as suspensões celulares foram homogeneizadas e centrifugadas à 500g por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A lise de hemácias do baço foi feita com água e posteriormente a osmolaridade foi ajustada com PBS concentrado a 10 vezes. Assim, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em RPMI acrescido de 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e

50µM de beta-mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2. As células foram contadas no microscópio óptico, com câmara de Neubauer.

3.17 Marcação de células para citometria de fluxo

Após centrifugação e ressuspensão em meio RPMI, as células dos respectivos órgãos foram lavadas com PBS acrescido de 0,5% de albumina bovina (BSA) (PBS-wash) e então incubadas com Fc-block (anti-CD16/32 – BD Biosciences) em gelo por 30 minutos. Após lavagem e centrifugação, as células receberam 20µl de variadas combinações de anticorpos de superfície (diluídos previamente de acordo com as titulações presentes na Tabela 3).

Os fluorocromos associados com anticorpos utilizados para análise das células foram: Ficoeritrina (PE) conjugado com CD11b ou Ly6G, PECy7 conjugado com F4/80 ou CD36, isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com Ly6G, ou com CD45 ou Anexina, Alexa Fluor 488 conjugado com Ki67, peridinina clorofila (Per-CP)cy5.5 conjugado com Ly6C Alofocianina (APC) conjugado com CD206, APCcy7 conjugado com MHCII ou Arginase, BV421 conjugado com CD11c, Pacific blue conjugado com CD11b, MHCII ou Ki67, Amcyan conjugado com L/D. Após a adição dos anticorpos as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C em abrigo de luz. Em seguida foram lavadas com PBS-wash e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspendido em 200µl de solução fixadora contendo 1% paraformaldeído. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de leitura apropriados (7,5 cm x 1cm), armazenadas a 4°C e protegidas de luz. Os dados foram coletados utilizando-se o citômetro FACSCanto II acoplado ao software Diva (BD Biosciences) e analisados utilizando-se o software FlowJo (TreeStar). Os *gatings* foram determinados empregando controles de isotipos e / ou comparação com as populações controle e as amostras *fluorescence minus one* (FMO). Para os controles e FMOs, adquiriu-se cerca de 20.000 eventos. Já para as amostras, foram adquiridos 20.000 a 50.000 eventos. A estratégia de separação por populações da orelha aplicada para análise de neutrófilos e subtipos de monócitos e macrófagos nas orelhas de camundongos infectados ou não infectados, tomou como base os estudos de Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2018),

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

Molécula	Anticorpo	Diluição	Marca
CD11b	PE	1:400	Biolegend
Ly6G	PE	1:400	BD
F4/80	Pe-Cy7	1:400	Biolegend
CD36	Pe-Cy7	1:200	Biolegend
Ly6G	FITC	1:400	BD
CD45	FITC	1:400	eBioscience
Anexina	FITC	1:100	Biolegend
Ki67	AF488	1:100	Biolegend
Ly6C	PercpCy5	1:400	eBioscience
CD206	APC	1:200	BD
MHCII	APC-cy7	1:200	BD
Arginase	APC-cy7	1:200	BD
CD11c	Bv421	1:200	Biolegend
CD11b	Pacific Blue	1:300	Biolegend
Ki67	Pacific Blue	1:100	eBioscience
MHCII	Pacific Blue	1:200	BD
<i>Fc Block</i>	-	1:100	BD Pharminogen
LIVE/DEAD	Amcyan	1:1000	eBioscience

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

3.18 Microscopia Intravital confocal da orelha

Microscopia Intravital Confocal (IVM) da orelha de camundongos infectados foi realizada conforme descrito anteriormente com adaptações (Carneiro *et al.*, 2017), utilizando microscópio Confocal Nikon Ti A1R equipado com detector espectral e estágio motorizado XYZ. Os camundongos C57BL/6-LysM-GFP+ foram anestesiados e após 4 horas, 1 dia 2 dias após a infecção, os animais foram anestesiados e as orelhas foram fixadas em suporte de acrílico compatível com o microscópio para realização da IVM. Os vídeos são feitos em objetiva de 20x, definição de pixel 512x512 e aquisição de um frame a cada 10 segundos por 5 minutos em posição XYZ fixada, sendo um vídeo por animal. A aquisição de imagens é realizada em objetiva de 10x e 20x, definição de pixel 1024x1024 sendo 10 imagens de campos por animal.

3.19 Injeção intravenosa de FITC-Dextran

Os camundongos foram injetados com 18mg/kg de FITC-Dextran (Sigma-Aldrich) por via intravenosa e foram eutanasiados 30 minutos depois, para aferição via citometria de fluxo da intensidade de fluorescência do FITC. Especificamente, foi avaliada a expressão da fluorescência em células do baço e das orelhas, como medida da capacidade endocítica.

3.20 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0. Os dados multivariados foram analisados aplicando one way ANOVA e teste post hoc de comparação múltipla de Tukey e comparação entre duas condições de tratamento pelo teste t de Student de Student não pareado de uma cauda. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Macrófagos derivados da medula óssea de C57BL/6 com obesidade são mais suscetíveis à infecção por *L. major* *in vitro*

Em estudo anterior verificamos que os macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 com obesidade, possuem uma resposta inflamatória menos eficiente à infecção *in vitro* por *L. major* (Martins *et al.*, 2020). Também, um estudo do grupo de Lev Becker, demonstrou que macrófagos estimulados *in vitro*, em um contexto que simula os metabólitos abundantes no sangue de pacientes com obesidade apresentam um perfil inflamatório mais brando. Resumidamente, foi mostrado que a ativação metabólica por glicose, insulina e palmitato (Mme) induz menor produção de citocinas inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6, quando comparada com a ativação clássica M1 (IFN-gama e LPS) (Kratz *et al.*, 2014; Coats *et al.*, 2017). Deste modo, utilizamos um modelo semelhante para investigar como os macrófagos derivados da medula óssea, incubados *in vitro* com glicose, palmitato e insulina, interagiriam com as promastigotas metacíclicas de *L. major* na infecção *in vitro*.

De maneira semelhante ao descrito por Kratz e colaboradores, observamos que os Mme não foram capazes de matar os parasitos de forma tão eficiente quanto os macrófagos estimulados com LPS e IFN-gama (Fig. 3A-B). A resposta dos macrófagos com ativação metabólica foi similar ao grupo sem estímulo (M0) após 72 horas de infecção, quando analisados a porcentagem de células infectadas (Fig. 3A) e a média de amastigotas por macrófago infectado (Fig. 3B). Além disso, a ativação metabólica não foi suficiente para aumentar a produção de moléculas com atividade leishmanicida como o TNF-alfa (Fig. 3C) e o ROS (Fig. 3D).

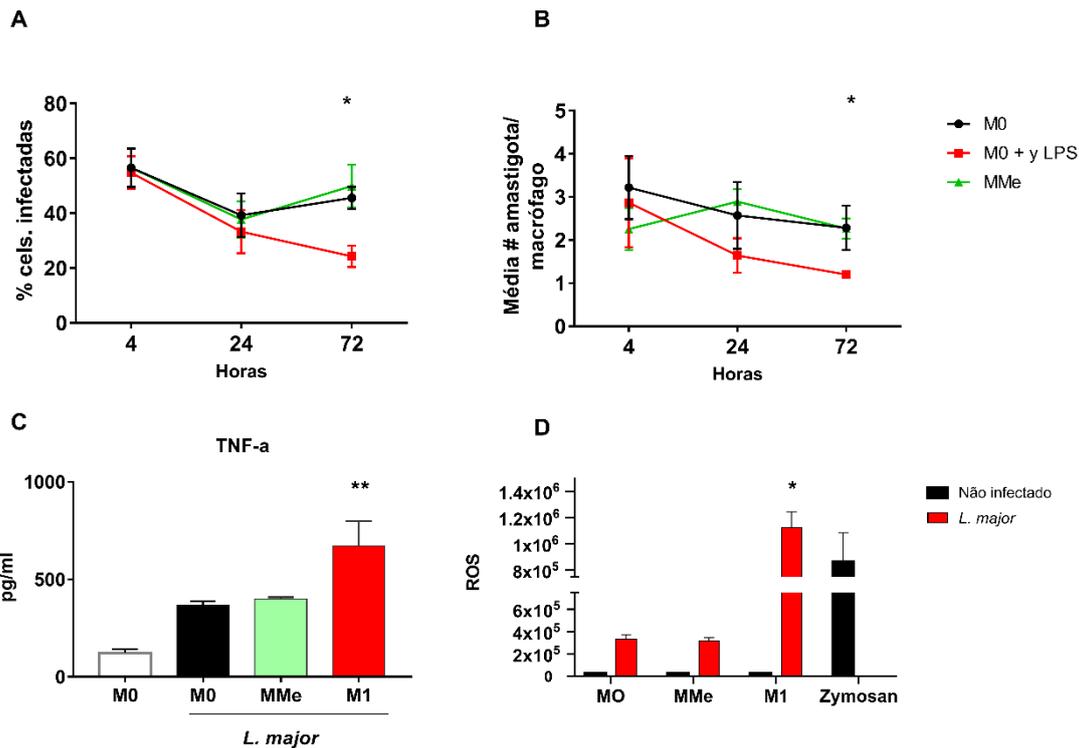


Figura 3: Macrófagos derivados da medula óssea e estimulados com glicose, palmitato e insulina possuem menor resposta inflamatória do que macrófagos M1 na infecção por *L. major*

Os macrófagos derivados da medula óssea foram plaqueados sobre lamínula de vidro na concentração de 2×10^5 e estimulados *in vitro*: M0 – macrófagos sem estímulo; MMe – macrófagos estimulados com glicose (30mM), palmitato (0.4mM) e insulina (10nM); e M1 – macrófagos estimulados com LPS (50U/mL) e IFN-gama (100ng/ml) foram infectados *in vitro* com 1:5 *L. major* metacíclicas por 4, 24 e 72 horas para avaliação da infecção por microscopia ótica após coloração rápida com Panótico. (A) Porcentagem de células infectadas; (B) Número médio de amastigotas por macrófago infectado; (C) Concentração de TNF-alfa medidas no sobrenadante da cultura após 24h de infecção por ELISA. (D) Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos estimulados, determinada pela área sob a curva após adição de luminol. Análise estatística feita pelo teste One way ANOVA seguido de Turkey ou teste t de Student não pareado (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ entre os grupos experimentais)

Em seguida, comparamos o fenótipo de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos controle e com obesidade estimulados com M-CSF e classificados como M0 (sem estímulo), M1 (IFN-gama e LPS) ou M2 (estimuladas com IL-4) e infectados com *L. major*. Ao avaliar os parâmetros de infecção como, a média de amastigotas por célula, a porcentagem de células infectadas e índice de infecção, observamos que o parasito se replica de forma semelhante nos macrófagos sem estímulo de ambos os grupos (Fig. 4A). Mais que isso, nos macrófagos M1 derivados

de camundongos com obesidade, a infecção induziu uma porcentagem aproximadamente duas vezes maior de células infectadas 24 e 72 horas após a infecção quando comparada ao M1 do grupo controle (Fig. 4B). Essas células também foram menos eficientes para eliminar as *L. major*, como demonstrado pelo aumento do número médio de parasitos por célula infectada e pelo maior índice de infecção após 24 e 72 horas (Fig. 4B). Ao analisar M2 derivados de camundongos com obesidade, foi observado porcentagem similar de células infectadas nos três tempos, porém, apresentaram mais parasitos por macrófago após 72 horas de infecção (Fig. 4C).

O fenótipo de menor eficiência para a eliminação das leishmanias em M1 de camundongos com obesidade coincide com uma redução da produção de óxido nítrico (Fig. 5A) e menor produção de TNF-alfa (Fig. 5B), moléculas que são essenciais para o controle da proliferação de *L. major*, isso comparado aos M1 dos camundongos saudáveis. Ademais, avaliamos a atividade da arginase nos macrófagos. Mesmo sem a infecção, a estimulação por IL-4 foi suficiente para aumentar a atividade da arginase nos macrófagos de camundongos com obesidade (Fig. 5C). Quando infectados e sob os estímulos avaliados (M1, M2), os macrófagos derivados de camundongos com obesidade tiveram maior atividade da arginase quando comparados com seus respectivos controles (Fig. 5C). Finalmente, não observamos diferenças na produção de IL-10 quando avaliamos o sobrenadante da cultura 48 horas após a infecção (Figura 5D).

Em conclusão, esses dados indicam que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com obesidade apresentam um perfil inflamatório insuficiente para controlar a infecção por *L. major* em modelo de infecção *in vitro*. O aumento na atividade da arginase e a redução da produção de óxido nítrico e TNF-alfa são congruentes com a maior sobrevivência do parasito em macrófagos de animais com obesidade.

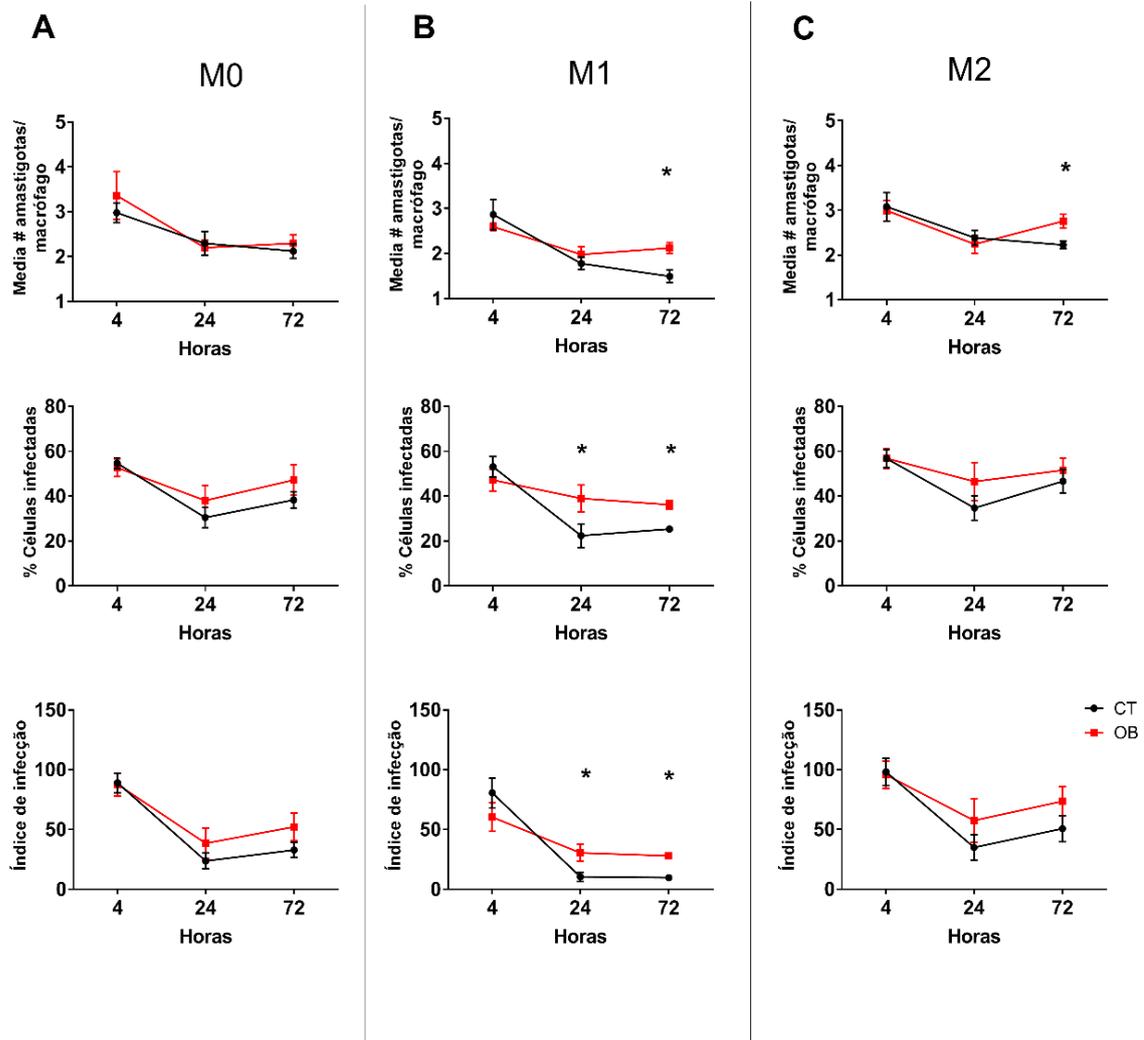


Figura 4: Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos com obesidade sob diferentes estímulos são mais suscetíveis à infecção por *L. major*

Os macrófagos derivados da medula óssea de animais do grupo controle (CT) e com obesidade (OB) foram cultivados na concentração de 2×10^5 e incubados com *L. major* (1:5) sobre lamínula de vidro por 4, 24 e 72 horas para avaliação da média de amastigotas por macrófago infectado, média de células infectadas e índice de infecção por microscopia ótica após coleta das lamínulas e coloração rápida com Panótico. (A) M0: Macrófagos sem estímulo; (B) M1: macrófagos estimulados com LPS (100ng/mL) e IFN-gama (10ng/ml); (C) M2: macrófagos estimulados com IL-4 (10ng/ml). Resultados de dois experimentos independentes. N = 3 camundongos por tempo experimental/por experimento. Dados representados por média \pm SEM. * $p < 0,05$; Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre controle e com obesidade em cada tempo de infecção.

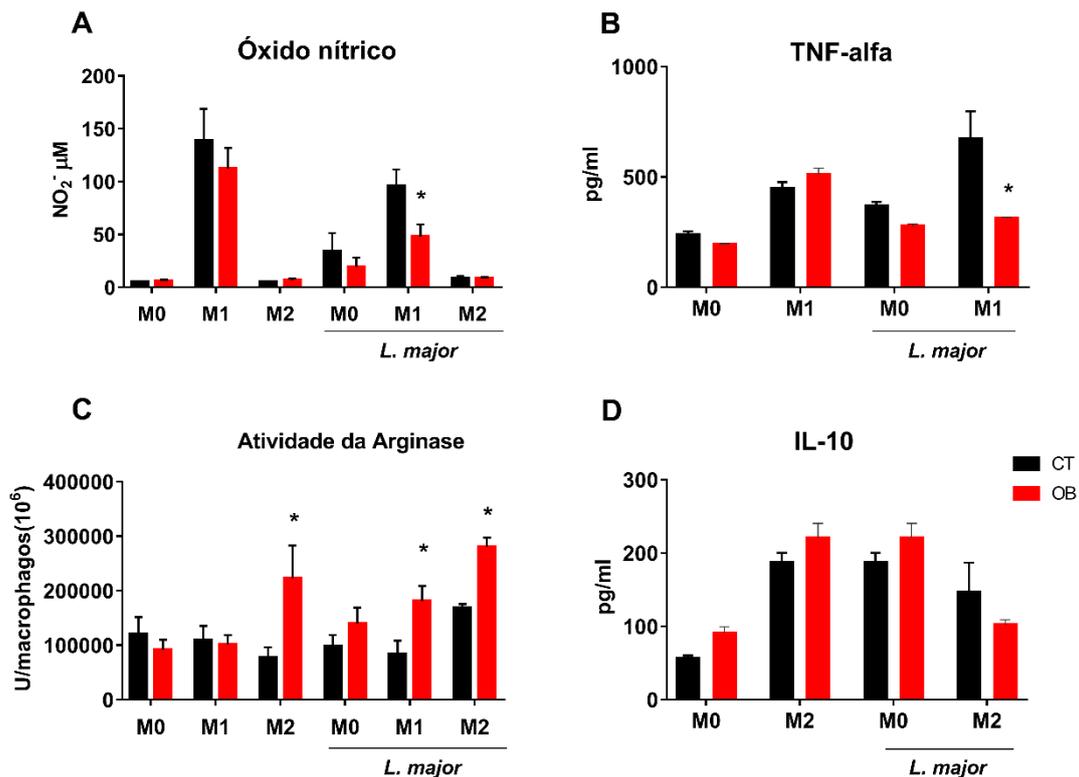


Figura 5: Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com obesidade apresentam falha na ativação clássica M1 e possuem maior atividade da arginase sob diferentes estímulos

Os macrófagos derivados da medula óssea de animais do grupo controle (CT) e com obesidade (OB) foram cultivados na concentração de 1×10^6 e incubados com *L. major* (1:5) (A) Produção de nitrito no sobrenadante das culturas de macrófagos após 24h estimulados ou não com IFN- γ e LPS e IL-4, na presença ou não de *L. major* pelo método de Griess. (B) Concentração de TNF-alfa, medidas no sobrenadante da cultura após 24h de infecção por ELISA. (C) Avaliação da atividade da arginase em macrófagos estimulados com IFN- γ e LPS e IL-4 infectados ou não com *L. major*. (D) Concentração de IL-10, medida no sobrenadante da cultura após 48h de infecção por ELISA. Resultados representam a média de 3 experimentos independentes ($n=3-5$). Dados representados pela média \pm SEM. * $p < 0,05$. Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre os grupos CT x OB em cada estímulo.

4.2 A obesidade prejudica a resistência de C57BL/6 contra a infecção por *L. major*

Com intuito de aprofundar sobre o papel das células da imunidade inata na interlocução da obesidade com a infecção por *L. major*, induzimos a obesidade com dieta. Os camundongos C57BL/6 foram alimentados com uma dieta rica em gordura

e açúcar (HSB), hipercalórica, ou dieta controle (AIN93G), isocalórica, durante 12 semanas.

Ao final deste período, os animais alimentados pela dieta HSB apresentaram diversas características da obesidade, dentre elas: ganho de peso significativo (Fig. 6A), elevação do índice de adiposidade (Fig. 6B), níveis elevados de glicemia em jejum (Fig. 6C) e menor tolerância à glicose (Fig. 6D).

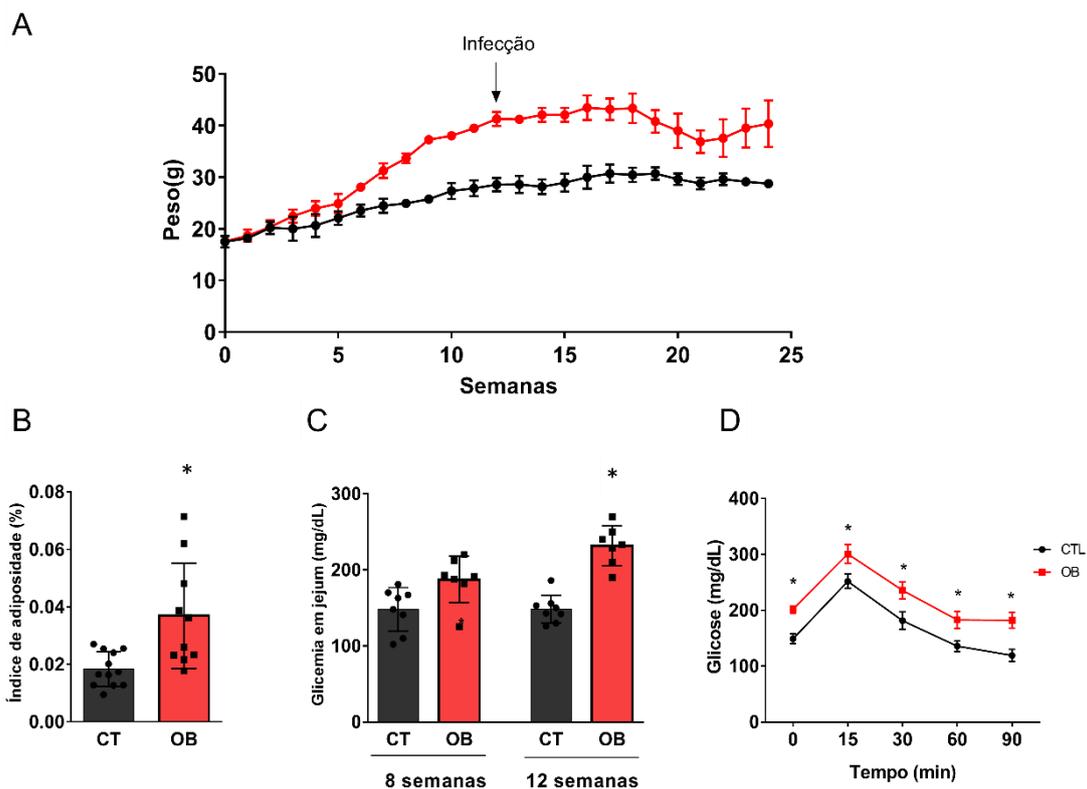


Figura 6: O consumo de dieta hipercalórica alterou o peso corporal e o metabolismo da glicose em camundongos com obesidade induzida por dieta

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12ª semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas. (A) Média do peso dos camundongos alimentados com as dietas AIN93G e HSB ao longo de 25 semanas; (B) Índice de adiposidade expresso pela soma do peso dos tecidos adiposo epididimal, inguinal e mesentérico dividido pelo peso corporal após 25 semanas de experimento; (C) Glicemia de jejum; (D) Teste de tolerância oral a glicose após 12 semanas do consumo de dieta. Resultados da junção de 2 experimentos (n = 3-5). *p < 0,05. As barras representam os valores (média e EPM) Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre os grupos CT x OB.

Após 12 semanas em dieta, os camundongos foram infectados por via intradérmica na orelha com uma dose média de promastigotas metacíclicas de *L. major* (2×10^5) e o curso da infecção foi acompanhado por até no máximo 14 semanas. Enquanto as lesões em camundongos controles atingem um pico por volta da quinta ou sexta semana após a infecção, e se recuperam naturalmente ao longo do tempo, os camundongos com obesidade apresentam uma lesão progressivamente crescente que eventualmente úlcera, além de piorar consideravelmente após 8 semanas de infecção. Quando se avalia o diâmetro da lesão (Fig. 7A), a espessura (Fig. 7B) e o escore patológico (Fig. 7C), o qual pontua para ulcerações e dano tecidual, fica evidente que o animal com obesidade possui um pior prognóstico. Vale ressaltar que, em alguns casos, ocorre a destruição completa do tecido auricular e disseminação do parasito para o baço (dados não mostrados). Também acompanhamos a carga parasitária ao longo das semanas, e como esperado, os camundongos controle apresentam a redução da lesão concomitante à redução da carga parasitária. Por outro lado, os animais com obesidade não conseguiram controlar o parasitismo na orelha após 8 semanas de infecção (Fig. 7D).

De maneira interessante, após 8 semanas de infecção, o tamanho da lesão se correlaciona positivamente com o peso do animal (Fig. 8A) e com os níveis de glicemia de jejum (Fig. 8B).

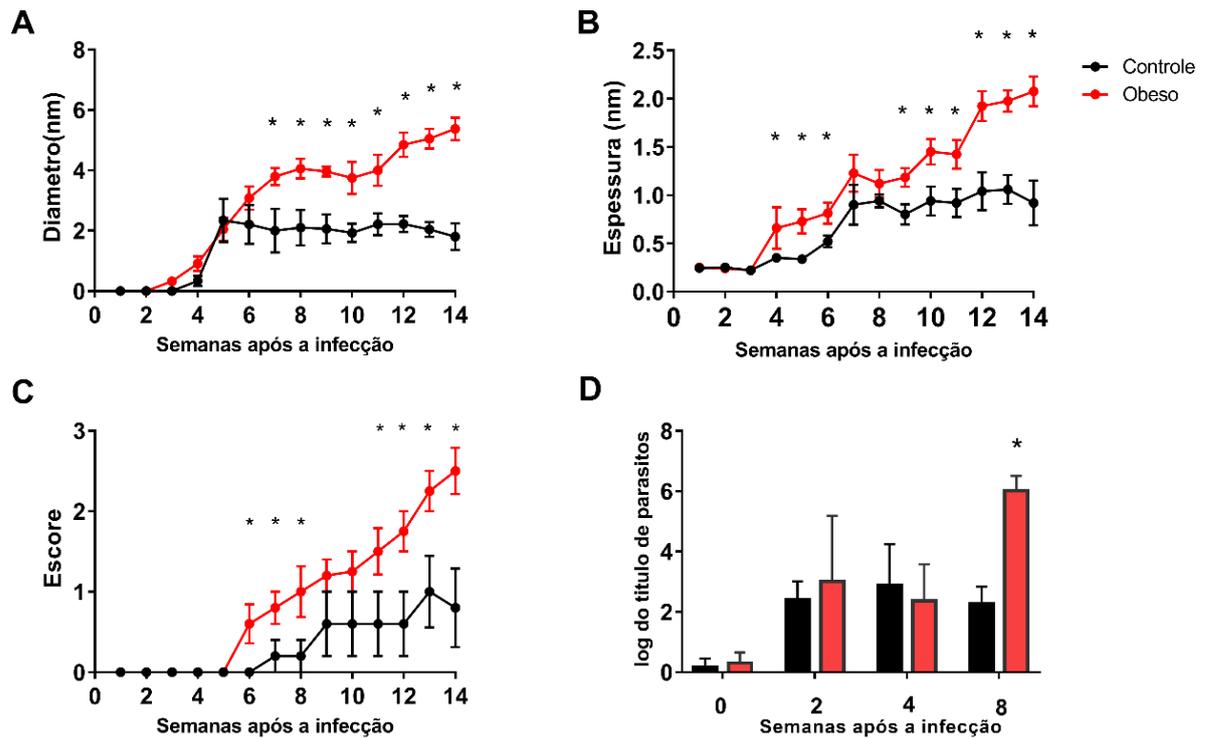


Figura 7: Camundongos com obesidade apresentam maior lesão e maior carga parasitária quando infectados com *L. major*

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas. (A e B) Desenvolvimento da lesão: (A) Diâmetro, (B) Espessura e (C) Escore patológico (0 = sem ulceração, 1 = com úlcera, 2 = dano tecidual leve, 3 = dano tecidual acentuado) Os camundongos infectados foram acompanhados durante 14 semanas de infecção. (D) carga de parasitos nas orelhas de camundongos, 2 dias, 2, 4 e 8 semanas após a infecção. Valores estão representados por média \pm desvio padrão (n = 5). (*) $p < 0,05$ Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre os grupos CT x OB em cada tempo.

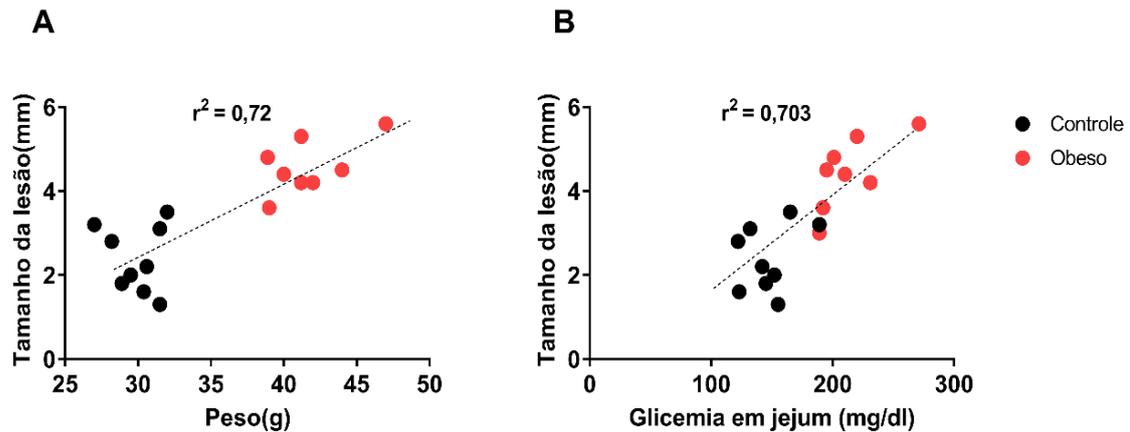


Figura 8: O tamanho da lesão tem correlação positiva com peso e a com glicemia de jejum. Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 12ª semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas. Ao final de 8 semanas de infecção o peso e glicemia foram medidos e correlacionados com o tamanho da lesão em Milímetros. (A) Correlação de Pearson entre o peso e o tamanho da lesão após 8 semanas de infecção; (B) Correlação de Pearson entre a glicemia e o tamanho da lesão após 8 semanas de infecção; $p < 0,05$

4.3 Caracterização das populações de células da imunidade inata da pele da orelha em camundongos C57BL/6 controle e com obesidade

Conforme descrito anteriormente (Tamoutounour *et al.*, 2013), no estado de homeostasia, camundongos C57BL/6 apresentam uma variedade de células da imunidade inatas na pele da orelha que podem ser categorizadas com base em sua origem celular. Essas populações foram definidas usando marcadores como CD11b, CD64, Ly6C e MHCII, os quais são utilizados para distinguir as células derivadas de progenitores da medula óssea de populações residentes de macrófagos e de células dendríticas. Estudos posteriores acrescentaram outros marcadores celulares, como o receptor de manose na caracterização desses subtipos celulares na derme em homeostasia (Barreiro *et al.*, 2016) e em modelo de infecção por *L. major* (Lee *et al.*, 2018).

Para identificar as células da imunidade inata que podem atuar ao longo do curso de infecção por *L. major*, primeiro estabelecemos as populações da pele nos animais controle e com obesidade sem a infecção. Em nosso estudo, selecionamos as células vivas por tamanho e granulosidade, e presença de CD11b. Posteriormente,

após exclusão de neutrófilos (Ly6G⁺), as células foram analisadas com base na expressão dos receptores Ly6C e CD206 (Fig. 9). Conforme detalhado por Lee e colaboradores, encontramos as mesmas similares 4 populações na derme (P1–P4). Tais populações se distinguem por diferentes variações da expressão dos receptores Ly6C e CD206 e são elas: monócitos inflamatórios Ly6C^{hi} (P1), células dendríticas derivadas da medula óssea CD206⁺Ly6C^{int-low} (P2), células dendríticas residentes CD206⁻Ly6C⁻ (P3) e macrófagos residentes CD206⁺Ly6C^{int} (P4).

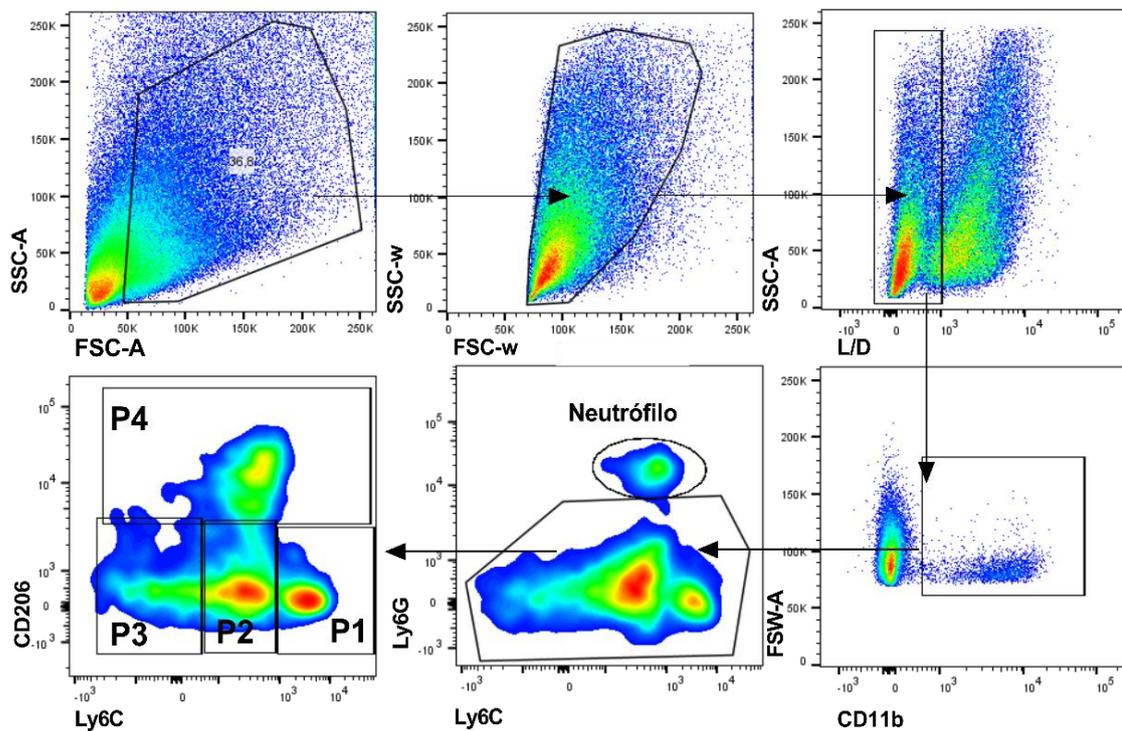


Figura 9: Estratégia de análise utilizada para caracterizar das células da imunidade inata da orelha

Estratégia de análise utilizada para caracterizar as células da pele da orelha de camundongos C57BL/6 previamente marcadas e submetidas à técnica de citometria de fluxo. As células foram separadas com base no tamanho e granulosidade e por viabilidade, e posteriormente por CD11b⁺Ly6G⁻. Posteriormente foram analisadas quanto à expressão de Ly6C e CD206 e posteriormente subdivididas em Ly6C^{hi}CD206⁻ (P1), Ly6C^{int}CD206⁻ (P2), Ly6C^{int}CD206⁻ (P3) e Ly6C^{int}CD206⁺(P4)

Sem a infecção, as frequências de neutrófilos e P1-P4 na pele da orelha foram semelhantes nos grupos controle e com indução de obesidade. Especificamente, em relação aos macrófagos residentes suas frequências variam de 25-40% (Fig. 10).

Além disso, as células apresentam expressão semelhante de MHCII, CD36 e Arginase (dados não mostrados).

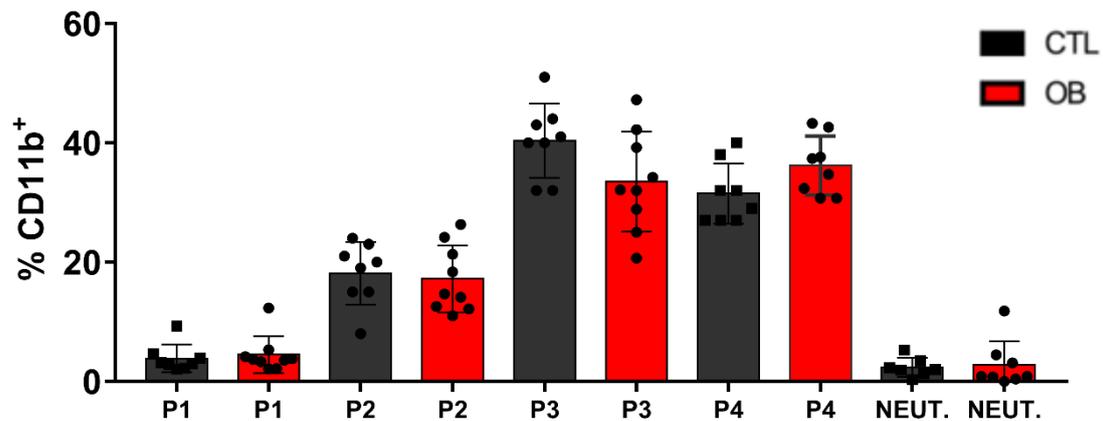


Figura 10: Análise das frequências das populações de células da imunidade inata da orelha de camundongos controle e com obesidade

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Ao final deste período as populações de células inatas da orelha foram avaliadas por citometria de fluxo. Frequências das subpopulações de células mielóides (P1 – P4 e neutrófilos) na orelha de animais controles e com obesidade. N = 3-5 camundongos. Resultados da combinação de 3 experimentos independentes. Dados representados pela média \pm EPM. Análise estatística feita pelo teste One way ANOVA seguido de Turkey

Como demonstrado por Lee et. al, dentre as populações P1-P4, apenas os macrófagos residentes possuem expressão significativa do receptor de manose (Fig. 11A). A população P4 também é a única que expressa altos níveis de outros marcadores característicos de células com perfil anti-inflamatório como o CD36, receptor tipo *scavenger*, que atua na absorção de ácidos graxos de cadeia longa, e Arginase1 (Fig. 11B e 11C). Além disso, os macrófagos residentes da pele têm origem predominantemente embrionária (Hoeffel *et al.*, 2012), o que indica que tais células possuem capacidade limitada de renovação. Consistentemente, quando avaliados a frequência de células positivas para KI67, a população P4 foi a que apresentou menores taxas de renovação celular quando comparados às populações P1-P3, indicando sua baixa capacidade proliferativa (Fig. 11D).

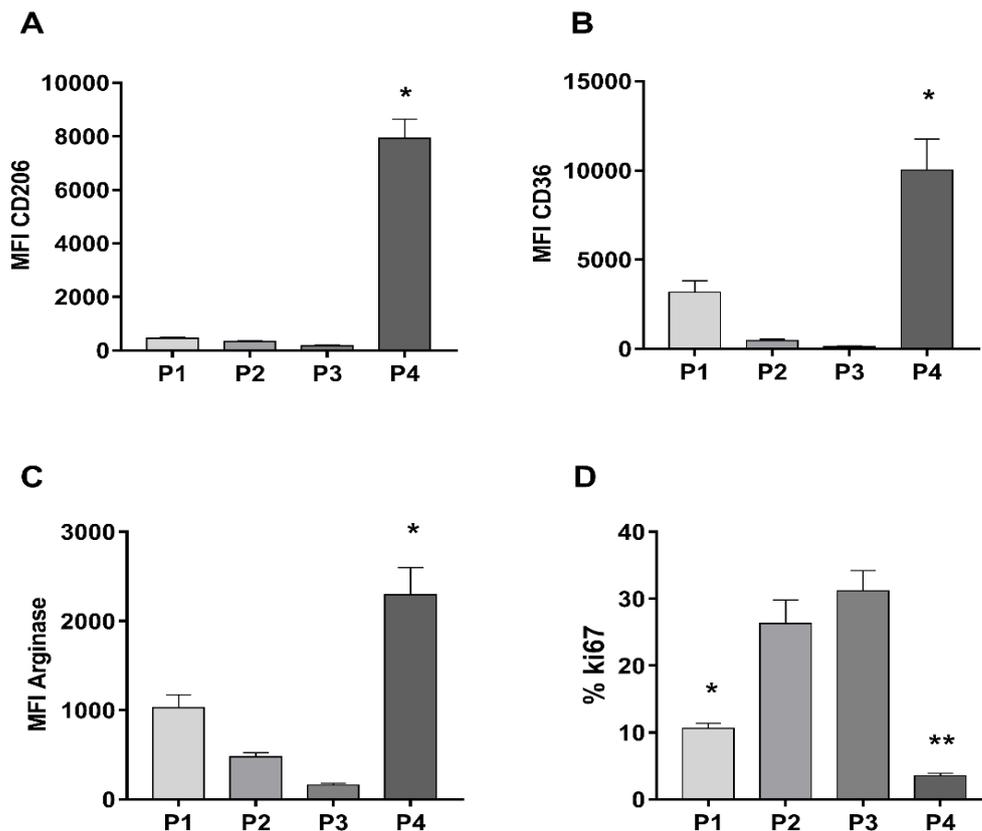


Figura 11: Características dos macrófagos residentes na pele da orelha

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Ao final deste período as populações de células inatas da orelha foram avaliadas por citometria de fluxo. Índice médio de fluorescência (MFI) para expressão de: (A) CD206; (B) CD36; (C) Arginase nas populações indicadas da orelha (P1-P4); (D) Expressão de ki67 nas populações analisadas. N = 3-5 camundongos. Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Dados representados pela média \pm SEM. Análise estatística realizada por One-way ANOVA com pós-teste de Turkey *p < 0,05.

Além disso, macrófagos residentes perivasculares marcados pela expressão de CD206 possuem o papel de sensores do microambiente na pele (Barreiro *et al.*, 2016) e no tecido adiposo (Silva *et al.*, 2019), sendo células especialistas na absorção de macromoléculas do sangue. Também confirmamos a alta capacidade endocítica dos macrófagos residentes na pele e do baço, pois após 30 minutos da injeção intravenosa de FITC-Dextran, apenas a população P4 absorveu rapidamente e de maneira consistente o polímero (Fig. 12A). Interessantemente, macrófagos CD206⁺ do baço de camundongos obesos tiveram sua capacidade endocítica prejudicada (Fig.

12B), enquanto macrófagos da orelha de ambos os grupos absorveram o FITC-Dextran de maneira similar e rapidamente (Fig. 12C).

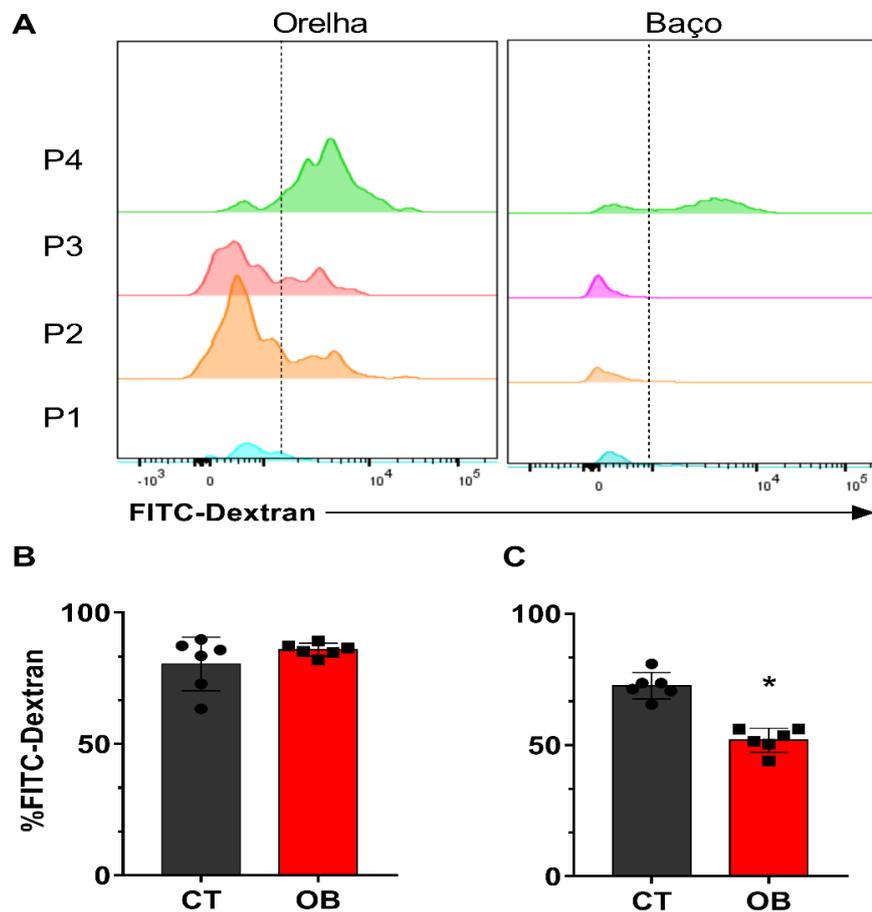


Figura 12: Capacidade endocítica de células da pele da orelha e do baço

Os camundongos foram injetados com FITC-DEXTRAN (18mg/kg) via intravenosa e, após 30 min da injeção, anestesiados e perfundidos. A atividade endocítica foi avaliada por citometria de fluxo, para medir a fluorescência do FITC. (A) Medida da capacidade endocítica de P1-P4 na orelha e baço de camundongos controle (CT) e com obesidade (OB); (B) % de células com FITC-Dextran em P4 na orelha; (C) % de células com FITC-Dextran em P4 no baço. N= 6 camundongos/grupo. Dados representados pela média \pm SEM; * $p < 0,05$; A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student não pareado

4.4 A Obesidade altera a frequência de macrófagos residentes na orelha durante o curso da infecção por *L. major*

Após a caracterização das células fora do contexto da infecção, partimos para avaliar cinética da frequência das células P1-P4 e de neutrófilos, da fase inicial da (2 dias) até a fase crônica da infecção por *L. major* (8 semanas).

Primeiramente, verificamos que após a infecção o número de células CD11b⁺ na orelha aumentou em ambos os grupos com o passar do tempo, porém, na 4^a e 8^a semanas de infecção, camundongos com obesidade apresentaram maior número de células CD11b infiltrando o local da lesão (Fig. 13A). O aumento de células na orelha ocorreu, mesmo considerando número e frequência similar de monócitos circulantes no sangue (Fig. 13B, C e D).

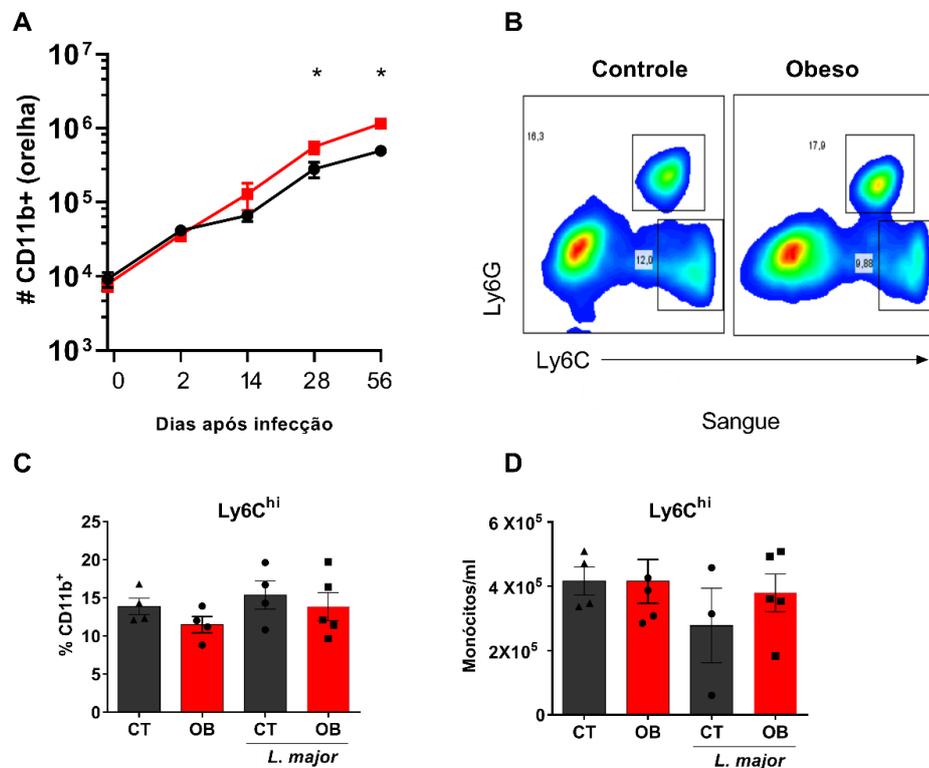


Figura 13: O Aumento de células CD11b⁺ na orelha de camundongos com obesidade ao longo do curso de infecção, ocorre sem aumento nos monócitos circulantes

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB e infectados por 8 semanas com 2×10^5 *L. major* promastigotas. (A) Número absoluto de células CD11b⁺ na orelha infectada 2, 14, 28, 56 dias após a infecção. (B) Dot plots representativos das análises de monócito no sangue; (C) frequência monócitos (Ly6C^{hi}); (D) número absoluto de monócitos (Ly6C^{hi}); n = 3-5 camundongos, Resultados representativos de 2 experimentos independentes; Dados são a média \pm SEM; *p < 0,05; análise estatística utilizada: (A) teste t de Student não pareado; (B e C) One-way ANOVA com pós teste de Turkey

Posteriormente, verificamos a frequência de diferentes células da imunidade inata na orelha infectada dos camundongos. Como averiguado anteriormente (Tamoutounour *et al.*, 2013), a derme apresenta uma população de monócitos (P1), que alimenta as necessidades do órgão, se diferenciando em DCs ou macrófagos de acordo com os estímulos do ambiente. No contexto da infecção, observamos que essa população aumenta consideravelmente após 2 dias do inóculo, resultado de intensa migração em ambos os grupos, constituindo junto aos neutrófilos as células mais frequentes neste tempo agudo de infecção. Ao longo do curso da doença, a frequência de P1 se mantém basal e semelhante em ambos os grupos, com exceção na 8ª semana, na qual identificamos que camundongos do grupo controle apresentaram maior frequência dessas células em comparação ao grupo obeso (Fig. 14 e Fig. 16B)

Após 14 dias de infecção, verificamos que em ambos os grupos houve um aumento de células dendríticas (P2), o qual coincide com o início da resposta imune adaptativa. Nesse tempo, detectamos maior frequência de P2 em animais com obesidade em relação aos animais controle (Fig. 14). Após esse período, a frequência de DCs nos camundongos controle aumentou ligeiramente até a 8ª semana de infecção, enquanto observamos uma tendência oposta nos camundongos com obesidade. A redução das DCs coincidiu com a expansão concomitante de P4 em camundongos com obesidade (Fig. 14, Fig. 16C e 16E). Curiosamente, esse aumento no número e frequência de macrófagos residentes ocorreu apenas na 8ª semana de infecção, tempo em que observamos uma lesão mais ulcerada e maior carga parasitária. Por fim, em relação a P3, a frequência das células foi similar em ambos os grupos em todos os tempos analisados.

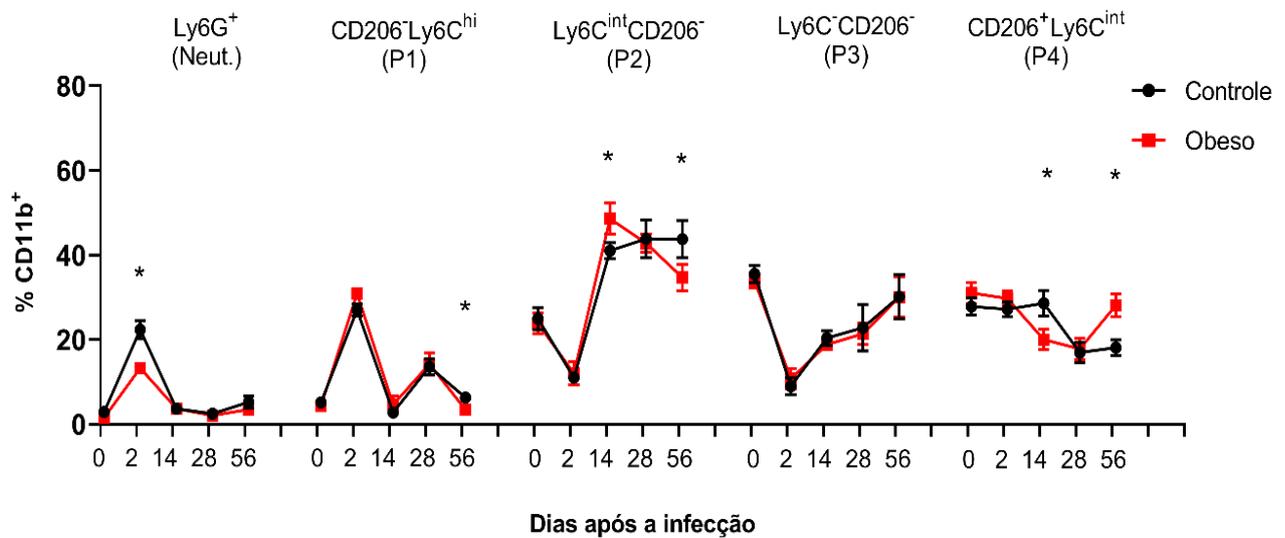


Figura 14: Análise da cinética de populações das células da imunidade inata na infecção por *L. major*

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou HSB e infectados com 2×10^5 *L. major*. A frequência das células foi avaliada 2, 14, 28 e 56 dias após a infecção. As populações foram avaliadas no gate CD11b⁺ vivas. Populações: Ly6G⁺ (Neutrófilos) Ly6C^{hi}CD206⁻ (P1), Ly6C^{int}CD206⁻ (P2), Ly6C^{int}CD206⁻ (P3) e Ly6C^{int}CD206⁺ (P4); n = 3-5 camundongos, Resultados representativos de 2-3 experimentos independentes. Dados representados pela média \pm SEM; *p < 0,05 identificado por teste t de Student comparando o grupo controle e com obesidade nos diferentes tempos de infecção.

Após 2 dias após a infecção, verificamos que camundongos com obesidade apresentaram aproximadamente duas vezes menos neutrófilos quando comparados ao grupo controle (Fig. 15A e 15B). Isso nos chamou atenção e então tentamos identificar se os neutrófilos estavam morrendo no local do inóculo. Para isso, a população de neutrófilos apoptóticos foi analisada com base na coloração com anexina V, e observamos taxa similar de apoptose em ambos os grupos (Fig. 15C). Posteriormente, confirmamos por microscopia intravital realizada em camundongos LYSM-GFP, que a redução em neutrófilos nos animais com obesidade já é verificada mesmo 4 horas após a infecção, ao notar que neste tempo podemos observar células LysM⁺ infiltrando a orelha no grupo controle, enquanto as células do animal obeso tem migração atrasada (Fig. 15D). Após a esperada onda inicial de neutrófilos que acomete a orelha, ainda é possível encontrar neutrófilos em ambos os grupos, porém em menor proporção.

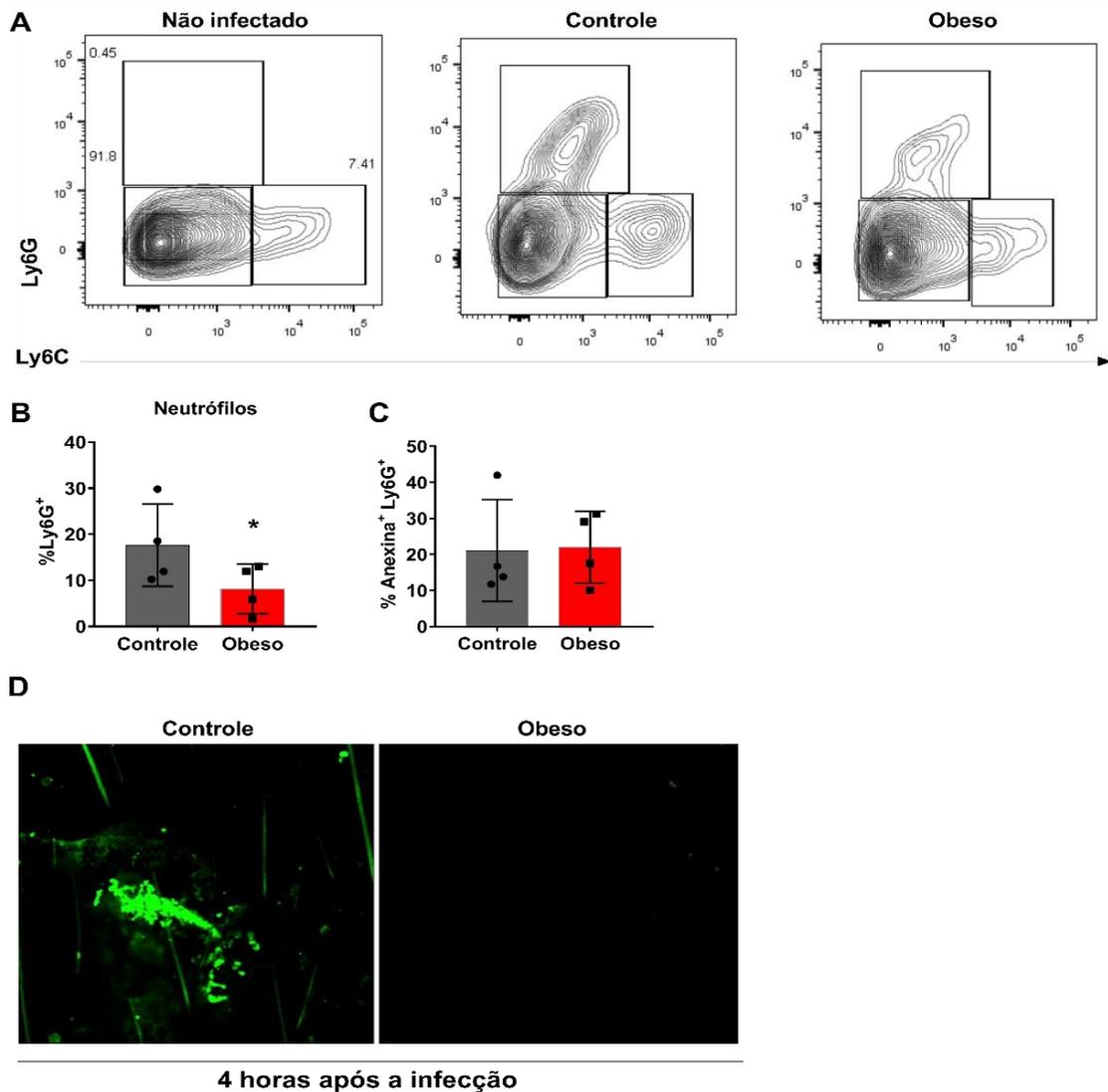


Figura 15: A obesidade reduz a chegada dos neutrófilos na lesão no 2º dia de infecção
 Camundongos C57BL/6 LysM-GFP foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou HSB e infectados com 2×10^5 *L. major*, e eutanasiados 2 dias após a infecção. (A) Dot plots representativos das análises de neutrófilos (CD11b+) na orelha de animais não infectados, controle (CT) e com obesidade (OB). (B) Histograma da frequência de Ly6G⁺. (C) Frequência de células LY6G⁺Anexina⁺. (D) Imagem da IVM da orelha de camundongos LysM-GFP infectados após 4 horas de infecção; n = 4; Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Dados são a média \pm SEM; *p < 0,05; análise estatística utilizada teste t de Student não pareado.

4.5 Macrófagos residentes em camundongos com obesidade aumentam independentemente da proliferação local e os parasitos persistem nas células

O aumento de macrófagos residentes em camundongos com obesidade após 8 semanas de infecção chamou a atenção por provavelmente sinalizar um subtipo de célula incompatível com a eliminação do parasito. Ao analisar este tempo de infecção com mais detalhes podemos constatar que o aumento de macrófagos CD206⁺, ocorre em relação aos monócitos e às células dendríticas (Fig. 16A) na pele, e isso pode prejudicar na eliminação do parasito. Com relação às demais populações, foi verificado que em camundongos com obesidade houve redução em P1 (Fig. 16B) e em P2 (Fig. 16C) quando comparados aos animais controle. No mais, não houve diferença entre os grupos para P3 (Fig. 16D) e como já mencionado o aumento de P4 nos animais com obesidade (Fig. 16E). Também observamos maior proporção de macrófagos CD206⁺ em relação a células pró-inflamatórias CD11c⁺ em camundongos com obesidade na 8^a semana de infecção, isso demonstrado pela razão CD11b⁺CD206⁺/CD11b⁺CD11c⁺ (Fig. 16F).

O aumento da população P4 ocorreu independentemente do aumento da taxa de proliferação celular, avaliada pela expressão do fator de transcrição KI67 em CD11b⁺ (Fig. 16G) e em células CD11b⁺CD206⁺ (Fig. 16H). Portanto, sugere-se que o aumento de macrófagos residentes na lesão nos animais com obesidade, é proveniente de monócitos da circulação e não por proliferação local.

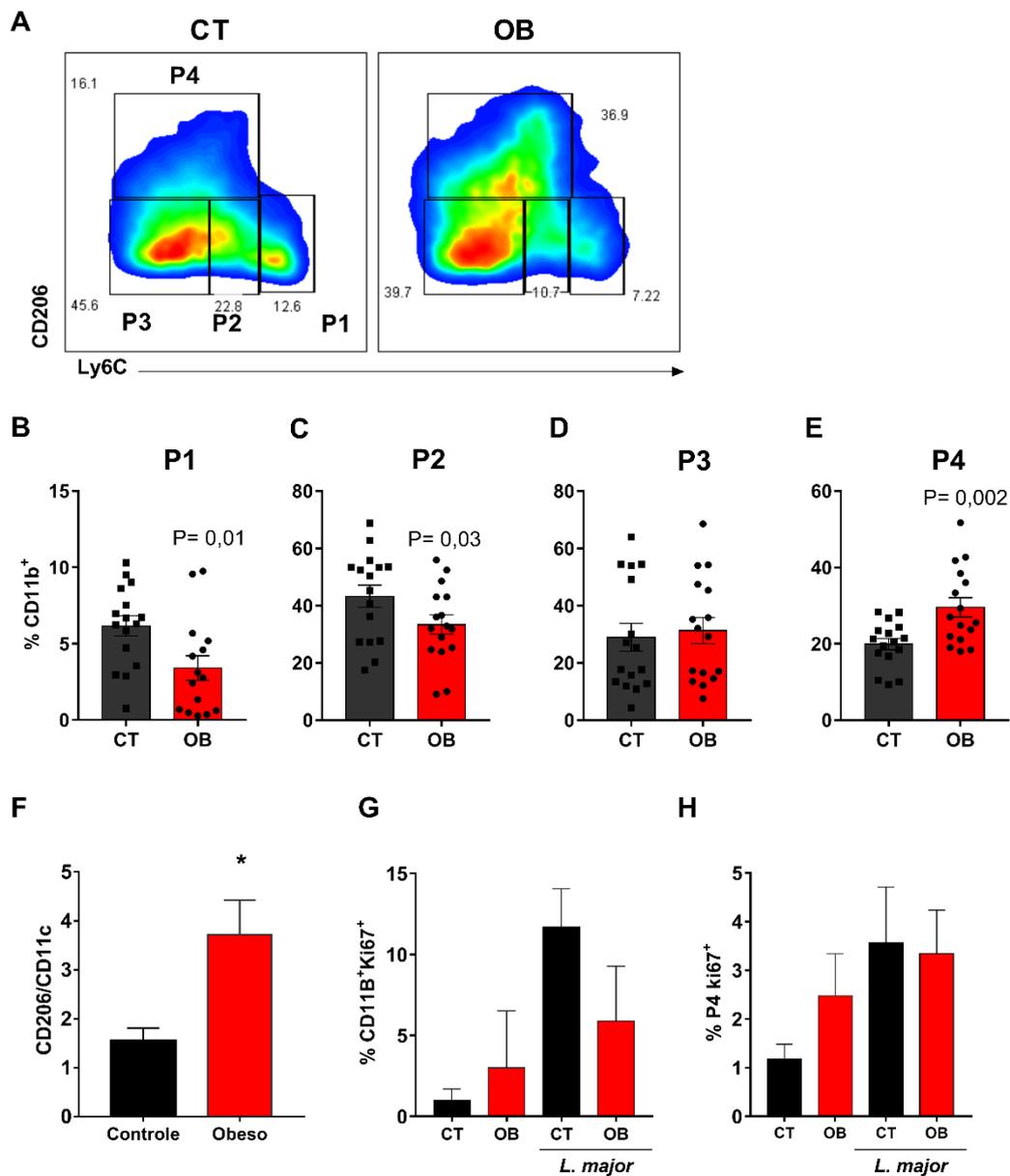


Figura 16: Macrófagos residentes aumentam na orelha de animais em relação a monócitos, células dendríticas e células CD11c⁺

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou HSB e infectados com 2×10^5 *L. major*, e eutanasiados 8 semanas após a infecção

Dot plots representativos das células CD11B⁺ P1-P4 em animais controle e com obesidade infectados; (B) Frequência de P1; (C) Frequência de P2; (D) Frequência de P3; (E) Frequência de P4 em animais controle e com obesidade infectados (F) razão da expressão de células CD11B⁺CD206⁺/ CD11B⁺CD11c⁺ na orelha de animais infectados após 8 semanas; (G) Frequência de células CD11B⁺Ki67⁺ na orelha com ou sem infecção; (E) Frequência de células CD11B⁺CD206⁺Ki67⁺ na orelha com ou sem infecção; (B-E) Resultados são a junção de 4 experimentos independentes (n=3-5); (F-H) Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n = 3-5). Dados representados pela média \pm SEM. *p < 0,05 Análise estatística realizada pelo teste t de Student não pareado (B-F), e One-way ANOVA com pós teste de Turkey (G-H).

O papel dos macrófagos com origem embrionária como células fagocíticas já é bem descrito em diversos órgãos. Em um estudo das células do tecido adiposo, verificou-se que a capacidade endocítica dos macrófagos residentes é prejudicada durante a obesidade (Silva *et al.*, 2019). Já no modelo de infecção por *L. major*, avaliando os macrófagos residentes da pele, foi demonstrado que essas células mantem a capacidade fagocítica intacta ao longo do curso da infecção e quando comparadas a outros subtipos de células inatas são menos eficientes para matar os parasitos, mesmo sob constante estimulação Th1 (Lee *et al.*, 2018). Nesse sentido, utilizamos uma *L. major* geneticamente modificada para expressar a proteína RFP (*L. major*-RFP), com intuito de avaliar como cada subtipo celular fagocita o parasito e a sua respectiva capacidade leishmanicida.

Ao final de 8 semanas de infecção verificamos que, no grupo controle, as células P4 foram as mais infectadas, indicando a sua ineficiência em matar os parasitos. Já em relação aos camundongos com obesidade, provavelmente por apresentar maior carga parasitária, podemos observar diversas células (P1, P2, P4) com taxa de infecção relevante. De toda forma, os macrófagos residentes aparecem entre as células mais parasitadas nos dois grupos e não são capazes de matar de maneira eficiente o parasito (Fig. 17).

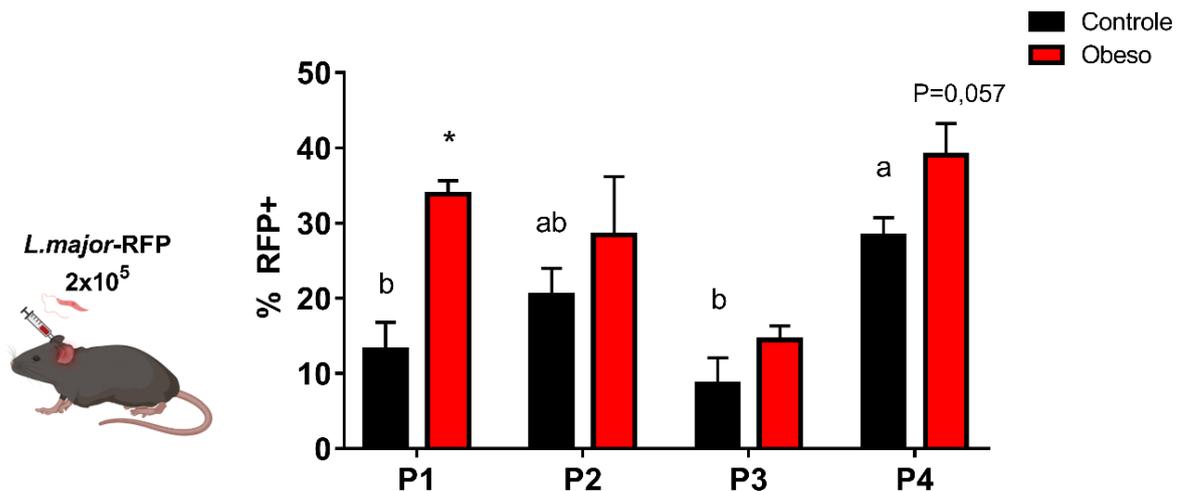


Figura 17: Macrófagos residentes são as células com mais parasitos no grupo controle e monócitos e macrófagos residentes de camundongos com obesidade permanecem parasitados na 8ª semana de infecção

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou HSB e infectados com 2×10^5 *L. major-RFP*, e eutanasiados 8 semanas após a infecção para medida da presença de leishmania nas populações celulares avaliadas. Frequência da expressão de RFP em P1, P2, P3 e P4 em camundongos controle e com obesidade infectados. Dados estão representados pela média \pm SEM. * $p < 0,05$; Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre grupos Controle e Obeso e pelo teste One-way ANOVA para comparar P1 x P2 x P3 x P4 em um mesmo grupo (a x b = $p < 0,05$)

4.6 A obesidade aumentou a frequência de macrófagos com a expressão de CD206 em diferentes órgãos nos camundongos C57BL/6

A obesidade induzida por dieta rica em carboidratos e lipídeos em camundongos C57BL/6 foi capaz de aumentar a frequência de diferentes subtipos de macrófagos residentes no tecido adiposo, marcados pela expressão do receptor de manose e MHC II (Silva *et al.*, 2019). Dessa forma, consideramos que a obesidade poderia impactar na população de células residentes, com fenótipo predominante de reparo tecidual não somente no tecido adiposo dos animais, mas também em outros órgãos.

Primeiramente, verificamos que no tecido adiposo dos animais com obesidade há, de fato, aumento considerado de células do sistema imune inato, e principalmente aumento na frequência de macrófagos CD206⁺ (Fig. 18A), corroborando os dados de Silva e colaboradores. Observamos também que houve aumento na frequência de

células CD206⁺ no baço (Fig. 18B) e no fígado (Fig. 18C) dos camundongos com obesidade.

Portanto, com exceção da pele, a obesidade por si só foi capaz de aumentar a frequência de macrófagos residentes em diversos órgãos.

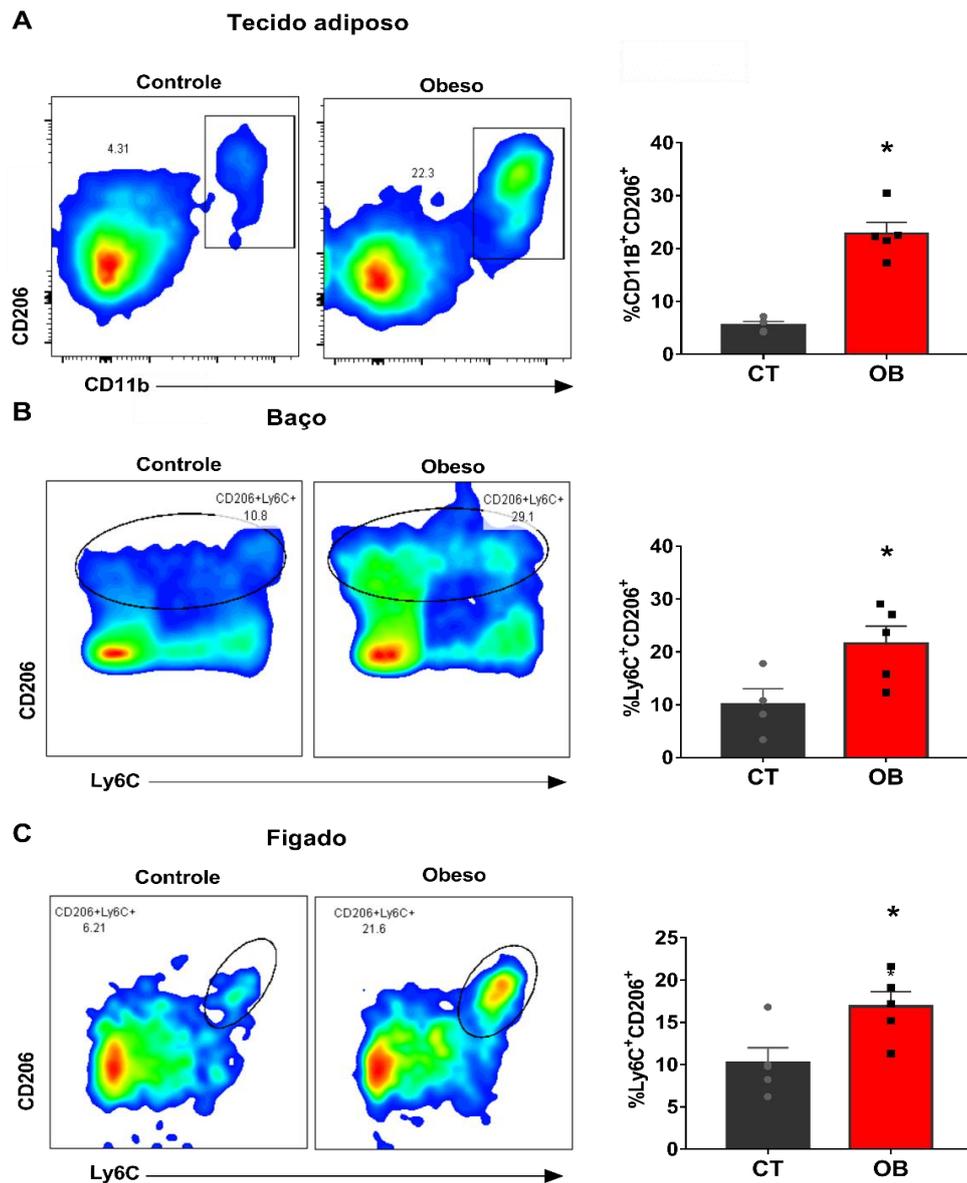


Figura 18: A obesidade aumenta a frequência de células CD11b⁺CD206⁺ em outros órgãos

Camundongos C57BL/6 foram alimentados por 12 semanas com dieta AIN93-G ou HSB e as do baço, tecido adiposo e fígado foram isoladas e marcadas após eutanásia. As células foram selecionadas com base SSC e FSC, os *doublets* foram excluídos empregando o isolamento de células por FSC-W e SSC-W. As células mortas foram também excluídas pelo *gating* das células marcadas com TM Fixable Aqua Stain Kit, L34957 LIVE/DEAD. (A) Dot plot representativo e histograma de células CD11b⁺CD206⁺ no tecido adiposo; (B) Dot plot representativo e histograma de células CD11b⁺Ly6C^{int/+}CD206⁺ no baço; (C) Dot plot representativo e histograma de células CD11b⁺Ly6C^{int/+}CD206⁺ no fígado; Análise estatística feita pelo teste t de Student não pareado entre grupos Controle e Obeso

4.7 Camundongos CCR2^{-/-} apresentam atraso na resolução da lesão e a obesidade potencializa os danos teciduais

Camundongos *knockout* para o receptor de quimiocina CCR2, apresentam redução no número de monócitos Ly6C⁺ circulantes. Além do mais, esse receptor medeia a migração dos monócitos para os tecidos após liberação de CCL2 por fibroblastos e leucócitos em contexto de infecções (Kurihara *et al.*, 1997; Serbina and Pamer, 2006). Neste caso, a maioria dos macrófagos dos animais CCR2^{-/-} são de origem embrionária. Logo, utilizamos este modelo para avaliar o papel dos macrófagos residentes em camundongos com obesidade na infecção por *L. major*.

Primeiramente, observamos que os animais CCR2^{-/-} apresentam um ganho de peso similar aos animais C57BL/6 quando submetidos a dieta hipercalórica (Fig. 19A). Ao infectar os animais, observamos que a lesão nos animais CCR2^{-/-} com obesidade se desenvolve mais rápido do que nos outros grupos (Fig. 19B). No entanto, a partir da sexta semana de infecção, onde já observamos o início da recuperação dos camundongos C57BL/6 controle, tanto a ausência do receptor CCR2, bem como a obesidade induzida por dieta são fatores que causam o aumento do tamanho da lesão e do escore patológico (Fig. 19B e C). Vale ressaltar que ao avaliar o escore patológico dos camundongos CCR2^{-/-} com obesidade, nota-se que esses animais tiveram lesões com mais úlceras e dano tecidual mais relevante, quando comparado aos animais da mesma linhagem que foram submetidos a dieta controle (Fig. 19C).

Portanto, a predominância por si só de macrófagos residentes na pele, independente da dieta, é fator chave para o agravamento da lesão. O aumento dessa população de células em camundongos C57BL/6 com obesidade indicam o papel importante deste subtipo de macrófago na quebra de resistência desses animais no modelo de infecção por *L. major*.

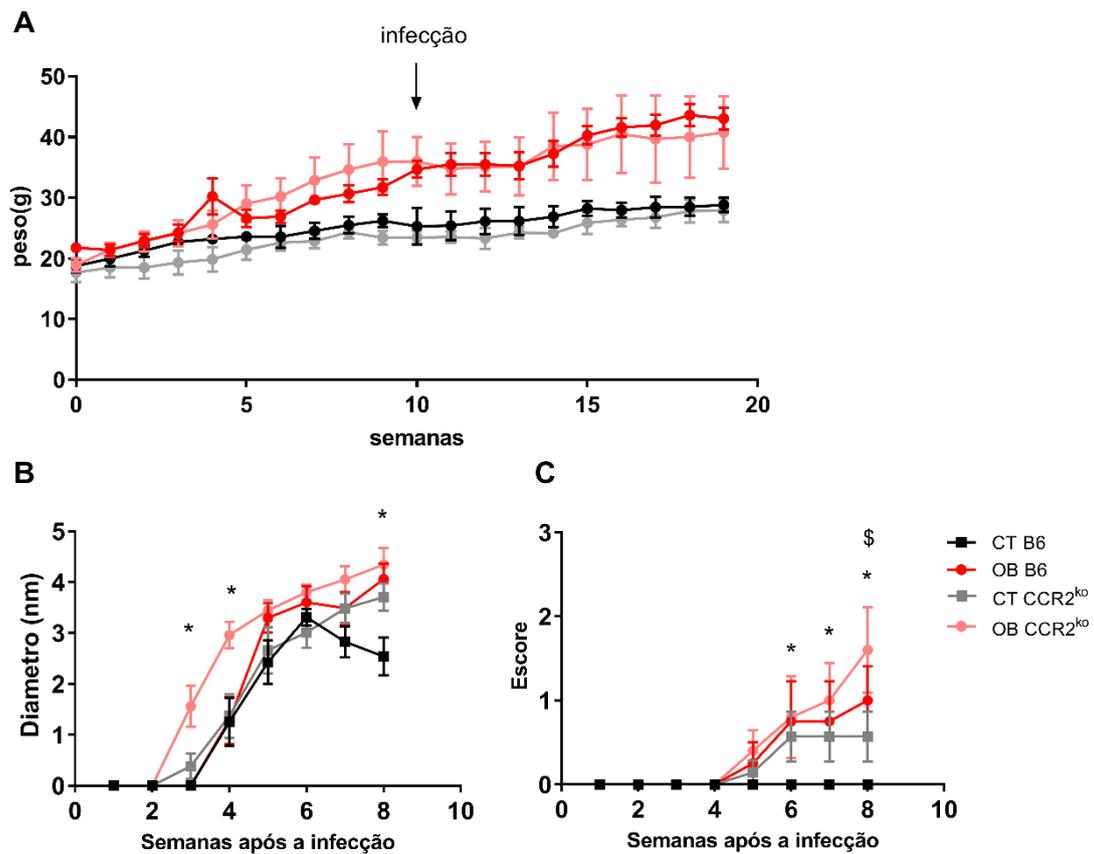


Figura 19: Camundongos CCR2^{-/-} apresentam atraso na resolução da lesão independente do consumo de dieta

Camundongos C57BL/6 ou CCR2^{-/-} foram alimentados por 20 semanas com dieta AIN93-G ou com dieta HSB. Na 10^a semana de dieta, os animais foram infectados na orelha com 2×10^5 *L. major* promastigotas metacíclicas. (A) Média do peso dos camundongos alimentados com as dietas AIN93G e HSB ao longo do tempo experimental; (B e C) Desenvolvimento da lesão: (B) Diâmetro, (C) Escore patológico (0 = sem ulceração, 1 = com úlcera, 2 = dano tecidual leve, 3 = dano tecidual acentuado); Dados estão representados pela média \pm SEM; n = 5-7 Análise estatística realizada pelo teste One-way ANOVA; *p < 0,05; \$ indica diferença estatística entre OB CCR2^{-/-} x CT CCR2^{-/-}

5. DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença multifatorial que afeta a taxa de mortalidade mundial por predispor o ser humano desde a doenças crônicas não transmissíveis a complicações em diversas infecções. Neste estudo, relatamos que a obesidade induzida por dieta rica em carboidrato simples e gordura também é capaz de induzir lesões mais severas e com maior carga parasitária em animais C57BL/6 infectados com *L. major*. Além disso, macrófagos derivados da medula óssea de camundongos com obesidade, sob diversos estímulos, apresentam uma resposta menos eficiente contra o parasito, exibindo menor produção de óxido nítrico e TNF-alfa, bem como maior atividade da arginase. Em modelo de infecção *in vivo*, ao final de 8 semanas de infecção os animais com obesidade apresentaram maior frequência de macrófagos residentes, em comparação a células inflamatórias. Por fim, mostramos em experimento com animais *CCR2^{-/-}*, que a predominância de macrófagos residentes no local lesão é fator preponderante para o atraso da resolução da lesão.

Normalmente as comorbidades relacionadas com a obesidade estão associadas a um estado sistêmico de inflamação crônica do indivíduo, caracterizada pelo desequilíbrio da produção de citocinas e pelo infiltrado de macrófagos no tecido adiposo (Hotamisligil, 2017). Em um cenário onde a inflamação é sistêmica, seria plausível especular que o excesso de peso seria vantajoso para ativar uma resposta imune eficiente contra a infecção por *L. major*. Pois, num ambiente inflamatório espera-se a diferenciação de mais células Th1 que são condizentes com a resistência à infecção por promover a produção de moléculas leishmanicidas como o TNF-alfa, ROS e óxido nítrico, principalmente por macrófagos (Sacks and Noben-Trauth, 2002; Hurdayal and Brombacher, 2017). No entanto, como na maioria das patologias associadas a obesidade, ocorre falha nos processos de resistência e de regulação da resposta imune (Wensveen *et al.*, 2015). Dentro da perspectiva de que a obesidade compromete a resposta imune em infecções, em trabalho prévio mostramos que camundongos C57BL/6 com obesidade são menos resistentes à infecção por *L. major*. Também verificamos que esses animais apresentaram maiores níveis de IL-17 nos sobrenadantes de cultura dos linfonodos drenantes e que os seus macrófagos foram mais suscetíveis em modelo de infecção *in vitro* (Martins *et al.*, 2020).

Já foi demonstrado que a ativação de macrófagos *in vitro* com metabólitos presentes na obesidade como, glicose, palmitato e insulina, ou com o meio de cultura

condicionado com tecido adiposo visceral de indivíduos com obesidade induz um perfil de inflamação intermediário quando comparado a macrófagos estimulados classicamente para M1 e M2 (Kratz *et al.*, 2014; Coats *et al.*, 2017). Os estímulos metabólicos promovem inflamação sem elicitar a via do interferon tipo I, enquanto a exposição crônica ao palmitato ativa o fator de transcrição PPAR- γ , promovendo o metabolismo lipídico em detrimento da via glicolítica e limitando parcialmente a inflamação (Kratz *et al.*, 2014). Outro estudo mostrou que macrófagos peritoneais de C57BL/6 com obesidade, quando estimulados com LPS, produzem menos óxido nítrico, TNF-alfa e IFN-gama, mesmo constatando-se elevados níveis de citocinas inflamatórias no sangue e outros indícios de inflamação sistêmica (Willemsen *et al.*, 2019). De maneira similar, também mostramos que macrófagos peritoneais de C57BL/6 com obesidade falham em controlar a proliferação de *L. major*, e apresentam uma resposta inflamatória “mista” com aumento simultâneo da atividade da arginase e da produção de óxido nítrico (Martins *et al.*, 2020).

Assim, para avaliar se os macrófagos de camundongos com obesidade também apresentam falha na diferenciação *in vitro* e na capacidade leishmanicida, utilizamos o isolamento de células progenitoras da medula óssea para a derivação de macrófagos e em seguida aliar a infecção *in vitro* por *L. major*. Utilizando a ativação metabólica (Kratz *et al.*, 2014), verificamos que os MMEs foram menos eficientes no controle do parasito quando comparados aos macrófagos M1. Além disso, a infecção de macrófagos derivados da medula óssea de animais com obesidade e estimulados com LPS e IFN-gama induziu menor produção de óxido nítrico e TNF-alfa, quando comparados aos isolados dos camundongos controles. Tanto os macrófagos M1 e M2 de camundongos com obesidade apresentaram mais parasitos por células infectadas, correlacionando com maior atividade da arginase, que resulta no aumento de poliaminas disponíveis no compartimento intracelular, utilizadas para replicação do parasito. O aumento da expressão da enzima arginase pode ocorrer em ambiente de estimulação crônica ao LDL, via ativação do PPAR- γ (Gallardo-Soler *et al.*, 2008), o que pode estar ocorrendo no modelo em questão. Além disso, outro trabalho avaliou macrófagos cultivados a partir das biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea e diabetes tipo 2, onde há maior disponibilidade de metabólitos como glicose e ácido graxo livre no sangue. Similarmente ao que observamos, estas células foram menos

eficientes para eliminar o parasito e tiveram redução na produção de ROS e de leucotrieno B4 (Bonyek-Silva *et al.*, 2020).

Na obesidade com síndrome metabólica, é provável que o estado de dislipidemia, endotoxemia e o aumento de citocinas plasmáticas induza o processo de memória imune inata (imunidade treinada). Esse fenômeno é caracterizado pela reprogramação epigenética e metabólica das células mieloides progenitoras, diretamente na medula óssea após a estimulação prévia por algum estímulo inflamatório (Netea *et al.*, 2020). Um estudo mostrou que camundongos alimentados com uma dieta ocidental por 4 semanas tiveram indução da imunidade treinada em monócitos, caracterizado pelo aumento na expressão de NLRP3 e maior produção geral de citocinas como TNF-alfa e IL-10 (Christ *et al.*, 2018). Recentemente, também foi demonstrado que uma dieta rica em gordura elevou os níveis sistêmicos de palmitato, promovendo desregulação inflamatória em macrófagos derivados de medula óssea que foram posteriormente estimulados com LPS (Seufert *et al.*, 2022). Conforme discutido acima, assim como a inflamação metabólica demonstrada *in vitro* (Kratz *et al.*, 2014), provavelmente a inflamação sistêmica da obesidade pode comprometer a diferenciação de células ainda na medula óssea, e no caso de macrófagos modificar o espectro de inflamação entre M1 e M2, e induzir outras características dessas células. Um dos motivos é por exemplo o aumento de ácidos graxos livres durante a obesidade, que além de se ligarem a TLRs, podem se ligar ao receptor CD36 por exemplo, expresso principalmente por macrófagos com perfil anti-inflamatório e ativar essas células (Chen *et al.*, 2022).

De fato, macrófagos do tecido adiposo de camundongos com obesidade exibem um perfil único de metabolismo energético intracelular, caracterizada por aumento simultâneo da glicólise e da fosforilação oxidativa (Boutens *et al.*, 2018), o que é condizente com o a inflamação metabólica. Em nosso estudo, sugere-se que a obesidade tem de fato um efeito na imunidade treinada, e no caso da infecção por *L. major* pode predispor os macrófagos derivados da medula óssea a um perfil inflamatório ineficiente para o controle do parasito.

Para avaliar o comportamento da lesão *in vivo* e a participação dos macrófagos no processo de infecção na obesidade, animais com obesidade foram infectados na orelha (infecção intradérmica) com uma dose média de promastigotas. Os camundongos com obesidade apresentam uma lesão progressiva e sem sinais de

resolução até aproximadamente 100 dias de infecção. O aumento da lesão correlaciona-se com o aumento na carga parasitária, diferindo dos camundongos controle que foram resistentes e controlam o parasitismo.

A pele contém uma vasta população de células da imunidade inata como macrófagos, DCs, eosinófilos, basófilos e mastócitos. É descrito um variado subtipo de DCs, incluindo as células dendríticas convencionais que são especialistas na migração para os linfonodos, e outras DCs com fenótipo e receptores similares à de macrófagos residentes (Henri *et al.*, 2010). Os macrófagos residentes da pele possuem origem embrionária, porém em eventuais circunstâncias o reservatório de monócitos que se mantém constante no tecido pode originar macrófagos residentes (Tamoutounour *et al.*, 2013). Em geral, esse tipo de célula se caracteriza por ser especialista na endocitose de macromoléculas do sangue e por desempenharem papéis específicos de acordo com a localização, fornecendo suporte para manutenção da homeostase e função do órgão. No tecido adiposo, macrófagos residentes atuam na vascularização do órgão (Silva *et al.*, 2021a), no coração impulsionam a proliferação de cardiomiócitos (Epelman *et al.*, 2014) e no cérebro controlam o fluxo do líquido cefalorraquidiano (Drieu *et al.*, 2022). Na pele, macrófagos residentes marcados pela expressão do receptor de manose constituem uma importante interface com o meio externo e assim como em outros órgãos se localizam em torno de vasos sanguíneos (Barreiro *et al.*, 2016).

A frequência de macrófagos residentes na derme de animais saudáveis varia entre 20 a 40% das células CD11b totais. Essas células não são capazes de migrar para os linfonodos e possuem capacidade limitada de apresentação de antígenos em comparação com as DCs (Tamoutounour *et al.*, 2013). Por outro lado, possuem excelente capacidade fagocítica e expressam uma série de genes específicos que conferem funções como a eliminação de intermediários de degradação de macromoléculas e reparo tecidual. No entanto, pouco se sabe sobre a plasticidade dos macrófagos residentes no contexto do aumento crônico de estímulos inflamatórios, como a obesidade, ou no contexto de infecções.

Devido a sua localização anatômica perivascular, em um contexto de infecção essas células poderiam atuar como hospedeiras iniciais do patógeno. De fato, os macrófagos residentes da pele foram descritos como a principal população infectada após a transmissão de *L. major* pela picada do flebotomíneo (Chaves *et al.*, 2020). Em

outro trabalho foi demonstrado que a cepa *L. major Seidman*, a qual induz lesões severas em camundongos C57BL/6, infecta preferencialmente macrófagos com alta expressão do receptor de manose e que a depleção destes gerou lesões que se curam espontaneamente (Lee *et al.*, 2018). Além disso, essas células se mantem altamente fagocíticas e com um perfil condizente com suas funções homeostáticas mesmo em camundongos C57BL/6, os quais possuem um perfil genético que favorece a proliferação de macrófagos pró-inflamatórios na infecção por *L. major* (Lee *et al.*, 2020).

Similarmente ao que ocorre no tecido adiposo, onde macrófagos residentes aumentam em frequência durante a obesidade (Silva *et al.*, 2019), mostramos que os camundongos que foram submetidos a dieta hipercalórica, apresentam um aumento na frequência de macrófagos residentes não só no tecido adiposo, mas também no baço e no fígado. No entanto, ao analisar a população dessas células inatas na pele, verificamos que as populações se mantem em frequência similar a dos animais controle. Curiosamente, assim como as células perivasculares do tecido adiposo (Silva *et al.*, 2019), os macrófagos residentes do baço de animais com obesidade apresentaram capacidade limitada de endocitose, enquanto as células da orelha absorvem normalmente o FITC-Dextran. Defeitos no processo fagocítico de macrófagos no contexto da hiperglicemia já são constatados desde o século anterior, no qual estudos pioneiros avaliaram que o soro de pacientes diabéticos induziram a redução da fagocitose e na ação microbicida frente a *Pneumococcus* (Bagdade *et al.*, 1974). Juntos, os nossos dados sugerem que a obesidade leva a um aumento sistêmico de macrófagos que expressam CD206, mas na pele sem infecção isso não ocorre. Além disso, é provável que o ambiente de constante estimulação crônica no indivíduo obeso aumente de forma geral e em diversos órgãos, a frequência de células com funções defeituosas, inclusive na capacidade de absorver moléculas da circulação.

Ao infectar os animais e avaliar a cinética das células em diferentes tempos, observamos que os camundongos com obesidade apresentaram maior número de células CD11b⁺ na orelha a partir da quarta semana de infecção. Ao final da 8^a semana de infecção verificamos nos animais com obesidade um aumento na frequência de macrófagos CD206⁺ em relação a células dendríticas (P2), às células pró-inflamatórias CD11c⁺ e aos monócitos inflamatórios (P1).

A taxa de renovação de macrófagos residentes da pele é bastante limitada, de modo que na homeostasia é quase nula (Barreiro *et al.*, 2016). Mesmo com o a presença do parasito, essas células apresentaram baixa taxa de proliferação, que foram similares entre os grupos infectados. Portanto, a diminuição no número de monócitos na pele do animal obeso infectado, e a subsequente elevação de macrófagos residentes indicam que os monócitos podem ser rapidamente mobilizados para se diferenciar em macrófagos marcados pela expressão de CD206⁺, os quais não são equipados para a eliminação do parasito. De fato, os macrófagos residentes não conseguiram eliminar o parasito, ao se verificar maior expressão de *L. major-RFP* na população P4 tanto do grupo controle, quanto dos animais com obesidade. Em conjunto, os dados indicam que essas células podem ser um reservatório para o parasito e favorecer a manutenção da infecção.

Para investigar o papel dos macrófagos residentes na infecção, utilizamos camundongos C57BL/6 com deficiência no receptor de quimiocina CCR2, que possuem defeito no processo de emigração dos monócitos da medula óssea para os tecidos. No nosso estudo mostramos que camundongos CCR2^{-/-} que se alimentaram de deita isocalórica, apresentaram uma lesão similar aos camundongos C57BL/6 com obesidade. Já os camundongos CCR2^{-/-} com obesidade tiveram o desenvolvimento mais acelerado da lesão e, ao final de 8 semanas, suas lesões foram mais ulceradas do que os outros grupos. Vale ressaltar, que a deficiência do CCR2 já foi investigada em modelo de infecção em camundongos C57BL/6 com elevada dose de *L. major* pelas vias intradérmica (Sato *et al.*, 2000) e subcutânea (Goncalves *et al.*, 2011). Em ambos os casos, os autores verificaram que os camundongos CCR2^{-/-} apresentaram um prolongamento no tempo de cura da lesão. Além disso, no estudo de Sato e colaboradores observou-se que camundongos deficientes na proteína CCR2 apresentaram maior carga parasitária na orelha infectada, bem como disseminação do parasito para o baço. Os estudos mencionados acima discutem principalmente que a ausência de monócitos é preponderante para o prognóstico dos animais *deficientes*. Porém, estudos posteriores realizados na derme de camundongos CCR2^{-/-} evidenciaram que a ausência de migração de monócitos eleva a frequência de macrófagos residentes, de modo a constituir cerca de 80% das células em condições de homeostasia (Tamoutounour *et al.*, 2013). Portanto, mostramos que além da

ausência de monócitos inflamatórios, a predominância de macrófagos residentes na lesão contribui para o aumento da suscetibilidade do animal.

Determinar os mecanismos subjacentes à expansão dos macrófagos residentes em condições de estresse é uma tarefa complexa. Em situações específicas de infecções, a expansão de células inatas de origem embrionária pode ocorrer em resposta ao controle do patógeno sem a necessidade do recrutamento de monócitos inflamatórios (Jenkins *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2016). Já em situações experimentais de depleção ou de insuficiência de proliferação causada por algum insulto, os monócitos circulantes também podem se diferenciar em células com funções similares aos macrófagos residentes (Hashimoto *et al.*, 2013). Seria interessante investigar se o aumento de células residentes CD206⁺ ocorre por proliferação ou se são derivadas de monócitos, principalmente considerando que a obesidade implica no aumento dessas células na infecção. Uma possível hipótese seria que o aumento da vascularização no tecido eleva a disponibilidade de estímulos obesogênicos como glicose e palmitato no microambiente, o que pode alterar a função das células e estimular a diferenciação em células condizentes com o perfil da inflamação metabólica. Outra possibilidade é que os monócitos de camundongos com obesidade possam estar expostos a algum estímulo na circulação ou mesmo ainda no desenvolvimento na medula óssea, de modo a dar origem a macrófagos com características semelhantes aos residentes.

O papel ativo dos monócitos (Ly6C⁺) no controle das infecções é descrito na literatura. Essas células expressam iNOS e, mediante a produção de NO, podem promover a eliminação de *L. major* (Goncalves *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2017). Em camundongos C57BL/6, foi mostrado que monócitos (Ly6C⁺CCR2⁺) chegam no sítio do inóculo desde o início da infecção, e em cerca de 48 horas após a infecção são as células mais frequentes na lesão, substituindo a grande população de neutrófilos que se estabelece a partir dos primeiros momentos da infecção (Romano *et al.*, 2017) e são capazes de eliminar os parasitos (Carneiro *et al.*, 2020). O papel dos monócitos, tem sido estudado em tempos iniciais da infecção, no entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas células em tempos tardios da infecção. No nosso modelo, foi observada diminuição de monócitos ao final de oito semanas de infecção, o que também pode ter sido um fator prejudicial na eliminação do parasito no animal obeso.

A resolução da lesão envolve desde o desenvolvimento de uma inflamação contundente, a regulação dessa inflamação e a adequada cicatrização tecidual. Os monócitos e macrófagos são células fundamentais em cada etapa desse processo. Os diferentes subtipos desempenham papéis cruciais desde a eliminação do parasito e remoção de tecido morto, a regulação celular, contribuindo para o processo de cura. Em modelo de obesidade crônica e diabetes em camundongos deficientes para o receptor de leptina (db/db), observa-se o comprometimento do processo de cicatrização. Os animais apresentam maior produção de células da linhagem mieloide e maior acúmulo de macrófagos disfuncionais na ferida (Barman *et al.*, 2019). Além disso, estudos reforçam que macrófagos de camundongos diabéticos apresentam redução na capacidade fagocítica e uma predominância de fenótipos inflamatórios (Mirza and Koh, 2014). No contexto de uma lesão estéril, a transição de macrófagos inflamatórios para pró-resolutivos é essencial para cicatrização. Já no modelo de infecção por *L. major* a persistência e predominância de macrófagos residentes com características anti-inflamatórias em camundongos com obesidade é prejudicial para o controle do parasito. O aumento da lesão nesse contexto sugere que a obesidade induz uma inflamação ineficiente para o controle do parasito e para o processo de cicatrização. Além disto, ela eleva a frequência de macrófagos residentes que podem ter algumas das suas funções afetadas, como estimulação à produção de colágeno e ao remodelamento da matriz extracelular, afetando também no processo de cicatrização.

Desde o redescobrimento do tecido adiposo como um importante nicho de células imune, novas descobertas apontam para a grande complexidade desse órgão. Estudos utilizando sequenciamento *Single Cell* nas células do tecido adiposo de humanos detectou 28 clusters de diferentes células imunes (Hildreth *et al.*, 2021). Apesar da grande diversidade de células (Weisberg *et al.*, 2003), o grande fato que se manteve intacto mesmo depois de anos após a sua descoberta, é a predominância de macrófagos no estado de tecido saudável e o aumento explosivo durante a obesidade (Hill *et al.*, 2018; Jaitin *et al.*, 2019). Outro conceito que ganhou muita notoriedade foi a transição de células anti-inflamatórias para pró-inflamatórias durante a obesidade. Apesar dessa ideia de alteração no perfil inflamatório ser correta, muitas nuances deste fenômeno estão sendo redefinidas. O estudo de Silva e colaboradores mostrou que o aumento de macrófagos inflamatórios durante a obesidade é proporcional ao

aumento de macrófagos anti-inflamatórios, já que macrófagos com a expressão do receptor CD206 aumentam conjuntamente, porém com uma assinatura gênica totalmente modificada. No caso, foi detectado que estas células são renovadas por proliferação local. Já o trabalho com sequenciamento das células em humanos mostrou que monócitos inflamatórios podem dar origem aos macrófagos perivasculares (Hildreth *et al.*, 2021), que também apresentam características diferentes dos classicamente ativados. O impacto da obesidade vai além da alteração da homeostase do organismo e afeta diretamente a função das células, o que pode ocasionar em defeitos em processos vitais como a fagocitose e o reparo de tecido. Estudos ainda são necessários para compreender o impacto dos efeitos sistêmicos da obesidade nas células imunes de outros órgãos e dos mecanismos de defesa do hospedeiro em condições inflamatórias pré-existentes.

Na maior parte do tempo, o organismo não precisa desenvolver respostas inflamatórias, o que implica no estado de homeostasia. No entanto, há momentos em que as células precisam ativar vias inflamatórias para controlar uma infecção por exemplo, mas ao mesmo tempo precisam criar mecanismos regulatórios a fim de que essa inflamação não seja excessiva e danosa ao sistema. De fato, a inflamação induz um processo regulatório, e esses eventos se misturam em busca de um fino equilíbrio. A obesidade por sua vez acarreta alterações sistêmicas que levam a quebra da homeostase do organismo, gerando um processo de estresse crônico para as células que estão a todo momento captando o excesso de FFAs e de outros metabólitos, e também interagindo com LPS. Isso modifica o fenótipo celular e a produção de citocinas, induzindo uma inflamação sistêmica de baixa intensidade. De forma análoga na resposta inflamatória a um patógeno espera-se que a inflamação causada pela obesidade também induza mecanismos compensatórios em uma tentativa de reestabelecer a homeostasia do organismo. Nesse sentido, o aumento de macrófagos com perfil anti-inflamatório e especialistas em endocitose condiz com células constantemente expostas a metabólitos e como uma forma de compensação da resposta inflamatória sistêmica.

O fato é que a obesidade e as alterações imunes relacionadas a essa condição, a colocam como um dos problemas mais graves e intrigantes da atualidade. No contexto da leishmaniose cutânea, detectamos que a obesidade induzida por dieta prejudica no controle do parasito, aumentando a lesão e a frequências de macrófagos

residentes na lesão após 8 semanas de infecção. Nossos resultados podem ser relacionados com os do grupo do professor Edgard Carvalho que identificou em pacientes de área endêmica para leishmaniose cutânea que a obesidade estava associada com um prolongamento no tempo das lesões causadas por *L. braziliensis*, e com aumento na falha terapêutica com Glucantime, medicamento cedido pelo SUS para tratamento da leishmaniose cutânea no Brasil (Lago *et al.*, 2021).

A obesidade de fato impacta a resposta imune e o tratamento das infecções, e a compreensão dos mecanismos subsequentes a infecção em um indivíduo com uma carga inflamatória prévia pode fornecer novas possibilidades terapêuticas específicas para indivíduos com obesidade e infecção.

6. CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta foi capaz de alterar a resposta de macrófagos derivados da medula óssea no modelo de infecção *in vitro* por *L. major*. Nesse modelo, sob estímulo M1 os macrófagos mataram menos parasitos e produziram menos óxido nítrico e TNF-alfa. Na polarização M2, também observamos maior suscetibilidade à infecção. Em ambos os casos houve um aumento na atividade da arginase que é compatível com o fenótipo. Já na infecção em C57BL/6, a obesidade resultou numa lesão mais severa. Houve um aumento na frequência de macrófagos residentes em relação a monócitos e macrófagos inflamatórios. Camundongos *CCR2*^{-/-} também tiveram maior lesão, e a dieta HSB agravou ainda mais o prognóstico na linhagem. O aumento de macrófagos residentes é condizente ao aumento no parasitismo, já que esta célula não promove de maneira eficiente a eliminação do parasito.

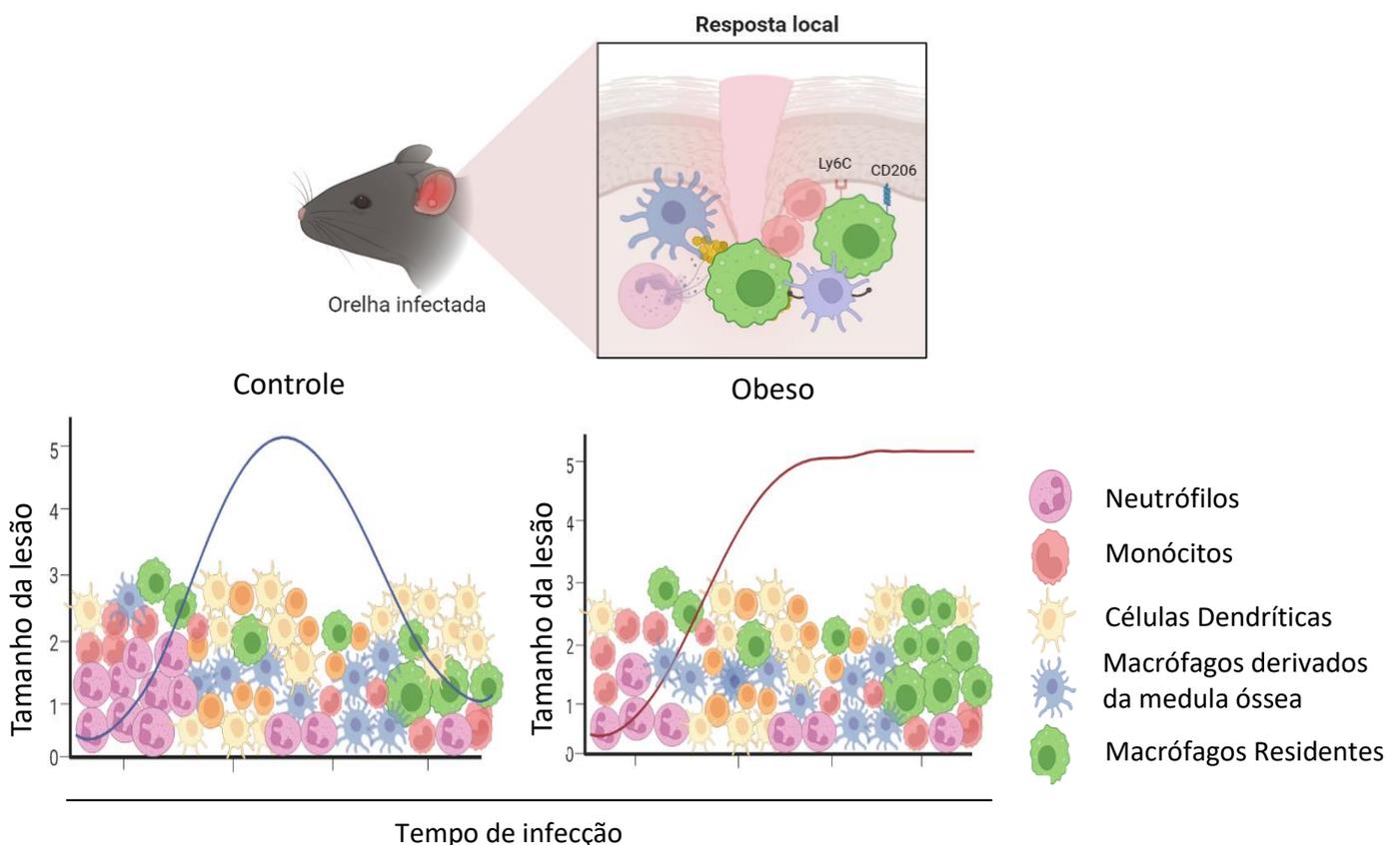


Figura 20: Imagem ilustrativa da conclusão do trabalho

Camundongos C57BL/6 curam espontaneamente da infecção por *L. Major*; Já os animais obesos apresentam uma lesão mais ulcerada, caracterizada principalmente pelo acúmulo de macrófagos residentes ao final de 8 semanas de infecção

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, L. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. and Scott, P.** (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 235–7.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. and de Boer, M.** (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* **7**,. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Bacellar, O., Brodskyn, C., Guerreiro, J., Barral-Netto, M., Henrique Costa, C., Coffman, R. L., Johnson, W. D. and Carvalho, E. M.** (1996). *Interleukin-12 Restores Interferon- γ Production and Cytotoxic Responses in Visceral Leishmaniasis*.
- Bagdade, J. D., Root, R. K. and Bulger, R. J.** (1974). Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* **23**, 9–15. doi: 10.2337/DIAB.23.1.9.
- Baker, R. G., Hayden, M. S. and Ghosh, S.** (2011). NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism* **13**, 11–22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008.NF-.
- Barman, P. K., Urao, N. and Koh, T. J.** (2019). Diabetes induces myeloid bias in bone marrow progenitors associated with enhanced wound macrophage accumulation and impaired healing. *The Journal of pathology* **249**, 435. doi: 10.1002/PATH.5330.
- Barreiro, O., Cibrian, D., Clemente, C., Alvarez, D., Moreno, V., Valiente, Í., Bernad, A., Vestweber, D., Arroyo, A. G., Martín, P., Von Andrian, U. H. and Madrid, F. S.** (2016). Pivotal role for skin transendothelial radio-resistant anti-inflammatory macrophages in tissue repair. *eLife* **5**,. doi: 10.7554/ELIFE.15251.
- Bates, P. A. and Rogers, M. E.** (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current molecular medicine* **4**, 601–9.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J. and Sacks, D. L.** (1998). Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva

- Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. *The Journal of Experimental Medicine* **188**, 1941–1953. doi: 10.1084/jem.188.10.1941.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. and Sacks, D.** (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 969–977. doi: [10.1093/ijl/165n2p969](https://doi.org/10.1093/ijl/165n2p969) [pii].
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. and Sacks, D.** (2002). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, 3992–4000.
- Blüher, M.** (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology* **15**, 288–298. doi: [10.1038/s41574-019-0176-8](https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8).
- Bogdan, C.** (2020). Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine: X* **2**, 100041. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100041>.
- Bonyek-Silva, I., Nunes, S., Santos, R. L., Lima, F. R., Lago, A., Silva, J., Carvalho, L. P., Arruda, S. M., Serezani, H. C., Carvalho, E. M., Brodskyn, C. I. and Tavares, N. M.** (2020). Unbalanced production of LTB 4 /PGE 2 driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. doi: [10.1080/22221751.2020.1773744](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773744).
- Boutens, L., Hooiveld, G. J., Dhingra, S., Cramer, R. A., Netea, M. G. and Stienstra, R.** (2018). Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity promotes inflammatory responses. *Diabetologia* **61**, 942–953. doi: [10.1007/s00125-017-4526-6](https://doi.org/10.1007/s00125-017-4526-6).
- Bryan, N. S. and Grisham, M. B.** (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, 645–657. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026).
- Cao, S., Pan, Y., Tang, J., Terker, A. S., Arroyo Ornelas, J. P., Jin, G. nan, Wang, Y., Niu, A., Fan, X., Wang, S., Harris, R. C. and Zhang, M. Z.** (2022). EGFR-mediated activation of adipose tissue macrophages promotes obesity and insulin resistance. *Nature Communications* **13**, 1–16. doi: [10.1038/s41467-](https://doi.org/10.1038/s41467-)

022-32348-3.

- Carneiro, M. B., Hohman, L. S., Egen, J. G. and Peters, N. C.** (2017). Use of two-photon microscopy to study *Leishmania major* infection of the skin. *Methods* **127**, 45–52. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.04.012.
- Carneiro, M. B. H., Roma, E. H., Ranson, A. J., Doria, N. A., Debrabant, A., Sacks, D. L., Vieira, L. Q. and Peters, N. C.** (2018). NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. *The Journal of Immunology* **200**, 196 LP – 208.
- Carneiro, M. B., Lopes, M. E., Hohman, L. S., Romano, A., David, B. A., Kratofil, R., Kubes, P., Workentine, M. L., Campos, A. C., Vieira, L. Q. and Peters, N. C.** (2020). Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell host & microbe* **27**, 752-768.e7. doi: 10.1016/J.CHOM.2020.03.011.
- Carvalho, E. M., Barral, A., Costa, J. M., Bittencourt, A. and Marsden, P.** (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* **56**, 315–25.
- Chakarov, S., Blériot, C. and Ginhoux, F.** (2022). Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *The Journal of experimental medicine* **219**,. doi: 10.1084/JEM.20211948.
- Charmoy, M., Hurrell, B. P., Romano, A., Lee, S. H., Ribeiro-Gomes, F., Riteau, N., Mayer-Barber, K., Tacchini-Cottier, F. and Sacks, D. L.** (2016). The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *European Journal of Immunology* **46**, 897–911. doi: 10.1002/eji.201546015.
- Chaves, M. M., Lee, S. H., Kamenyeva, O., Ghosh, K., Peters, N. C. and Sacks, D.** (2020). The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. *PLoS Pathogens* **16**,. doi: 10.1371/journal.ppat.1008674.
- Chen, Y., Zhang, J., Cui, W. and Silverstein, R. L.** (2022). CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *The Journal of Experimental Medicine* **219**,. doi: 10.1084/JEM.20211314.
- Cho, K. W., Morris, D. L. and Lumeng, C. N.** (2014). Flow Cytometry Analyses of

- Adipose Tissue Macrophages. *Methods in Enzymology* **537**, 297–314. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00016-1.
- Christ, A., Günther, P., Lauterbach, M. A. R., Duewell, P., Biswas, D., Pelka, K., Scholz, C. J., Oosting, M., Haendler, K., Baßler, K., Klee, K., Schulte-Schrepping, J., Ulas, T., Moorlag, S. J. C. F. M., Kumar, V., Park, M. H., Joosten, L. A. B., Groh, L. A., Riksen, N. P., Espevik, T., Schlitzer, A., Li, Y., Fitzgerald, M. L., Netea, M. G., Schultze, J. L. and Latz, E. (2018).** Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* **172**, 162–175.e14. doi: 10.1016/J.CELL.2017.12.013.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A. S. and Obin, M. S. (2005).** Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* **46**, 2347–2355. doi: 10.1194/jlr.M500294-JLR200.
- Coats, B. R., Schoenfelt, K. Q., Barbosa-Lorenzi, V. C., Peris, E., Cui, C., Hoffman, A., Zhou, G., Fernandez, S., Zhai, L., Hall, B. A., Haka, A. S., Shah, A. M., Reardon, C. A., Brady, M. J., Rhodes, C. J., Maxfield, F. R. and Becker, L. (2017).** Metabolically Activated Adipose Tissue Macrophages Perform Detrimental and Beneficial Functions during Diet-Induced Obesity. *Cell reports* **20**, 3149–3161. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.096.
- de Carvalho, R. V. H., Soares, S. M. A., Gualberto, A. C. M., Evangelista, G. C. M., Duque, J. A. M., Ferreira, A. P., Macedo, G. C. and Gameiro, J. (2015).** Plasmodium berghei ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. *Cytokine* **76**, 545–548. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.025.
- De Maia, L. A., Cruz, F. F., De Oliveira, M. V., Samary, C. S., De Fernandes, M. V. S., De Trivelin, S. A. A., De Rocha, N. N., De Abreu, M. G., Pelosi, P., Silva, P. L. and Rocco, P. R. M. (2019).** Effects of obesity on pulmonary inflammation and remodeling in experimental moderate acute lung injury. *Frontiers in Immunology* **10**, 1215. doi: 10.3389/FIMMU.2019.01215/BIBTEX.
- Di Cesare, M., Bentham, J., Stevens, G. A., Zhou, B., Danaei, G., Lu, Y., Bixby, H., Cowan, M. J., Riley, L. M., Hajifathalian, K., Fortunato, L., Taddei, C., Bennett, J. E., Ikeda, N., Khang, Y. H., Kyobutungi, C., Laxmaiah, A., Li, Y.,**

- Lin, H. H., Miranda, J. J., Mostafa, A., Turley, M. L., Paciorek, C. J., Gunter, M., Ezzati, M., Abdeen, Z. A., Hamid, Z. A., Abu-Rmeileh, N. M., Acosta-Cazares, B., Adams, R., Aekplakorn, W., Aguilar-Salinas, C. A., Ahmadvand, A., Ahrens, W., Ali, M. M., Alkerwi, A., Alvarez-Pedrerol, M., Aly, E., Amouyel, P., Amuzu, A., Andersen, L. B., Anderssen, S. A., Andrade, D. S., Anjana, R. M., Aounallah-Skhiri, H., Ariansen, I., Aris, T., Arlappa, N., Arveiler, D., Assah, F. K., Avdicov??, M., Azizi, F., Babu, B. V., Balakrishna, N., Bandosz, P., Banegas, J. R., Barbagallo, C. M., Barcel??, A., Barkat, A., Barros, M. V., Bata, I., Batieha, A. M., Batista, R. L., Baur, L. A., Beaglehole, R., Romdhane, H. Ben, Benet, M., Bernabe-Ortiz, A., Bernotiene, G., Bettiol, H., Bhagyalaxmi, A., Bharadwaj, S., Bhargava, S. K., Bhatti, Z., Bhutta, Z. A., Bi, H. S., Bi, Y., Bjerregaard, P., Bjertness, E., Bjertness, M. B., Bj??rkelund, C., Blake, M., Blokstra, A., Bo, S., Bobak, M., Boddy, L. M., Boehm, B. O., Boeing, H., Boissonnet, C. P., Bongard, V., Bovet, P., Braeckman, L., Bragt, M. C. E., Brajkovich, I., Branca, F., Breckenkamp, J., Brenner, H., Brewster, L. M., et al. (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet* **387**, 1377–1396. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
- Drieu, A., Du, S., Storck, S. E., Rustenhoven, J., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Zhong, F., Kim, K., Blackburn, S., Mamuladze, T., Harari, O., Karch, C. M., Bateman, R. J., Perrin, R., Farlow, M., Chhatwal, J., Dominantly Inherited Alzheimer Network, Hu, S., Randolph, G. J., Smirnov, I. and Kipnis, J. (2022). Parenchymal border macrophages regulate the flow dynamics of the cerebrospinal fluid. *Nature* **2022** *611*:7936 **611**, 585–593. doi: 10.1038/s41586-022-05397-3.
- Endo, Y., Asou, H. K., Matsugae, N., Hirahara, K., Shinoda, K., Tumes, D. J., Tokuyama, H., Yokote, K. and Nakayama, T. (2015). Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep* **12**, 1042–1055. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.014.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Beaudin, A. E., Sojka, D. K., Carrero, J. A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E. L., Ivanov, S., Satpathy, A. T., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E. C., Yokoyama, W. M.,

- Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J. and Mann, D. L.** (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.11.019.
- Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. and Lima, F. B.** (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de Pediatria* **83**, S192-203. doi: doi:10.2223/JPED.1709.
- Fontaine, K. R., Redden, D. T., Wang, C., Westfall, A. O. and Allison, D. B.** (2003). Years of life lost due to obesity. *JAMA* **289**, 187–193. doi: 10.1001/JAMA.289.2.187.
- Gallardo-Soler, A., Gómez-Nieto, C., Campo, M. L., Marathe, C., Tontonoz, P., Castrillo, A. and Corraliza, I.** (2008). Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **22**, 1394–1402. doi: 10.1210/me.2007-0525.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. and Merad, M.** (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 841–845. doi: 10.1126/science.1194637.
- Gomez-Hernandez, A., Beneit, N., Diaz-Castroverde, S. and Escribano, O.** (2016). Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *International journal of endocrinology* **2016**, 1216783. doi: 10.1155/2016/1216783.
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A. and Mosser, D. M.** (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 1253–1265. doi: 10.1084/jem.20101751.
- Gregor, M. F. and Hotamisligil, G. S.** (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* **29**, 415–445. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H. and Lambrecht, B. N.** (2013).

Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine* **210**, 1977–1992. doi: 10.1084/JEM.20131199.

- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S. and Merad, M.** (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- He, Q., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Yun, Z. and Ye, J.** (2011). Regulation of HIF-1 α activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **300**, E877-85. doi: 10.1152/ajpendo.00626.2010.
- Heinzel, F. P., Schoenhaut, D. S., Rerko, R. M., Rosser, L. E. and Gately, M. K.** (1993). Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine* **177**, 1505–9.
- Henri, S., Poulin, L. F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., De Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A. and Malissen, B.** (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine* **207**, 189–206. doi: 10.1084/JEM.20091964.
- Hildreth, A. D., Ma, F., Wong, Y. Y., Sun, R., Pellegrini, M. and O’Sullivan, T. E.** (2021). Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity. *Nature Immunology* **22**, 639–653. doi: 10.1038/s41590-021-00922-4.
- Hill, D. A., Lim, H. W., Kim, Y. H., Ho, W. Y., Foong, Y. H., Nelson, V. L., Nguyen, H. C. B., Chegireddy, K., Kim, J., Habertheuer, A., Vallabhajosyula, P., Kambayashi, T., Won, K. J. and Lazar, M. A.** (2018). Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E5096–E5105. doi: 10.1073/PNAS.1802611115/SUPPL_FILE/PNAS.1802611115.SAPP.PDF.

- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S. H. Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S. J., Stanley, E. R., Chan, J. K. Y., Ng, L. G., Samokhvalov, I. M., Merad, M. and Ginhoux, F.** (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1167–1181. doi: 10.1084/JEM.20120340.
- Hotamisligil, G. S.** (2017). Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* **542**, 177–185. doi: 10.1038/nature21363.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. and Spiegelman, B. M.** (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91.
- Hurdayal, R. and Brombacher, F.** (2017). Interleukin-4 receptor α : From innate to adaptive immunity in murine models of cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **8**,. doi: 10.3389/fimmu.2017.01354.
- Jaitin, D. A., Adlung, L., Thaiss, C. A., Weiner, A., Li, B., Descamps, H., Lundgren, P., Bleriot, C., Liu, Z., Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., David, E., Zmora, N., Eldar, S. M., Lubezky, N., Shibolet, O., Hill, D. A., Lazar, M. A., Colonna, M., Ginhoux, F., Shapiro, H., Elinav, E. and Amit, I.** (2019). Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell* **178**, 686-698.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.054.
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., Van Rooijen, N., MacDonald, A. S. and Allen, J. E.** (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **332**, 1284–1288. doi: 10.1126/SCIENCE.1204351.
- Kane, M. M. and Mosser, D. M.** (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of Immunology* **166**, 1141–1147.
- Karlsson, E. A. and Beck, M. A.** (2010). The burden of obesity on infectious disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* **235**, 1412–1424. doi: 10.1258/ebm.2010.010227.
- Karlsson, E. A., Sheridan, P. A. and Beck, M. A.** (2010). Diet-induced obesity in mice reduces the maintenance of influenza-specific CD8+ memory T cells. *The*

- Journal of nutrition* **140**, 1691–1697. doi: 10.3945/jn.110.123653.
- Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, K. H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B. and Solbach, W.** (1996). IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1127–36.
- Kratz, M., Coats, B. R., Hisert, K. B., Hagman, D., Mutskov, V., Peris, E., Schoenfelt, K. Q., Kuzma, J. N., Larson, I., Billing, P. S., Landerholm, R. W., Crouthamel, M., Gozal, D., Hwang, S., Singh, P. K. and Becker, L.** (2014). Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metabolism* **20**, 614–625. doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.010.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. and Bravo, R.** (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 1757–1762. doi: 10.1084/jem.186.10.1757.
- Kusminski, C. M., Bickel, P. E. and Scherer, P. E.** (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature reviews. Drug discovery* **15**, 639–660. doi: 10.1038/NRD.2016.75.
- Lago, T., Carvalho, L. P., Nascimento, M., Guimarães, L. H., Lago, J., Castellucci, L., Carvalho, A. M., Lago, A. and Carvalho, E. M.** (2021). Influence of Obesity on Clinical Manifestations and Response to Therapy in Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **73**, 1020. doi: 10.1093/CID/CIAB236.
- LaMarche, N. M., Kohlgruber, A. C. and Brenner, M. B.** (2018). Innate T cells govern adipose tissue biology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **201**, 1827. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1800556.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G. and Solbach, W.** (2003). Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology* **11**, 210–214. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00075-1.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W. and Laskay, T.** (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors.

Infection and Immunity **70**, 826–835.

- Lee, S. H., Charmoy, M., Romano, A., Paun, A., Chaves, M. M., Cope, F. O., Ralph, D. A. and Sacks, D. L.** (2018). Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. *The Journal of Experimental Medicine* **215**, 357 LP – 375. doi: 10.1084/jem.20171389.
- Lee, S. H., Chaves, M. M., Kamenyeva, O., Gazzinelli-Guimaraes, P. H., Kang, B., Pessenda, G., Passelli, K., Tacchini-Cottier, F., Kabat, J., Jacobsen, E. A., Nutman, T. B. and Sacks, D. L.** (2020). M2-like, dermal macrophages are maintained via IL-4/CCL24-mediated cooperative interaction with eosinophils in cutaneous leishmaniasis. *Science Immunology* **5**,. doi: 10.1126/sciimmunol.aaz4415.
- Louie, J. K., Acosta, M., Samuel, M. C., Schechter, R., Vugia, D. J., Harriman, K., Matyas, B. T. and Group, C. P. (H1N1) W.** (2011). A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Clinical Infectious Diseases* **52**, 301–312. doi: 10.1093/cid/ciq152.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R.** (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* **117**, 175–184. doi: 10.1172/JCI29881.The.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R.** (2007b). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 175–184. doi: 10.1172/jci29881.
- Maioli, T. U., Goncalves, J. L., Miranda, M. C., Martins, V. D., Horta, L. S., Moreira, T. G., Godard, A. L., Santiago, A. F. and Faria, A. M.** (2016). High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflammation Research* **65**, 169–178. doi: 10.1007/s00011-015-0902-1.
- Martínez, C. R. and Ruiz, C. J.** (2019). Alterations in Host Lipid Metabolism Produced During Visceral Leishmaniasis Infections. *Current Tropical Medicine Reports* **6**, 250–255. doi: 10.1007/s40475-019-00187-w.
- Martins, V. D., Silva, F. C., Caixeta, F., Carneiro, M. B., Goes, G. R., Torres, L., Barbosa, S. C., Vaz, L., Paiva, N. C., Carneiro, C. M., Vieira, L. Q., Faria, A. M. C. and Maioli, T. U.** (2020). Obesity impairs resistance to leishmania major

- infection in c57bl/6 mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **14**, 1–20. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0006596.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. and Hill, A. M.** (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology* **164**, 6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.
- Mirza, R. E. and Koh, T. J.** (2014). Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. *Cytokine*. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.005.
- Misharin, A. V, Morales-Nebreda, L., Reyfman, P. A., Cuda, C. M., Walter, J. M., McQuattie-Pimentel, A. C., Chen, C.-I., Anekalla, K. R., Joshi, N., Williams, K. J. N., Abdala-Valencia, H., Yacoub, T. J., Chi, M., Chiu, S., Gonzalez-Gonzalez, F. J., Gates, K., Lam, A. P., Nicholson, T. T., Homan, P. J., Soberanes, S., Dominguez, S., Morgan, V. K., Saber, R., Shaffer, A., Hinchcliff, M., Marshall, S. A., Bharat, A., Berdnikovs, S., Bhorade, S. M., Bartom, E. T., Morimoto, R. I., Balch, W. E., Sznajder, J. I., Chandel, N. S., Mutlu, G. M., Jain, M., Gottardi, C. J., Singer, B. D., Ridge, K. M., Bagheri, N., Shilatifard, A., Budinger, G. R. S. and Perlman, H.** (2017). Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *The Journal of experimental medicine* **214**, 2387–2404. doi: 10.1084/jem.20162152.
- Moradin, N. and Descoteaux, A.** (2012). Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**, 121. doi: 10.3389/fcimb.2012.00121.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **136**, 2348–57.
- Muraille, E., De Trez, C., Brait, M., De Baetselier, P., Leo, O. and Carlier, Y.** (2003). Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to *Leishmania major*; Infection Associated with a Polarized Th2 Response. *The Journal of Immunology* **170**, 4237 LP – 4241. doi: 10.4049/jimmunol.170.8.4237.
- Nagajyothi, F., Zhao, D., Machado, F. S., Weiss, L. M., Schwartz, G. J.,**

- Desruisseaux, M. S., Zhao, Y., Factor, S. M., Huang, H., Albanese, C., Teixeira, M. M., Scherer, P. E., Chua, S. C. and Tanowitz, H. B.** (2010). Crucial role of the central leptin receptor in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of infectious diseases* **202**, 1104–1113. doi: 10.1086/656189.
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Machado, F. S., Upadhy, R., Zhao, D., Schwartz, G. J., Teixeira, M. M., Albanese, C., Lisanti, M. P., Chua Jr., S. C., Weiss, L. M., Scherer, P. E. and Tanowitz, H. B.** (2012). Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *Journal of Infectious Diseases* **205**, 830–840. doi: jir840 [pii]10.1093/infdis/jir840.
- Nagajyothi, F., Weiss, L. M., Zhao, D., Koba, W., Jelicks, L. a, Cui, M.-H., Factor, S. M., Scherer, P. E. and Tanowitz, H. B.** (2014). High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases* **8**, e3118. doi: 10.1371/journal.pntd.0003118.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, I. E. and Rubin, B. Y.** (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of experimental medicine* **158**, 670–689. doi: 10.1084/JEM.158.3.670.
- Nave, H., Beutel, G. and Kielstein, J. T.** (2011). Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. *Lancet Infectious Diseases* **11**, 14–15. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70304-2.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J. and Latz, E.** (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **20**, 375–388. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T. and Nagai, R.** (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* **15**, 914–920. doi: 10.1038/nm.1964.
- Novais, F. O. and Scott, P.** (2015). CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in Immunopathology* **37**, 251–259. doi:

- 10.1007/s00281-015-0475-7.
- Painter, S. D., Ovsyannikova, I. G. and Poland, G. A.** (2015). The weight of obesity on the human immune response to vaccination. *Vaccine* **33**, 4422–4429. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.06.101.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. and Sacks, D.** (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (New York, N.Y.)* **321**, 970–974. doi: 10.1126/science.1159194.
- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceicao-Silva, F. and Modlin, R. L.** (1993). Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 1390–1395. doi: 10.1172/JCI116341.
- Plaeke, P., De Man, J. G., Coenen, S., Jorens, P. G., De Winter, B. Y. and Hubens, G.** (2020). Clinical- and surgery-specific risk factors for post-operative sepsis: a systematic review and meta-analysis of over 30 million patients. *Surgery Today* **50**, 427–439. doi: 10.1007/S00595-019-01827-4/FIGURES/5.
- Popkin, B. M., Adair, L. S. and Ng, S. W.** (2012). NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutrition Reviews* **70**, 3. doi: 10.1111/J.1753-4887.2011.00456.X.
- Prado, W. L. do, Lofrano, M. C., Oyama, L. M. and Dâmaso, A. R.** (2009). Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **15**, 378–383.
- Ramos Muniz, M. G., Palfreeman, M., Setzu, N., Sanchez, M. A., Saenz Portillo, P., Garza, K. M., Gosselink, K. L. and Spencer, C. T.** (2018). Obesity Exacerbates the Cytokine Storm Elicited by Francisella tularensis Infection of Females and Is Associated with Increased Mortality. *BioMed Research International* **2018**,. doi: 10.1155/2018/3412732.
- Reeves, Nielsen, F. H. and Fahey, G. C.** (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* **123**, 1939–1951. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Reiner, S. L. and Locksley, R. M.** (1995). The Regulation of Immunity to Leishmania

Major. *Annual Review of Immunology* **13**, 151–177. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001055.

- Roberts, S. C., Tancer, M. J., Polinsky, M. R., Gibson, K. M., Heby, O. and Ullman, B.** (2004). Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23668–23678. doi: 10.1074/jbc.M402042200.
- Romano, A., Carneiro, M. B. H., Doria, N. A., Roma, E. H., Ribeiro-Gomes, F. L., Inbar, E., Lee, S. H., Mendez, J., Paun, A., Sacks, D. L. and Peters, N. C.** (2017). Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLOS Pathogens* **13**, e1006479.
- Sacks, D. and Noben-Trauth, N.** (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology* **2**, 845–858. doi: 10.1038/nri933.
- Sarnáglia, G. D., Covre, L. P., Pereira, F. E. L., De Matos Guedes, H. L., Faria, A. M. C., Dietze, R., Rodrigues, R. R., Maioli, T. U. and Gomes, D. C. O.** (2016). Diet-induced obesity promotes systemic inflammation and increased susceptibility to murine visceral leishmaniasis. *Parasitology* **143**,. doi: 10.1017/S003118201600127X.
- Sato, N., Ahuja, S. K., Quinones, M., KostECKi, V., Reddick, R. L., Melby, P. C., Kuziel, W. A. and Ahuja, S. S.** (2000). CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *The Journal of experimental medicine* **192**, 205–18.
- Scharton, T. M. and Scott, P.** (1993). Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *The Journal of experimental medicine* **178**, 567–77.
- Schleicher, U., Paduch, K., Debus, A., Obermeyer, S., König, T., Kling, J. C., Ribechini, E., Dudziak, D., Mougiakakos, D., Murray, P. J., Ostuni, R., Körner, H. and Bogdan, C.** (2016). TNF-Mediated Restriction of Arginase 1

- Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Reports* **15**, 1062–1075. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.001.
- Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. and Kronke, M.** (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced “acidic” sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**, 765–776.
- Scott, L. K., Vachharajani, V., Minagar, A., Mynatt, R. L. and Conrad, S. A.** (2005). Differential RNA expression of hepatic tissue in lean and obese mice after LPS-induced systemic inflammation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **10**, 1828–1834. doi: 10.2741/1664.
- Scott, C. L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., Devoogdt, N., Lambrecht, B. N., Beschin, A. and Guilliams, M.** (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nature Communications* **2015 7:1 7**, 1–10. doi: 10.1038/ncomms10321.
- Serbina, N. V. and Pamer, E. G.** (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* **7**, 311–317. doi: 10.1038/NI1309.
- Seufert, A. L., Hickman, J. W., Traxler, S. K., Peterson, R. M., Waugh, T. A., Lashley, S. J., Shulzhenko, N., Napier, R. J. and Napier, B. A.** (2022). Enriched dietary saturated fatty acids induce trained immunity via ceramide production that enhances severity of endotoxemia and clearance of infection. *eLife* **11**,. doi: 10.7554/ELIFE.76744.
- Sheridan, P. A., Paich, H. A., Handy, J., Karlsson, E. A., Hudgens, M. G., Sammon, A. B., Holland, L. A., Weir, S., Noah, T. L. and Beck, M. A.** (2012). Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *International Journal of Obesity (2005)* **36**, 1072–1077. doi: 10.1038/ijo.2011.208.
- Silva, H. M., Báfica, A., Rodrigues-Luiz, G. F., Chi, J., D’Emery Alves Santos, P., Reis, B. S., Hoytema Van Konijnenburg, D. P., Crane, A., Arifa, R. D. N., Martin, P., Mendes, D. A. G. B., Mansur, D. S., Torres, V. J., Cadwell, K., Cohen, P., Mucida, D. and Lafaille, J. J.** (2019). Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 786–806. doi: 10.1084/jem.20181049.

- Silva, H. M., Kitoko, J. Z., Queiroz, C. P., Kroehling, L., Matheis, F., Yang, K. L., Reis, B. S., Ren-Fielding, C., Littman, D. R., Bozza, M. T., Mucida, D. and Lafaille, J. J. (2021a).** c-MAF-dependent perivascular macrophages regulate diet-induced metabolic syndrome. *Science immunology* **6**,. doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABG7506.
- Silva, T. F., Gonçalves, M. D., Concato, V. M., Bortoleti, B. T. da S., Tomiotto-Pellissier, F., Sanfelice, R. A., Rodrigues, A. C. J., Detoni, M. B., Simão, A. N. C., Custodio, L. A., Mazzuco, T. L., da Costa, I. N., Miranda-Sapla, M. M., Pavanelli, W. R. and Conchon-Costa, I. (2021b).** Impairment of effector molecules response in diabetes induces susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunology Letters* **237**, 58–65. doi: 10.1016/J.IMLET.2021.07.001.
- Simonnet, A., Chetboun, M., Poissy, J., Raverdy, V., Noulette, J., Duhamel, A., Labreuche, J., Mathieu, D., Pattou, F., Jourdain, M., Caizzo, R., Caplan, M., Cousin, N., Duburcq, T., Durand, A., El kalioubie, A., Favory, R., Garcia, B., Girardie, P., Goutay, J., Houard, M., Jaillette, E., Kostuj, N., Ledoux, G., Mathieu, D., Moreau, A. S., Niles, C., Nseir, S., Onimus, T., Parmentier, E., Préau, S., Robriquet, L., Rouze, A., Six, S. and Verkindt, H. (2020).** High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **28**, 1195–1199. doi: 10.1002/OBY.22831.
- Singh, T. P., Carvalho, A. M., Sacramento, L. A., Grice, E. A. and Scott, P. (2021).** Microbiota instruct IL-17A-producing innate lymphoid cells to promote skin inflammation in cutaneous leishmaniasis. *PLOS Pathogens* **17**, 1–21. doi: 10.1371/journal.ppat.1009693.
- Stefan, N., Birkenfeld, A. L., Schulze, M. B. and Ludwig, D. S. (2020).** Obesity and impaired metabolic health in patients with COVID-19. *Nature Reviews Endocrinology* **2020 16:7 16**, 341–342. doi: 10.1038/s41574-020-0364-6.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. and Gordon, S. (1992).** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* **176**, 287–92.
- Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li,**

- P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M. B. and Olefsky, J. M.** (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine* **18**, 1407–1412. doi: 10.1038/nm.2885.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B. and Henri, S.** (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* **39**, 925–938. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.004.
- Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Mota, M. M. and Figueiredo, L. M.** (2017). Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? *Trends in Parasitology* **33**, 276–284. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.008.
- Tauber, A. I. and Chernyak, L.** (1991). Metchnikoff and the origins of immunology : from metaphor to theory. 247.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D. and Gordon, S.** (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 901–944. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816.
- Torres, L., Martins, V. D., Maria, A., Faria, C. De and Maioli, T. U.** (2018). The Intriguing Relationship Between Obesity and Infection. *Journal of Infectiology* **1**, 6–10.
- Vachharajani, V., Russell, J. M., Scott, K. L., Conrad, S., Stokes, K. Y., Tallam, L., Hall, J. and Granger, D. N.** (2005). Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **12**, 183–194. doi: 10.1080/10739680590904982.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. and De Block, C. E.** (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**, 875–880. doi: 10.1038/nature05487.
- Vermund, S. H., Scott, M. E. and Humphries, D. L.** (2021). Public Health and Clinical Implications of Nutrition-Infection Interactions. In *Nutrition and Infectious Diseases*, pp. 459–481. Springer International Publishing doi: 10.1007/978-3-030-56913-6_16.
- Versiani, A., Ferreira, M., Segatto, M., Andrade, L. D. O., Nagajyothi, F., Scherer, P. E., Teixeira, M. M. and Tanowitz, H. B.** (2011). Evidence for Trypanosoma

- cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **13**, 1002–1005. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.002.
- Vieira, L. Q., Hondowicz, B. D., Afonso, L. C., Wysocka, M., Trinchieri, G. and Scott, P.** (1994). Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. *Immunology Letters* **40**, 157–161.
- Vieira, L. Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T. and Scott, P.** (1996). Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *Journal of Immunology* **157**, 827–835.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1796–1808. doi: 10.1172/JCI200319246.
- Wensveen, F. M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T. and Polić, B.** (2015). Interactions between adipose tissue and the immune system in health and malnutrition. *Seminars in Immunology* **27**, 322–333. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.006.
- Wernstedt Asterholm, I., Tao, C., Morley, T. S., Wang, Q. A., Delgado-Lopez, F., Wang, Z. V. and Scherer, P. E.** (2014). Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell metabolism* **20**, 103–118. doi: 10.1016/J.CMET.2014.05.005.
- WHO** (2022a). Obesity and Overweight. *Fact sheet 311*.
- WHO** (2022b). Noncommunicable diseases: Mortality.
- WHO** (2022c). Leishmaniasis.
- WHO** (2023). Body mass index (BMI).p. WHO.
- Willemsen, L., Neele, A. E., Van Der Velden, S., Prange, K. H. M., Den Toom, M., Van Roomen, C. P. A. A., Reiche, M. E., Griffith, G. R., Gijbels, M. J. J., Lutgens, E. and De Winther, M. P. J.** (2019). Peritoneal macrophages have an impaired immune response in obesity which can be reversed by subsequent weight loss. *BMJ open diabetes research & care* **7**,. doi: 10.1136/BMJDR-2019-000751.
- Wynn, T. A., Chawla, A. and Pollard, J. W.** (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **2013 496:7446 496**, 445–455.

doi: 10.1038/nature12034.

- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E. and Jung, S.** (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.12.001.
- Zhang, X., Cohen, H., Goncalves, R., Debrabant, A. and Mosser, D. M.** (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 1253–1265. doi: 10.1084/jem.20101751.
- Zuzarte-Luís, V., Mello-Vieira, J., Marreiros, I. M., Liehl, P., Chora, Â. F., Carret, C. K., Carvalho, T. and Mota, M. M.** (2017). Dietary alterations modulate susceptibility to *Plasmodium* infection. *Nature Microbiology* **2**:12 **2**, 1600–1607. doi: 10.1038/s41564-017-0025-2.

ANEXO: Artigo

RESEARCH ARTICLE

Obesity impairs resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice

Vinicius Dantas Martins¹✉, Franciele Carolina Silva¹✉, Felipe Caixeta², Matheus Batista Carneiro^{1,3}, Grazielle Ribeiro Goes¹, Lícia Torres¹, Sara Cândida Barbosa¹, Leonardo Vaz¹, Nivea Carolina Paiva⁴, Cláudia Martins Carneiro⁴, Leda Quercia Vieira¹, Ana Maria Caetano Faria¹, Tatiani Uceli Maioli⁵*

1 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação Interunidades de Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Snyder Institute for Chronic Diseases, Departments of Microbiology, Immunology and Infectious Disease, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Alberta, Canada, **4** Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, **5** Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* tatianimaioli@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Martins VD, Silva FC, Caixeta F, Carneiro MB, Goes GR, Torres L, et al. (2020) Obesity impairs resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 14(1): e0006596. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596>

Editor: Armando Jardim, McGill university, CANADA

Received: June 5, 2018

Accepted: October 28, 2019

Published: January 10, 2020

Copyright: © 2020 Martins et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) #446409/2014-6 (<http://cnpq.br/>); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais # APQ-01564-14 (<http://www.fapemig.br/>); Pró Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG) (<https://www.ufmg.br/prpq/>). The funders had no role in study

Abstract

An association between increased susceptibility to infectious diseases and obesity has been described as a result of impaired immunity in obese individuals. It is not clear whether a similar linkage can be drawn between obesity and parasitic diseases. To evaluate the effect of obesity in the immune response to cutaneous *Leishmania major* infection, we studied the ability of C57BL/6 mice fed a hypercaloric diet (HSB) to control leishmaniasis. Mice with diet-induced obesity presented thicker lesions with higher parasite burden and a more intense inflammatory infiltrate in the infected ear after infection with *L. major*. There was no difference between control and obese mice in IFN-gamma or IL-4 production by auricular draining lymph node cells, but obese mice produced higher levels of IgG1 and IL-17. Peritoneal macrophages from obese mice were less efficient to kill *L. major* when infected *in vitro* than macrophages from control mice. *In vitro* stimulation of macrophages with IL-17 decreased their capacity to kill the parasite. Moreover, macrophages from obese mice presented higher arginase activity. To confirm the role of IL-17 in the context of obesity and infection, we studied lesion development in obese IL-17R^{-/-} mice infected with *L. major* and found no difference in skin lesions and the leukocyte accumulation in the draining lymph node is reduced in knockout mice compared between obese and lean animals. Our results indicate that diet-induced obesity impairs resistance to *L. major* in C57BL/6 mice and that IL-17 is involved in lesion development.

Author summary

Obesity is a serious and increasing public health problem, and also induces a spectrum of metabolic disorders. Some diseases are known to be more severe in the presence of obesity. However, the interactions of obesity with the immune response to infectious agents

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

have not been fully explored. In this study, we investigated the response of obese mice to infection with *Leishmania major*. C57BL/6 mice were fed a hypercaloric diet (HSB) and infected afterward with *L. major*. In obese mice, lesions were ticker and more ulcerative, and cells from draining lymph nodes produced more IL-17 when compared with cells from lean mice fed a control diet. Macrophages from obese and lean mice were infected *in vitro* and stimulated with IL-17 to test the role of this cytokine in effect produced by obesity. Macrophages from obese mice were more infected by *L. major* than the macrophages from control mice and the number of parasites was increased by treatment with IL-17. IL-17R deficient mice treated with hypercaloric diet showed no difference in lesion size when compared to mice fed control diet. Our findings suggest that diet-induced obesity decrease the resistance to *L. major* infection of C57BL/6 mice and the IL-17 cytokine may be involved in the lesion formation.

Introduction

Obesity is characterized by excessive fat accumulation, and it is considered a multifactorial chronic disease that has increased over the last decades. It is associated with a metabolic syndrome that includes insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and hypertension, and also leads to respiratory diseases, hepatic steatosis, polycystic ovary syndrome, infertility, cancer, stroke, osteoarthritis [1].

Metabolic syndrome and co-morbidities associated with obesity occur in an environment characterized by the presence of chronic low-grade inflammation [2,3]. The link between obesity and inflammation started in the early 1990s when researchers demonstrated that TNF- α expression was elevated in adipose tissue from obese individuals and it was related to insulin resistance [4]. Since then, many studies have correlated obesity with inflammation, characterized by macrophage accumulation in adipose tissue [5,6] decrease in dendritic cell (DC) and natural killer cell (NK) functions [7,8]. In addition, obesity alters the profile of T cells in adipose tissue [9]. While T helper 1 (Th1) and CD8+ T-cells are increased in the adipose tissue of obese animals [6], regulatory T cells are reduced [10,11]. These alterations in immune cells may cause alterations in immune responses in obese individuals. However, it is unclear whether inflammation associated with obesity impacts in the immune response to infectious diseases.

It has been shown that obesity increases the susceptibility to infection by different agents such as influenza virus (H1N1) [12], *Helicobacter pylori* [13] and *Staphylococcus aureus* [14]. Karlsson and coworkers showed that obese mice infected with the H1N1 virus had increased inflammation, characterized by higher production of TNF- α and IL-6. Nevertheless, these animals had a poor memory CD8+ T-cell response and were more susceptible to infection [15]. Overweight and obese individuals also had a defective immune response to H1N1 viral infection [16].

Other studies have addressed the effect of obesity on parasite infections. There is a positive correlation between obesity and increased incidence of *Toxoplasma gondii* infection [17]. Interestingly, diet-induced obesity in C57BL/6 mice was protective in a model of cerebral malaria [18]. Hypothalamic obesity in C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA resulted in decreased parasitemia, but exacerbated inflammation, and increased mortality rate [19]. Leptin-deficient obese mice (ob/ob mice) are also more susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection [20,21]. Sarnágliá showed that diet-induced obesity promoted susceptibility to visceral leishmaniasis followed by higher production of pro-inflammatory cytokines and increased parasite load [22].

In spite of these studies on obesity and parasite infection, the interactions of obesity with leishmaniasis are still poorly understood. Resistance to *Leishmania major* infection is well characterized in C57BL/6 mice. Induction of an early Th1 response is necessary to induce resistance. Initial activation of dendritic cells leads to the production of IL-12 [23] that promotes a Th1 response with high levels of IFN-gamma and TNF-alfa production, and low levels of IgG1 antibody secretion. The establishment of this polarized inflammatory environment activates the expression of iNOS and NO production in macrophages, which has leishmanicidal activity [24,25]. This is a well-established model of resistance to infection. Therefore, we decided to investigate if obesity would interfere in the outcome of cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice.

Our results showed that obesity did not affect the development of a Th1 response, nor trigger a Th2 response. However, obese mice were more susceptible to infection. Moreover, the increased IL-17 production found in obese mice in response to infection was not able to control *Leishmania* growth, suggesting that this cytokine could be one reason for parasite growth. Our findings with mice that lack the receptor for IL-17 (IL-17R^{-/-}) indicate that this interleukin is important for the inflammation and control of *L. major* infection C57BL/6. The increased inflammation with higher IL-17 production provides one mechanism for the increased susceptibility of obese mice to *L. major* infection. Our results bring new insights into the interactions between immune response and obesity in animals facing a parasite infection with possible implications for the clinical outcome of leishmaniasis during obesity.

Methods

Animals and diet-induced obesity

All experiments were performed using six-eight-week-old female C57BL/6 mice, weighting approximately 18g, and obtained from the Animal Facility at the Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, UFMG—Belo Horizonte, Brazil). IL-17 receptor-deficient mice C57BL/6 background (IL-17R^{-/-}) were generated according to <http://transgenose.cnrs-orleans.fr/eng/taam/lignees/caracLignees.php?l=1346#top> and purchased from Centro de Criação de Camundongos Especiais Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-Ribeirão Preto). All animals were maintained in the Experimental Animal Facility of the Laboratório de Imunobiologia in collective cages (5 animals/cage) in an environmentally controlled room with a 12-hour light/dark cycle, controlled temperature (28°C) and unlimited access to water and food. The obesity was induced with high sugar and butter diet (HSB, calories are 36% from carbohydrates and 48% from lipids), given *ad libitum* to the mice [11]. Other components of the diet were identical to avoid any nutritional deficit in the HSB mice. HSB diet and the control diet (AIN93G) were prepared as described by Reeves, 1993 [26].

Ethics statement

Procedures and manipulation of animals followed the guidelines of the ethics committees in research of Universidade Federal de Minas Gerais in agreement with guidelines of the ethics committees in research from Brazilian Federal Law #11794, October 8th, 2008: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. All animal protocols were approved by the Committee on Animal Experiments (CETEA) under the protocol 338/2012, and it was approved in 01/10/2013.

Experimental design

Mice were randomly divided into two groups: control (fed AIN-93G) and obese (fed HSB). Animals were fed the same diet throughout the experiment. On the 4th week of diet

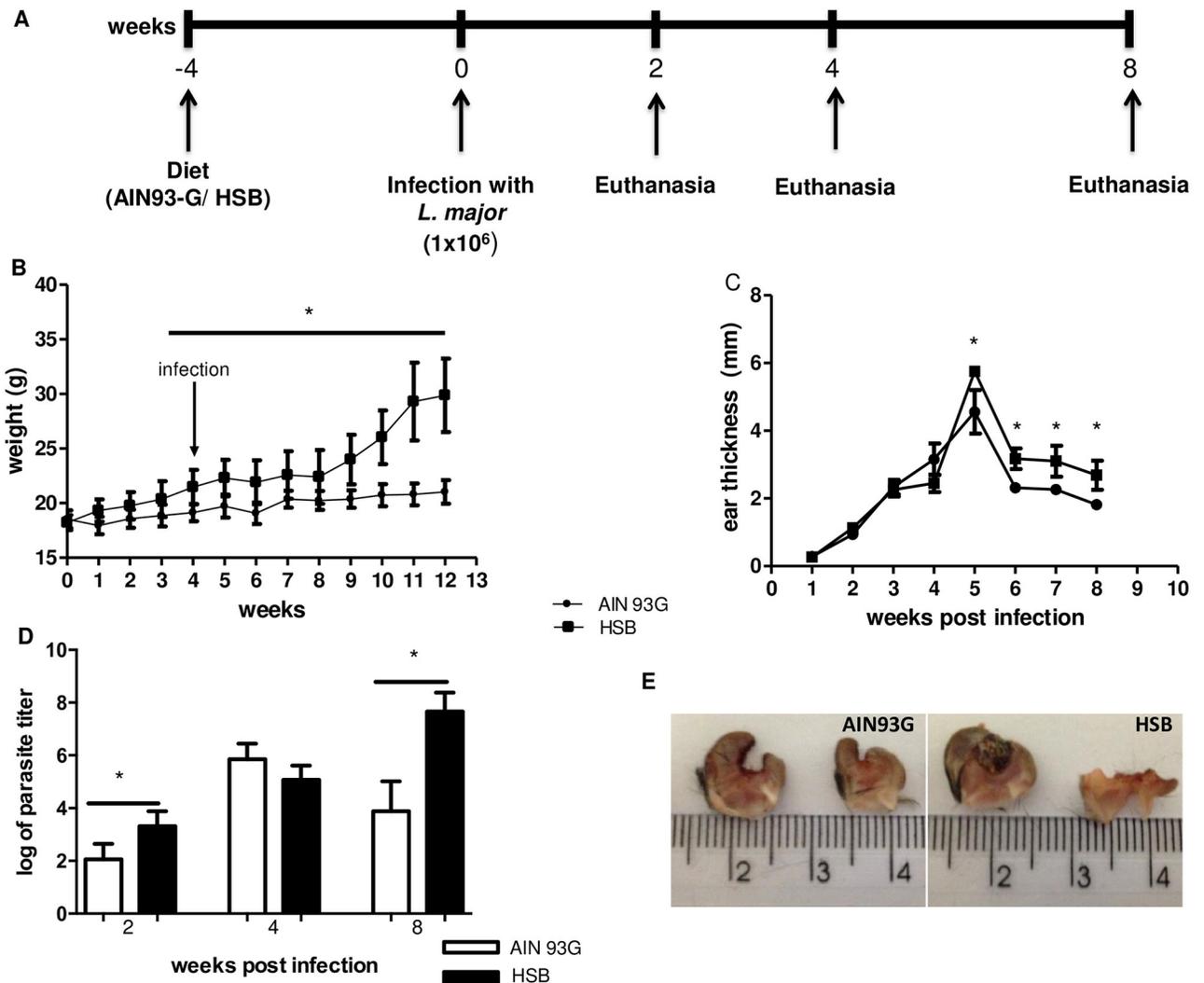


Fig 1. Experimental design and course of infection in diet-induced obese C57BL/6 mice. Animals were fed control (AIN93-G) or hypercaloric (HSB) diets *ad libitum* for four weeks. On the fourth week mice were infected with 1×10^6 metacyclic *L. major* in the ear. Weight gain and food intake were measured weekly. (A) Experimental design. (B) Weekly measurement of C57BL/6 body weight. (C) Weekly measurement of infected ear thickness during eight weeks of infection. (D) Parasite titer in the infected ear, measured by limiting dilution. Data are represented as average \pm SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). Results are representative of at least 4 independent experiments, $n = 4$ mice/group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g001>

consumption, mice were infected with 1×10^6 metacyclic promastigotes of *Leishmania major*. Infection was followed for 8 weeks. Body weight, lesion size, fasting glycemia, LDL cholesterol and triglycerides levels were measured weekly during this period. Animals were euthanized on the second, fourth and eighth weeks post-infection (Fig 1A).

Parasites, infection, and antigens

Leishmania (Leishmania) major (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) were maintained in Grace's medium (GIBCOBRL—Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA), pH 6.2 supplemented with 20% of fetal bovine serum (GIBCO), 20 μ g/mL gentamicin sulfate (Schering-Plough—Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and 2mM L-glutamine (GIBCOBRL—Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA) (supplemented Grace's), at 25°C. The metacyclic promastigote

forms were separated by Ficoll gradient (Ficoll 400, Sigma-Aldrich, INC., St Louis, MO, USA) at day 5 of culture. In a 15 mL conical tube, we added 2 mL of Ficoll 20%, then 2 mL of Ficoll 10%, without homogenizing the two solutions, forming two distinct phases (Ficoll gradient). Finally, the *Leishmania* suspension was added by carefully flowing through the wall of the tube forming the third phase. This three-phase mixture was centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. The ring formed and all the supernatant above it, corresponding to the 10% Ficoll and *Leishmania* phases in PBS, were collected with a Pasteur pipette. In another tube, 10 mL of PBS was added to the supernatant and the suspension was centrifuged at 1500 x g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet was recovered in 2 mL of PBS. A 1:100 diluted aliquot was withdrawn in PBS containing 4% formalin and the number of parasites was counted in Neubauer's chamber. Parasites (1×10^6) were inoculated intradermally in the left ear of each animal (final volume = 10 μ l). Lesion development was monitored weekly by the difference in thickness between infected and uninfected ears, as measured by a digital caliper (Starrett 727, Starrett, Itu, Brazil).

The number of parasites was estimated by limiting dilution as described previously [27]. Briefly, mice were euthanized and the whole ear was removed and cleaned in 70% alcohol. Ears were fragmented with scissors and grinded in a glass tissue grinder. Tissue debris were removed by centrifugation at 50 g for 1 min and the supernatant was transferred to another tube and centrifuged at 1,540 g for 15 min. Pellet was resuspended in 0.5 mL supplemented Grace's medium. The parasite suspension was then serially diluted in 10-fold dilutions in duplicates to a final volume of 200 μ l in 96-well plates. Pipette tips were replaced for each dilution. Plates were incubated for 10 days at 25°C and examined under an inverted microscope. Results were expressed as the \log_{10} of the last dilution in which parasites were detected in 96 wells plates.

Leishmania antigen was obtained from logarithmic phase cultures of *L. major* promastigotes. Promastigotes were washed twice in PBS and pellets were submitted to seven cycles of freezing in liquid nitrogen followed by thawing at 37°C. The preparations were visually inspected for the presence of intact parasites. The protein content of preparations was assayed by the Lowry method [28] and adjusted to 1 mg/mL protein. Antigen preparation was aliquoted and stored frozen at -20 °C.

Histology

Ear samples from the injected sites were collected and fixed in 80% methanol and 20% dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany), embedded in paraffin, cut into 3–5- μ m sections and stained with hematoxylin-eosin (H&E-staining) for microscopic analysis. Images were taken with an optical microscope and are shown at 100x magnification.

Glycaemia and LDL measurement

To access glycemia, animals fasted for 6 hours and blood was collected from the tail vein. Blood glucose was measured with a glucometer and strips (Accu—Chek Performa). To perform the oral glucose tolerance test (OGTT), glucose was given by gavage (2 g/kg). Measurements were performed with a glucometer and strips (Accu—Chek Performa) before glucose gavage and at 15, 30, 60 and 90 minutes later. For fasting glucose and LDL cholesterol measurements, animals fasted for 6 hours and blood was collected. The glycemia and LDL cholesterol levels were measured by enzymatic kit according to the manufacturer's protocol (Bioclin, Quiabasa, MG, Brazil).

Lymph node cell isolation and adipose tissue processes

Single-cell suspensions were prepared from draining auricular lymph nodes of the infected ear harvested at 2, 4 or 8 weeks after infection. Cells were placed in tissue culture plates and adjusted to a concentration of 5×10^6 cells/mL in RPMI Medium 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) containing 10% of FCS, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercapto-ethanol, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL fungizone, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM essential amino acids and 25 mM Hepes. They were stimulated with 50 μ g/mL *L. major* antigen. After 72 h, supernatants were harvested and IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-17 were measured by ELISA as described. To measure cytokines from adipose tissue, extracts were prepared after collected the peritoneal adipose tissue, then they were washed with PBS and weighed, for each 100 mg of tissue, 1 mL of cold phosphate buffer containing 0.5% BSA and protease inhibitors were added. Extracts were obtained by homogenizing tissues with an electrical tissue homogenizer. Tissue samples were then centrifuged at 3500 g for 15 min, and supernatants were collected and stored at -20°C until use. Cytokines were measured as described elsewhere.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for cytokines and antibodies

Cytokines were measured in the lymph node cells supernatants and also in adipose tissue extracts. Leptin was measured in the sera. For measurement of cytokines and leptin, plates were coated (50 μ L/well) with monoclonal antibodies solution against IFN-gamma (Cat#: 900-TM98), TNF- α (Cat#: 900-M54), IL -4 (Cat#: 900-M49), IL -10 (Cat#: 900-K53) and IL -17 (Cat#: 900-K392) (PeproTech, NJ, US) and leptin (Cat#: DY498) (R&D Systems MN, US), diluted in PBS and kept overnight, at room temperature. The enzymatic reaction was revealed by incubating the plates with a solution containing 0.2 μ L/mL of H₂O₂ and 0.5 mg/mL ABTS ((C₁₈H₁₆N₄O₆S₄-(NH₄)₂) (Sigma-Merck, Germany) in 0.1 M citrate buffer pH 5.0 for the development of a dark green color. After this stage, the reactions were stopped by addition of 20 μ L/well of a solution of SDS 1%. All protocols are developed according to manufactures protocol. The absorbance (λ 405 nm) of each well was obtained by an automatic ELISA reader (Molecular Devices Spectra MAX340).

Anti-leishmania antibodies ELISA

After mice have received anesthesia, blood was collect and sera were separated by blood centrifugation, and the levels of specific antibodies were detected by capture ELISA using plates coated with 200 μ g/mL total *L. major* antigen (MaxSorp; NUNC, Rochester, NY, USA). For immunoglobulin detection, specific anti-mouse biotinylated antibodies against mouse IgG, IgG1, IgM and IgG2a were used (PharMingen). For IgG sera were diluted 1:100, for all others sera were diluted at 1:10.

Macrophage culture

Thioglycolate (2%) solution was injected in the animal's peritoneum, after 8 weeks on diet, to induce macrophage recruitment. Peritoneal exudate cells were obtained after 72 hours. The collected macrophages were incubated in a 24 well plate onto glass coverslips at the concentration of 1×10^5 cells/mL. Cells were incubated for 2 hours for adhesion. Then they receive the stimulus to prime the macrophages before infection. Cells were stimulated with 1 ng/mL of IFN-gamma, 1 ng/mL of IL-4, 1 ng/mL of IL-17, or 100 ng/mL of LPS. One hour after they received 5:1 total *L. major* in the stationary phase per macrophage, without opsonization. *In vitro* infection was analyzed by optical microscopy 4, and 72 hours post infection after instant glass coverslip staining (Panótico, Laborclin, PA, Brazil). The following parameters were

analyzed: percentage of infected cells; amastigotes inside infected cells and infection index (percentage of infected macrophages divided by total amastigotes inside cells). For each mice 300 macrophages were counted, then the percentage of infected macrophages and also the number of amastigotes inside the macrophage. For nitric oxide (NO) and arginase activity, cells were incubated in 96 well plates (1×10^6 cells/mL) and infected with 5:1 *L. major*. The supernatant was collected for NO measurement at 72h post-infection, as well as arginase activity.

Nitric oxide (NO) assay

Supernatants of macrophage cultures were collected 72h post *in vitro* infection. Nitric oxide production was measured as nitrite in culture supernatants using the Griess' reaction [29].

Arginase activity

Arginase activity in homogenates of infected macrophages was assayed as described previously [30] with few modifications. About 35 μ L macrophage homogenate was incubated in 24-well plates with 50 μ L Triton X-100 and plates were shaken for 30min. Arginase was activated with 50 μ L $MnCl_2$ (10 mM) and 50 μ L of TRIS-HCl (50 mM, pH 7.5) at 55°C for 10 min. Then, 50 μ L samples were transferred to a fresh 24-well plate containing 25 μ L of L-arginine (0.5 mM, pH 9.7) and incubated for 60 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 400 μ L of a mixture of acids and water $H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O$ (1:3:7). Subsequently, 25 μ L of 9% 1-phenyl-1,2-propanodione-2-oxime in ethanol was added and the plates were incubated at 95°C for 45 min for color development. Reaction mixtures were read at 540 nm in a spectrophotometer (Molecular Devices). One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of urea/min. A standard curve was performed using urea and the detection limit for the assay was 270 μ M of urea.

Flow cytometry analysis of leukocytes in auricular draining lymph node

Auricular draining lymph nodes were collected, and the cells were homogenized and stained with anti-CD45-APC-cy7 or their isotype control antibodies (BD Pharmingen) diluted in PBS containing 1% BSA. Cells were fixed in 4% formaldehyde, and at least 50,000 events were acquired using a FACSCan (Becton & Dickinson) equipment, and data were analyzed by FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA) and converted to absolute number according the counting of total alive cells.

Statistical analysis of the data

Data were initially analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test to verify normal distribution. Since all data were normally distributed, the Student's *t*-test was used to compare groups. For the statistical analysis in the IL-17R^{-/-} mice we performed one-way ANOVA. The significance level of $p < 0.05$ was adopted.

Results

Obesity was associated with larger lesion and higher parasite burden

C57BL/6 mice showed significant weight gain by the 4th experimental week. Obese mice presented a significant increase in body weight when compared to the control group (Fig 1B). The weight gain persisted until the end of the study whereas the control mice reach a plateau at the 6th week. We also confirmed the presence of metabolic syndrome in HSB-fed mice by their

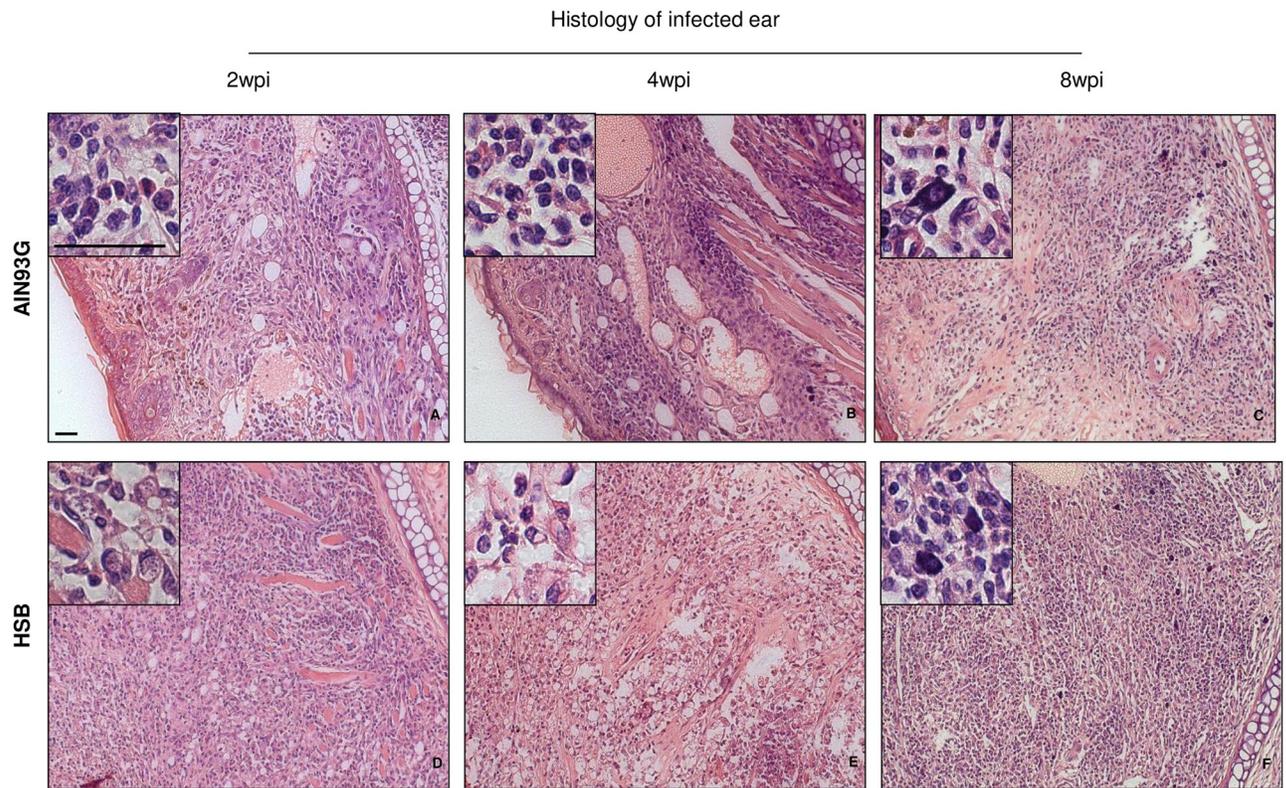


Fig 2. HSB diet-induced obesity leads to a more severe inflammatory reaction in the infected ear. Representative photomicrographs of ear histological sections from C57BL/6 mice submitted to HSB and AIN93-G diets and infected with *L. major*. (A, B and C) photomicrography from control mice 2, 4 and 8 weeks post infection. The cellular infiltration is predominantly polymorphonuclear (Insert in A, B), focal and discrete to moderate infiltration in the papillary dermis and deep dermis accompanied by mild to moderate thickening of the dermis; erosion and ulceration of the epidermis, predominantly polymorphonuclear inflammatory process with discrete mast cell hyperplasia (Insert in C) and thickening of the dermis, moderate to severe at eight weeks post infection. (D, E and F) photomicrography from HSB-fed mice 2, 4 and 8 weeks post infection. Ulcerated epidermis, predominantly polymorphonuclear and focal inflammatory process in the dermis and hypodermis, with thickening of the dermis, both of intense character, and tissue parasitism (Insert in D) in animals belonging to the obese group, 2 weeks post infection; moderate thickening of the dermis and inflammatory infiltrate also moderate, predominantly polymorphonuclear (Insert in E) and focal, in the papillary dermis, deep dermis and hypodermis 4 weeks post infection; ulcerated epidermis, predominantly polymorphonuclear and focal inflammatory process in the dermis and hypodermis with thickening of the dermis, both moderately characterized with moderate mast cell hyperplasia (Insert in F), 8 weeks after infection. Hematoxylin-Eosin. Bar in the normal image = 25mm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g002>

high levels of blood glucose, altered glucose tolerance test, high serum levels of LDL cholesterol, triglycerides, and leptin (S1 Fig).

In order to detect the effects of obesity on the course of infection with *L. major*, C57BL/6 mice were infected in the left ear with metacyclic promastigotes, 4 weeks after the HSB-diet consumption. Ear thicknesses in obese mice were significantly higher than in control mice from the fifth-week post infection (Fig 1C). Parasite burden was also checked 2, 4 and 8 weeks post-infection. Two weeks post-infection and eight weeks post infection obese mice presented higher parasitism (Fig 1D). At 8 weeks after infection, obese mice presented a more ulcerative lesion with extensive necrosis and tissue damage when compared to the control group (Fig 1E). Histological analysis of ear samples showed differences in the inflammatory profile of the lesions between obese and control mice. Control mice showed less inflammatory infiltration at all times post-infection analyzed (Fig 2A, 2B and 2C) comparing to obese mice at the same time points (Fig 2D, 2E and 2F). It is also important to note that there are visible parasites only in the tissue from obese mice (inserts—Fig 2D and 2E). At 8th-week post-infection, obese mice

presented greater cellular infiltrate, including polymorphonuclear cells, and mast cell hyperplasia (Fig 2F).

Obesity induced increased production of *L. major* specific IgG1

In the 8th week of infection, obese mice presented higher levels of specific circulating IgG, IgG1 and IgG2a, when compared to the levels found in mice from the control group (Fig 3A, 3C and 3D). Serum IgM levels were higher in obese mice only on the 4th week. There was an increase in total IgG, IgG1 and IgG2a levels on the 8th week of infection in obese mice when compared to their control counterparts suggesting that increased antibody production during obesity may be associated with a lower efficiency to kill *Leishmania*.

Obese C57BL/6 mice showed no impairment in IFN-gamma production but had increased IL-17 production by auricular draining lymph node cells

Both control and obese mice produced equivalent levels of IFN-gamma by cells from auricular draining lymph node (Fig 4A). The same result was observed for TNF-alfa (Fig 4B). These data

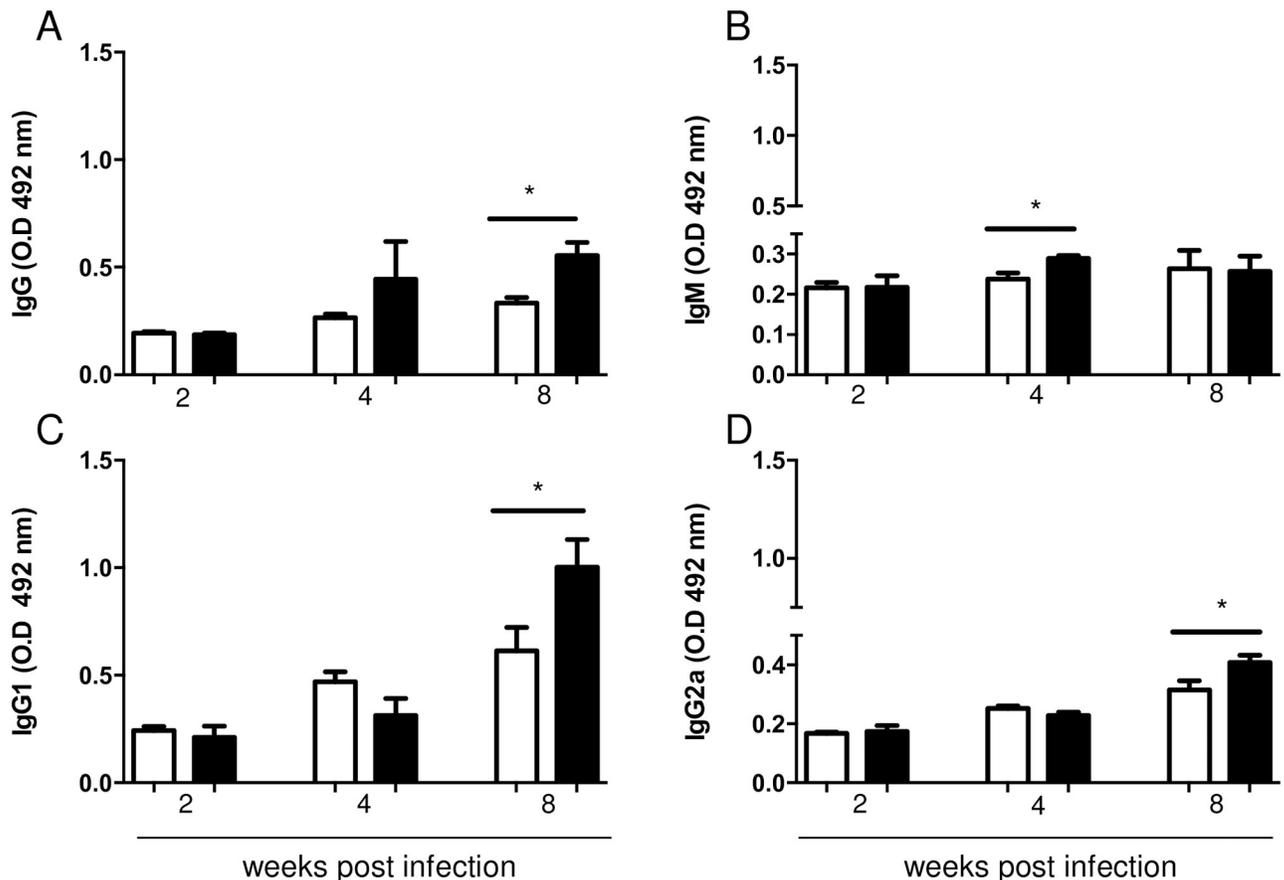


Fig 3. Diet-induced obesity increases the concentration of *L. major* specific immunoglobulins in C57BL/6 serum. Total IgG (A), IgM (B), IgG1 (C) and IgG2a (D) were measured in sera from mice fed control (AIN93G) and hypercaloric (HSB) diet. ELISA was performed at 2, 4 and 8 weeks of infection. For sensitization, *L. major* antigen at 20 µg/mL was used. To measure IgG, sera were diluted 1:1000, and 1:100 for IgG1, IgG2a and IgM. Data are represented as average ± SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test (**p* < 0.05; ***p* < 0.005). Results are representative of at least two independently experiments, n = 4 mice/group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g003>

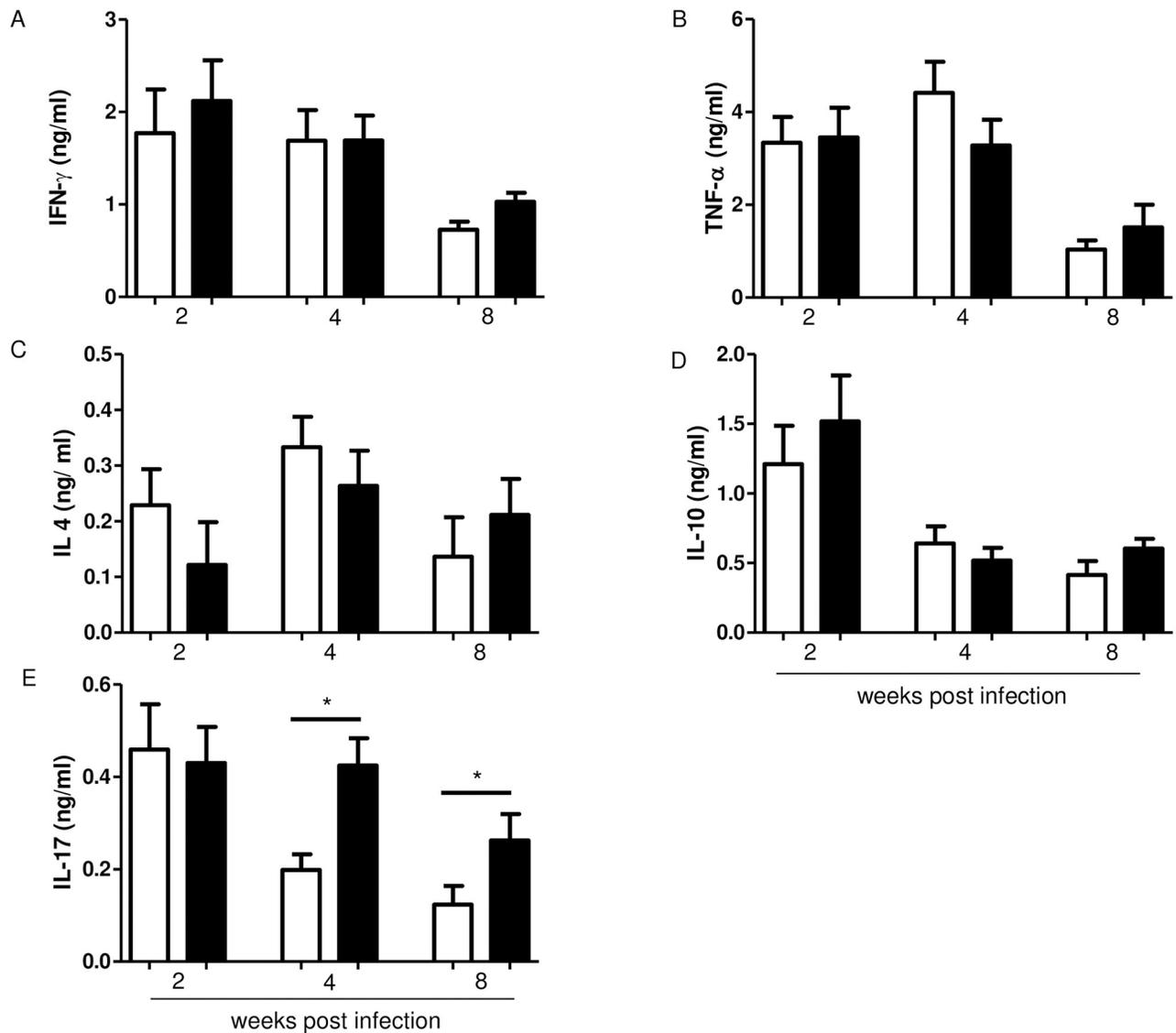


Fig 4. Cytokine production by lymph node cells in culture. Cytokine concentrations were measured by ELISA in cell culture supernatants stimulated *in vitro* with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L. major* antigen. Cells were collected 2, 4 and 8 weeks after infection and adjusted for $5 \times 10^6/\text{mL}$ of culture and incubated during 72h. (A) IFN-gamma; (B) TNF- α ; (C) IL-4; (D) IL-10 and (E) IL-17. Data are represented as average \pm SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test (* $p < 0.05$). Results are representative of at least two independent experiments, $n = 4$ mice/group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g004>

suggest that the increase in parasite burden observed in obese mice was not related to a deficient Th1 response.

We also evaluated the production of IL-4, IL-10, and IL-17 in the supernatant of cultured cells from auricular draining lymph nodes of the infected ear. There was no difference in IL-4 or IL-10 production between obese mice and control mice (Fig 4C and 4D). Interestingly, IL-17 production was elevated on the second week post-infection in both groups. However, in obese mice, IL-17 levels stayed higher up to the 8th week of infection in obese mice, whereas it decreased in the control mice by the same time. Auricular lymph nodes cells from non-infected mice were stimulated *in vitro* with ConA, and we observed significantly increased concentrations only for IL-10 in the supernatants (S2 Fig).

Cytokine secretion in adipose tissue was also evaluated and no difference was found for IFN-gamma or IL-17. As expected, TNF-alfa levels were increased in adipose tissue from obese mice before infection. Two weeks after infection, TNF-alfa levels decreased, and there was no difference between control and obese mice at 4th and 8th weeks post infection. IL-10 production in adipose tissue also presented some differences between obese and control mice. In obese mice, IL-10 levels were higher before infection and four weeks after infection (S3 Fig). IL-17 production is higher in obese mice at different organs, even without infection (S4 Fig).

Macrophages from obese mice had higher arginase activity and higher parasitism when infected *in vitro* with *L. major*

To evaluate the leishmanicidal capacity of macrophage from obese mice, we analyzed the degree of infection of macrophages at 4 and 72 hours post *in vitro* infection with *L. major*. At 4 hours post infection, macrophages from obese mice had a higher percentage of infected macrophages as well as a higher number of amastigotes per macrophage, and also a higher infection index when compared to macrophages from control mice (Fig 5A, 5B and 5C). Of note, *in vitro* infection was performed using non opsonized total promastigotes, and that could explain why we found fewer amastigotes 72h after infection than 4h post-infection [31]. At 72 hours post infection, macrophages from obese mice harbor more amastigotes than macrophages from control mice (Fig 5E), in both experimental situations, stimulated with IFN-gamma or with IL-17. To verify whether IL-17 would impair the killing of amastigotes *in vitro*, we stimulated the cultures with IL-17. Macrophages from control mice stimulated with IFN-gamma had a decrease in number of amastigotes, percentage of infected cells and also infection index, 72h post infection. In the obese macrophages, the IFN-gamma stimulus decreased the number of amastigotes, but not the percentage of infected cells or the infection index, and in the IL-17 stimulated wells macrophages from obese mice are similar with the no stimulated macrophages. Macrophages from control mice, when cultured *in vitro* with IL-17, had similar infection index and percentage of infected cells compered with no stimulated macrophages 72h post-infection, differently from when they were stimulated with IFN-gamma. These data suggest that IL-17 may interfere with parasite elimination. On the other hand, addition of IFN-gamma in the culture of macrophages from obese mice also decreased the number of amastigotes and the infection index, but not the percentage of infected cells.

We also investigated the production of NO and arginase activity by macrophages from obese mice. Macrophages from obese mice without any stimulus or stimulated with IFN-gamma and LPS produced slightly more NO than cells from the control group (Fig 5G). However, arginase activity was also higher in non-stimulated cells from the obese mice, as well as in cells infected with *L. major*. IL-4 stimulation did not increase arginase activity, but arginase activity remained higher in obese mice. Macrophages from obese mice also displayed higher arginase activity upon activation with IFN-gamma and LPS (Fig 5H). Therefore, our data suggest that obesity increases arginase activity in macrophages.

The absence of IL-17 receptor abolished the effect of obesity in the profile of *L. major* infection

To further characterize the role of IL-17, we fed IL-17R^{-/-} mice with HSB and AIN93G diet and infected them with *L. major*. The lack of signaling through the IL-17 receptor changed the effect of obesity in *L. major* infection. Wild type (WT) but not IL17R^{-/-} mice fed HSB diet gained weight when compared to IL-17R^{-/-} and WT mice fed control diet (Fig 6A). Furthermore, HBS fed and AIN93G fed IL-17R^{-/-} mice presented a similar course of infection shown by their lesion development (Fig 6B and 6E). Interestingly, at the 8th week of infection

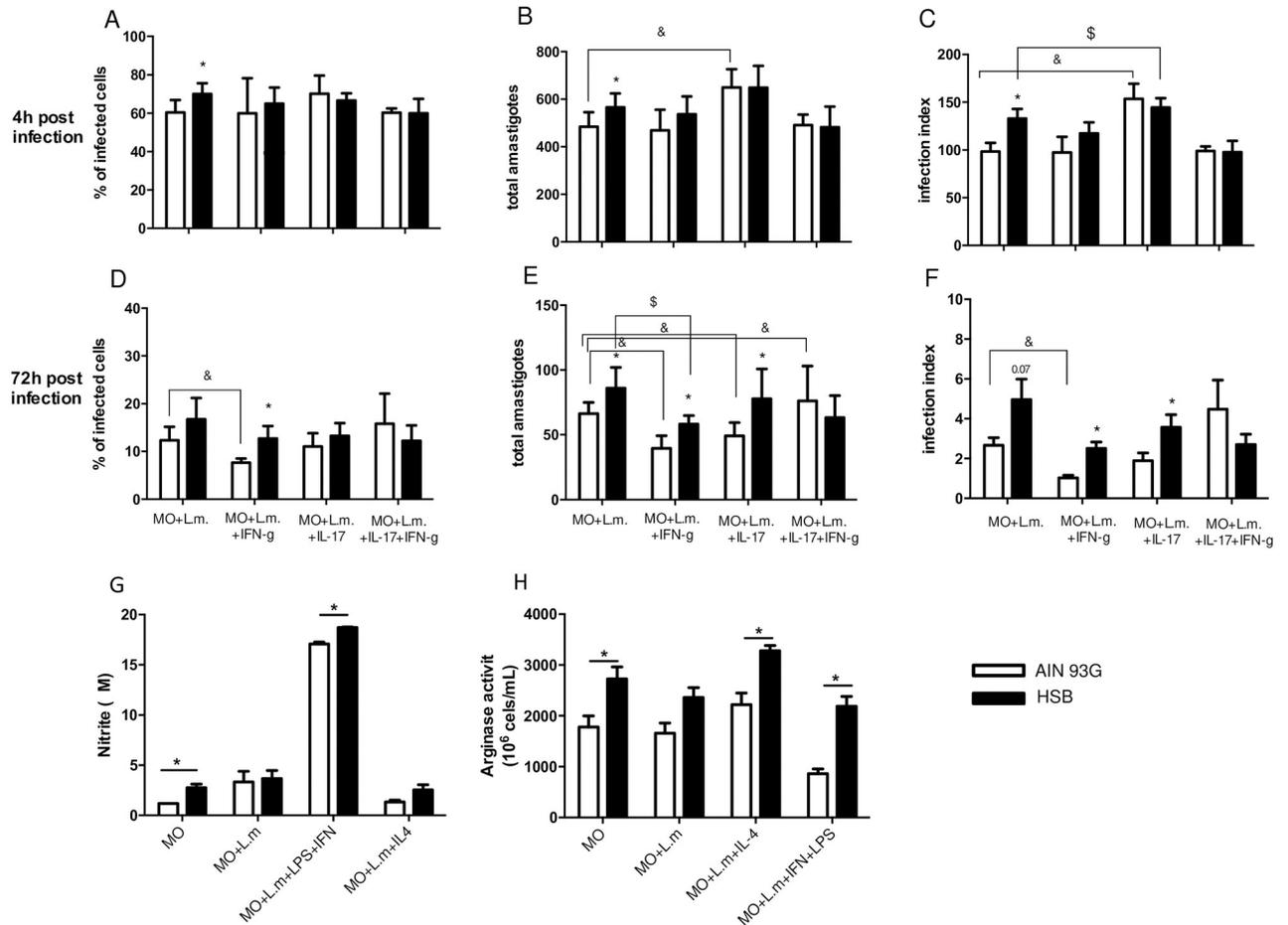


Fig 5. *In vitro* macrophage infection. To measure the percentage of infected macrophage (MO) and the amastigote number in infected MO, cells were collected from the peritoneal cavity after thioglycotate stimulation and cultured at 1×10^5 /ml. The infection was performed with 5 total non opsonized promastigotes of *L. major* per MO 24h after adhesion. Parasite counts were performed at 4 and 72 hours post infection. Arginase and NO were measured 72h after infection, as described in Materials and Methods. (A and D) Percentage of infected MO; (B and E) Amastigote number per infected MO and (C and F) Infection index $[(MO \times 100 / \text{infected MO}) \times (\text{amastigotes} / \text{infected MO})]$; (G) NO production; and (H) Arginase activity. Data are represented as average \pm SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test (*) means $p < 0.05$ between MO from control mice versus obese mice; (&) means $p < 0.05$ comparing MO from control group without stimulus and with different culture conditions and (§) means $p < 0.05$ comparing MO from obese group without stimulus and with different culture conditions. $n = 6$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g005>

IL17R^{-/-} mice had similar parasite burdens regardless of the diet they were fed (Fig 6C). In concert with the similarity in lesion size (Fig 6B), IL-17R^{-/-} mice did not show increased accumulation of CD45⁺ cells (leukocytes) in auricular draining lymph nodes (Fig 6D), suggesting that IL-17 signaling was needed for the increase in lymph node leukocyte numbers and for lesion formation during obesity. Both HBS fed and AIN93G fed IL-17R^{-/-} mice showed non-ulcerative and non-necrotic lesions at the 8th week post infection (Fig 6E).

Discussion

The impact of obesity in the immune response to cutaneous leishmaniasis has never been described. Our results showed that C57BL/6 mice with diet-induced obesity present larger lesions than control lean mice, and these lesions contained more parasites. We observed no difference in IFN-gamma, IL-4 and TNF-alfa production by cells from the auricular draining

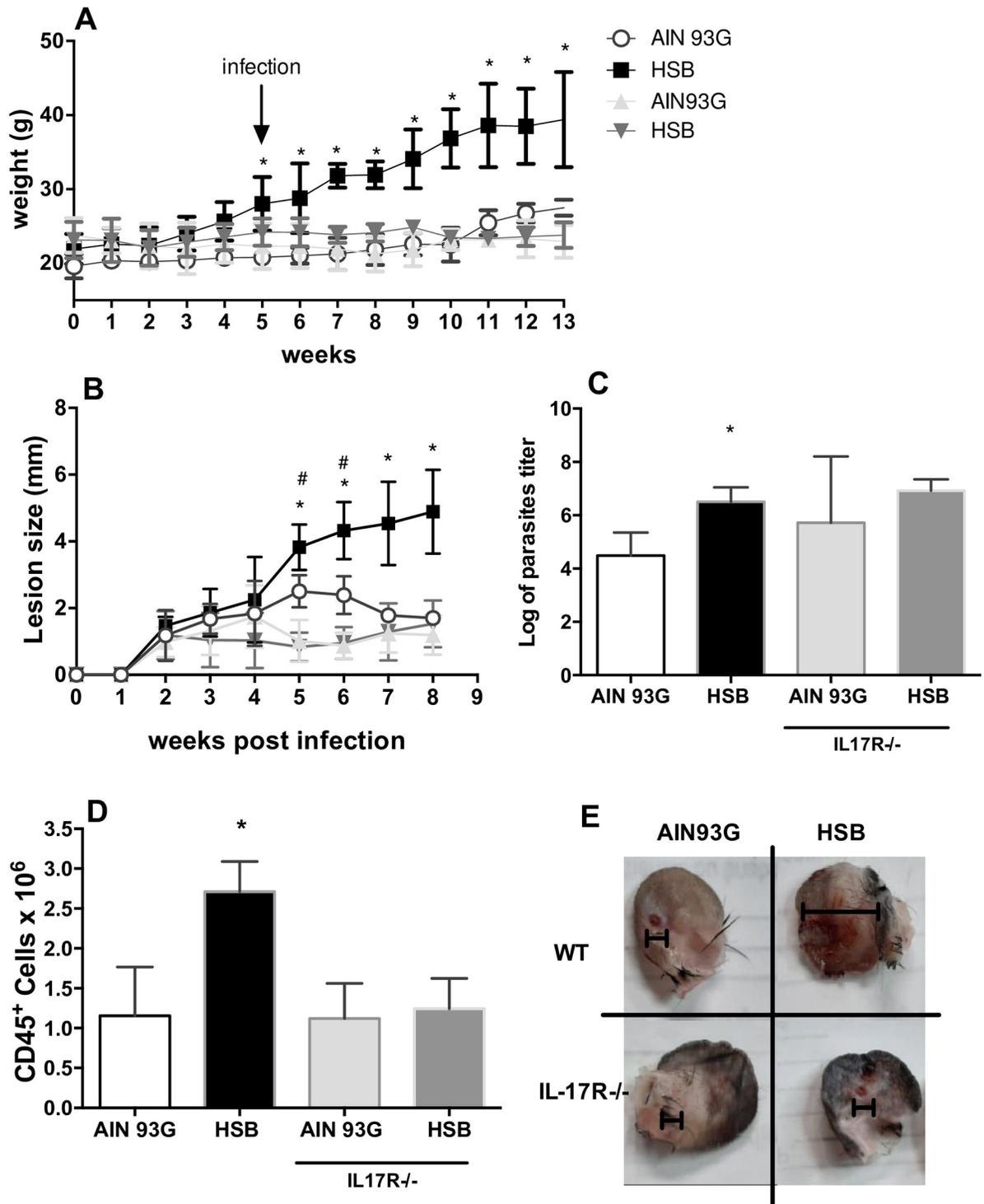


Fig 6. HBS fed IL-17R^{-/-} mice do not show difference in *L. major* infection profile compared with control AIN93G fed mice. Wild type and IL17R^{-/-} C57BL/6 mice were fed either control (AIN93G) or hypercaloric (HSB) diets *ad libitum* for four weeks. On the fifth week mice were infected with 1x10⁶ metacyclic *L. major* in the ear. (A) Weekly measurement of body weight. (B) Weekly measurement of infected lesion during eight weeks of infection. (C) Parasite titer in the infected ear, measured by limiting dilution. (D) Absolute number of CD45⁺ cells in the draining lymph node. (E) Representative pictures of ears lesions of IL17R^{-/-} and WT at week 8 post infection. Data are represented as average ± SD. Statistical analysis was performed by Anova test (*p<0.05; **p<0.005). n = 4/ group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006596.g006>

lymph nodes of these mice, but there was an increase in the levels of IL-17. Moreover, peritoneal macrophages from obese mice were less efficient in killing amastigotes than macrophages from control mice, and addition of IL-17 to macrophage cultures decreased their ability to control infection compared with ones stimulated with IFN-gamma. To further clarify the role of IL-17 in this process, we fed IL-17 receptor-deficient C57BL/6 mice with either hypercaloric HBS or control AIN93G diet, and infected them with *L. major*. Interestingly, obese IL-17R^{-/-} did not have augmented lesions, but presented high parasite load, and no difference in infection was observed between HBS fed or AIN93G fed mice.

There is a gap in understanding how obesity affects the course of intracellular infections, including parasite infections. In accordance with the negative association between obesity and infectious diseases already described [22,32,33], our study showed that obese mice had higher parasite burden than lean mice, failing to control parasite growth. In addition, lesions in obese mice were larger and more ulcerative than the lesion in the control group. Adipose tissue produces cytokines, adipokines, and chemokines which alter the immune response, affecting the recruitment of inflammatory cells, such as macrophages, neutrophils and dendritic cells [34]. It is known that obesity also affects T cell differentiation and function, increasing pro-inflammatory cytokine production [35,36]. Considering that obesity is associated with a “low-grade” inflammation, one reasonable hypothesis could be that in the specific case of cutaneous leishmaniasis, where macrophages require an inflammatory environment to control parasites, obesity would improve the immune response against *L. major*. However, our data do not support this hypothesis. The histological data also detected a higher parasite burden in obese C57BL/6 mice when compared to mice from the control group further indicating that obesity interferes with control of parasite growth. Interestingly, lesions in obese mice showed increased cellular infiltration; however, the inflammatory cells had poor ability to eliminate the parasites.

We also measured the antibody response to *L. major* in sera and found higher levels of IgG and IgG1 in obese C57BL/6 mice than control mice after eight weeks of infection. As described in previous studies, susceptibility to *L. major* infection is associated with isotype switching to IgG1 [37,38]. Antibody levels are directly related to parasite number, as antibodies may form immune complexes that bind to Fcγ receptors (FcγR), inhibiting the proinflammatory activity of macrophages, without impairing phagocytosis [39]. Interestingly, despite favoring phagocytosis, IgG fails to protect against *L. major*, and even worse, contributes to the pathogenicity itself [40]. Indeed, it has been reported that phagocytosis of IgG-opsonized amastigote forms induces the activation of signaling pathways leading to the production of IL-10 by macrophages [38].

To understand why obese C57BL/6 mice had more severe lesions than control mice, we also evaluated cytokine production. Obesity did not affect the production of IL-4 in C57BL/6 mice. This result differs from previous data that associate obesity with susceptibility to asthma and allergies, driven by higher IL-4 secretion and Th2 differentiation [41,42]. We also showed no difference in TNF-α and IFN-γ levels at the time points measured. Obese mice did not show overproduction of proinflammatory cytokines by cells from the draining lymph nodes. In response to parasite antigens, it was expected a higher production of pro-inflammatory cytokines by obese mice, as it was observed for infection with *Plasmodium berguei* [19] and also for infection with *Leishmania chagasi* [22].

The role of IL-17 in leishmaniasis has been a subject of debate. We found a higher IL-17 production by lymph node cells of obese mice, which presented a more severe lesion with higher parasite burden than the control group. Classically, IL-17 production is associated with neutrophil recruitment and often is related to pro-inflammatory response in various diseases, including autoimmune disorders [43], fungal [44] and bacterial infections [45]. However, recent studies have questioned whether IL-17 function is restricted to pro-inflammatory action

[46]. IL-17 is produced mainly by Th17 cells, which could be stimulated by a different combination of cytokines, including TGF- β , IL-6, IL-23 and IL-1 β [43]. Obesity alters the cytokine profile in adipose tissue and in serum, and IL-17 seems to have a significant role in obesity. Previous studies have shown that production of this cytokine is elevated in obesity, both in humans and mice [47,48]. In line with these reports, our results showed that cells from draining lymph nodes from infected obese mice secrete higher levels of IL-17. Studies on cutaneous leishmaniasis have correlated IL-17 release with increased pathogenicity in cutaneous leishmaniasis in mice [49,50]. Results obtained using mice IL-17R $^{-/-}$ showed that these mice had less severe lesions than wild type mice with lower numbers of leukocytes in the draining lymph nodes; however the parasite burden was as high as in obese WT mice, with no difference between HBS fed or AIN93 fed mice. Therefore, IL-17 seems to play a critical role in lesion and ulcer formation in obese mice during *L. major* infection.

We also performed *in vitro* infection of macrophages with *L. major* to assess the efficiency of macrophages from obese C57BL/6 mice to kill the parasites. There was an increased frequency of infected cells among macrophages from obese mice 4 hours post infection, and a larger number of amastigotes/cell in macrophages from obese mice 4 and 72 hours post infection. These results are in line with higher arginase activity detected in macrophages from obese mice. Interestingly, Sousa and coworkers found that IL-17 increases arginase activity, and favor parasite growth in BALB/c mice infected with *L. amazonensis* [51]. Arginase activity is increased in mice susceptible to cutaneous leishmaniasis, and this enzyme utilizes arginine as a substrate to induce polyamine production instead of NO [52]. Interestingly, studies on inflammatory bowel disease have demonstrated that IL-17 induces an alternative activated macrophages response. Moreover, IL-17KO C57BL/6 mice expressed lower levels of mRNA coding for molecules associated with alternative activated macrophages activity, including arginase 1 [53]. Another study showed that IL-17 induces arginase 1 production in a model of human Papillomavirus [54]. In this case, arginase 1 would be active in the macrophages in our experiments. Our *in vitro* results showed an environment where IFN-gamma would still be inducing the parasite control in obese macrophages. However, IL-17 production decrease, even a little, the leishmanicidal activity of macrophages from obese mice and could further facilitated parasite growth by increasing arginase activity.

To test the hypothesis that IL-17 would impair leishmania killing by macrophages, we infected macrophages stimulated *in vitro* with IL-17. IL-17 interfered with parasite elimination by macrophages from control and obese mice. Moreover, addition of this cytokine decreased parasite killing by control macrophages activated with IFN-gamma.

To further confirm our hypothesis, we performed an experiment with IL-17 receptor deficient mice. These mice did not show weight gain when fed HSB diet and no difference was observed between lean and obese mice infected with *L. major*. It was reported before that IL-17R $^{-/-}$ mice did not gain weight when fed a high fat diet because they developed an inflammatory reaction in the small intestine that allowed bacterial translocation [55].

It was already observed that IL-17-deficient BALB/c mice developed smaller lesions despite only a modest reduction in parasite loads [49] when infected with *L. major*, the same profile we observed in obese IL-17R $^{-/-}$ mice that controlled lesion sizes but not parasite burdens. It is not in the literature that the wound induced by *Leishmania ssp.* is not always related with parasite burden [56,57].

In the present work, we propose IL-17 as an alternative cytokine that may determine the fate of the lesion formation in response to *L. major* in mice that received hypercaloric diet. We showed that diet-induced obesity, a condition associated with IL-17 production, increased the susceptibility of C57BL/6 mice, a mouse strain genetically resistant to *L. major* infection.

Therefore, IL-17 could be a potential candidate to explain diverse comorbidities associated with obesity and its role in models of infection and ulcerated wound.

Taken together, our results showed that diet-induced obesity in C57BL/6 mice decreased their capacity to control infection by *L. major*. This might be related to the induction of IgG1 secretion, IL-17 production and impaired capacity of macrophages to control parasite growth. The present results provide novel clues about the relationship between obesity and leishmanial infection in a time when infection is now being added to the list of health risks associated with obesity.

Supporting information

S1 Fig. Metabolic evaluation in mice fed HSB diet before and after *L. major* infection. (A) Fasting glycaemia. (B) Glucose oral tolerance test performed eight weeks post infection. Mice were fasted for six hours and received a 30% glucose solution. Blood was taken at time 0 and 15, 30, 60 and 90 minutes after administration of the glucose solution. (C) Total blood cholesterol eight weeks post infection. (D) Serum leptin concentration measured by ELISA (8 weeks post infection and 12 weeks post diet consumption). Statistical analysis was performed by Student's *t* test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$). Data are represented as average \pm SD. Results are representative of at least 4 independently experiments, $n = 4$ mice/group. (TIF)

S2 Fig. Cytokine production by auricular lymph node cells in culture from non-infected mice. Cytokine concentrations were measured by ELISA in cell culture supernatants stimulated *in vitro* with $10\mu\text{g/ml}$ of ConA. Cells were collected and adjusted for $5 \times 10^6/\text{mL}$ of culture and incubated during 72h. Data are represented as average \pm SD. (A) IFN- γ ; (B) IL-4; (C) IL-10 and (D) IL-17. $n = 5$ mice/group. (TIF)

S3 Fig. Cytokine profile in the adipose tissue extract from C57BL/6 mice infected with *L. major*. The peritoneal adipose tissue extracts were prepared (100 mg/mL of buffer) and ELISA was performed to measure concentrations of IFN-gamma, TNF-alfa, IL-10, IL-17 and IL-4. (A) IFN-gamma; (B) TNF-alfa; (C) IL-10; (D) IL-17. IL-4 values were below the detection limit. Data are represented as average \pm SD. Statistical analysis was performed by Student's *t* test (* $p < 0,05$). Results are representative of at least two independently experiments, $n = 4$ mice/group. (TIF)

S4 Fig. IL-17 concentration in different organs without infection. Spleen cells were collected and stimulated *in vitro* with $10\mu\text{g/mL}$ of ConA 4 (A) and 12 (B) weeks after mice consume AIN93G or HSB diet. The peritoneal adipose tissue extracts (100mg/ml of buffer) were prepared 12 weeks after mice consume AIN93G or HSB diet (C) and serum were collected also 12 weeks after mice consume AIN93G or HSB diet (D). ELISA was performed to measure concentrations of IL-17. Data are represented as average \pm SD. $n = 4$ or 5 mice/group. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Ilda Marçal and Hermes dos Reis Ribeiro for her excellent care of the animal facility, and Maria do Carmo Dias for technical help. We thank Professor Simone Vasconcelos Generoso for providing the cytokines kits used.

Author Contributions

Conceptualization: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Tatiani Uceli Maioli.

Data curation: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Felipe Caixeta, Matheus Batista Carneiro, Grazielle Ribeiro Goes, Lícia Torres, Sara Cândida Barbosa, Leonardo Vaz, Nivea Carolina Paiva, Cláudia Martins Carneiro, Tatiani Uceli Maioli.

Formal analysis: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Matheus Batista Carneiro, Grazielle Ribeiro Goes, Leonardo Vaz, Nivea Carolina Paiva, Cláudia Martins Carneiro, Leda Quercia Vieira, Ana Maria Caetano Faria, Tatiani Uceli Maioli.

Funding acquisition: Tatiani Uceli Maioli.

Investigation: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Tatiani Uceli Maioli.

Methodology: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Felipe Caixeta, Matheus Batista Carneiro, Grazielle Ribeiro Goes, Lícia Torres, Leonardo Vaz, Nivea Carolina Paiva, Tatiani Uceli Maioli.

Project administration: Tatiani Uceli Maioli.

Supervision: Tatiani Uceli Maioli.

Writing – original draft: Vinicius Dantas Martins, Franciele Carolina Silva, Tatiani Uceli Maioli.

Writing – review & editing: Leda Quercia Vieira, Ana Maria Caetano Faria, Tatiani Uceli Maioli.

References

- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006/12/15. 2006; 444: 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485> PMID: 17167474
- Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med*. 2013/06/12. 2013; 19: 487–500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.05.001> PMID: 23746697
- Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*. 2008/11/26. 2008; 8: 923–934. <https://doi.org/10.1038/nri2449> PMID: 19029988
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-)*. 1993/01/01. 1993; 259: 87–91.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007/01/04. 2007; 117: 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881> PMID: 17200717
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; 15: 914–920. <https://doi.org/10.1038/nm.1964> PMID: 19633658
- O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L. Natural Killer Cells in Obesity: Impaired Function and Increased Susceptibility to the Effects of Cigarette Smoke. *PLoS One*. 2010; 5: e8660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008660> PMID: 20107494
- O'Shea D, Corrigan M, Dunne MR, Jackson R, Woods C, Gaoatswe G, et al. Changes in human dendritic cell number and function in severe obesity may contribute to increased susceptibility to viral infection. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37: 1510–1513. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.16> PMID: 23439322
- Gerriets VA, MacIver NJ. Role of T cells in malnutrition and obesity. *Front Immunol*. 2014; 5: 379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00379> PMID: 25157251
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009/07/28. 2009; 15: 930–939. <https://doi.org/10.1038/nm.2002> PMID: 19633656

11. Maioli TU, Goncalves JL, Miranda MC, Martins VD, Horta LS, Moreira TG, et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm Res*. 2015/12/10. 2016; 65: 169–178. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0902-1> PMID: 26650032
12. Nave H, Beutel G, Kielstein JT. Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 14–15. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70304-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70304-2) PMID: 21183146
13. Dhurandhar NV, Bailey D, Thomas D. Interaction of obesity and infections. *Obes Rev*. 2015; <https://doi.org/10.1111/obr.12320> PMID: 26354800
14. Park S, Rich J, Hanses F, Lee JC. Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Leprdb/Leprdb mice to infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2009; 77: 1008–1014. <https://doi.org/10.1128/IAI.00976-08> PMID: 19103772
15. Karlsson EA, Sheridan PA, Beck MA. Diet-induced obesity in mice reduces the maintenance of influenza-specific CD8+ memory T cells. *J Nutr*. 2010; 140: 1691–1697. <https://doi.org/10.3945/jn.110.123653> PMID: 20592105
16. Paich HA, Sheridan PA, Handy J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Hudgens MG, et al. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 influenza A virus. *Obesity (Silver Spring)*. 2013; 21: 2377–86. <https://doi.org/10.1002/oby.20383> PMID: 23512822
17. Reeves GM, Mazaheri S, Snitker S, Langenberg P, Giegling I, Hartmann AM, et al. A Positive Association between *T. gondii* Seropositivity and Obesity. *Front Public Heal*. 2013; 1: 73. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00073> PMID: 24400300
18. Robert V, Bourgooin C, Depoix D, Thouvenot C, Lombard M-N, Grellier P. Malaria and obesity: obese mice are resistant to cerebral malaria. *Malar J*. 2008; 7: 81. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-81> PMID: 18489748
19. de Carvalho RVH, Soares SMA, Gualberto ACM, Evangelista GCM, Duque JAM, Ferreira AP, et al. *Plasmodium berghei* ANKA infection results in exacerbated immune responses from C57BL/6 mice displaying hypothalamic obesity. *Cytokine*. 2015; 76: 545–548. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.025> PMID: 26239414
20. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhya R, Zhao D, Schwartz GJ, et al. Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J Infect Dis*. 2012/02/02. 2012; 205: 830–840. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir840> PMID: 22293433
21. Nagajyothi F, Zhao D, Machado FS, Weiss LM, Schwartz GJ, Desruisseaux MS, et al. Crucial role of the central leptin receptor in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis*. 2010; 202: 1104–1113. <https://doi.org/10.1086/656189> PMID: 20726767
22. Sarnáglia GD, Covre LP, Pereira FEL, De Matos Guedes HL, Faria AMC, Dietze R, et al. Diet-induced obesity promotes systemic inflammation and increased susceptibility to murine visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2016; 143. <https://doi.org/10.1017/S003118201600127X> PMID: 27440305
23. McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun*. 2002; 70: 3994–4001. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.3994-4001.2002> PMID: 12117904
24. Scott P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*. 1991/11/01. 1991; 147: 3149–3155. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1833466 PMID: 1833466
25. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933> PMID: 12415308
26. Reeves, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123: 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939> PMID: 8229312
27. Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*. 1993; 61: 2952–2959. PMID: 8514400
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265–275. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
29. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126: 131–138. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105>
30. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 1994; 174: 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2) PMID: 8083527

31. Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol.* 1989; 143: 617–22. PMID: [2525590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2525590/)
32. Nagajyothi F, Weiss LM, Zhao D, Koba W, Jelicks La, Cui M-H, et al. High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e3118. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003118> PMID: [25275627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25275627/)
33. Tanowitz HB, Scherer PE, Mota MM, Figueiredo LM. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? *Trends Parasitol.* 2017; 33: 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.008> PMID: [28007406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28007406/)
34. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia.* 2016; 59: 879–894. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3904-9> PMID: [26940592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940592/)
35. do Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. *Rev Bras Med do Esporte.* 2009; 15: 378–383. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922009000600012&nrm=iso
36. Yang H, Youm Y-H, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. 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.* 2010; 185: 1836–1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000021> PMID: [20581149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20581149/)
37. Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science (80-).* 1996; 271: 987.
38. Yang Z, Mosser DM, Zhang X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol.* 2007; 178: 1077–1085. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202371>
39. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. *J Exp Med.* 1998; 188: 217–222. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2525554/> PMID: [9653099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9653099/)
40. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 2005; 201: 747–754. <https://doi.org/10.1084/jem.20041470> PMID: [15753208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753208/)
41. Chen YP, Zhang JH, Li CQ, Sun QX, Jiang XH. Obesity enhances Th2 inflammatory response via natural killer T cells in a murine model of allergic asthma. *Int J Clin Exp Med.* 2015/12/03. 2015; 8: 15403–15412. PMID: [26629029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26629029/)
42. Raj D, Kabra SK, Lodha R. Childhood obesity and risk of allergy or asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014; 34: 753–765. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2014.07.001> PMID: [25282288](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25282288/)
43. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8: 950–957. http://www.nature.com/ni/journal/v8/n9/supinfo/ni1497_S1.html PMID: [17676044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17676044/)
44. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science (80).* 2011/02/26. 2011; 332: 65–68. <https://doi.org/10.1126/science.1200439> PMID: [21350122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21350122/)
45. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007/12/21. 2007; 51: 1139–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb04008.x> PMID: [18094532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094532/)
46. Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Marwaha, A. K., Leung, N. J., McMurchy, A. N., & Levings, M. K. (2012). TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Frontiers in Immunology*, 3, 129. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00129> *Immu. Front Immunol.* 2012/06/08. 2012;3: 129. PMID: [22675324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22675324/)
47. Luczynski W, Grubczak K, Moniuszko M, Glowinska-Olszewska B, Bossowski A. Elevated levels of Th17 cells in children with central obesity. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015/07/29. 2015; 75: 595–601. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1066845> PMID: [26216210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26216210/)
48. Endo Y, Asou HK, Matsugae N, Hirahara K, Shinoda K, Tumes DJ, et al. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep.* 2015/08/04. 2015; 12: 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.014> PMID: [26235623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235623/)
49. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009; 182: 3039–46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713598> PMID: [19234200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234200/)
50. Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003243. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003243> PMID: [23555256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555256/)

51. Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, Dos Santos LM, Vaz LG, et al. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2013/10/10. 2014; 36: 13–31. <https://doi.org/10.1111/pim.12078> PMID: 24102495
52. Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem.* 2004; 279: 23668–23678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402042200> PMID: 15023992
53. Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, et al. Interleukin-17 Induces an Atypical M2-Like Macrophage Subpopulation That Regulates Intestinal Inflammation. *PLoS One.* 2014; 9: e108494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108494> PMID: 25254662
54. Tran LS, Mittal D, Mattarollo SR, Frazer IH. Interleukin-17A Promotes Arginase-1 Production and 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Acute Hyperinflammation in Human Papillomavirus E7 Oncoprotein-Expressing Skin. *J Innate Immun.* 2015; 7: 392–404. Available: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000374115> PMID: 25720383
55. Pérez MM, Martins LMS, Dias MS, Pereira CA, Leite JA, Gonçalves ECS, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor axis elicits intestinal neutrophil migration, restrains gut dysbiosis and lipopolysaccharide translocation in high-fat diet-induced metabolic syndrome model. *Immunology.* 2019; 156: 339–355. <https://doi.org/10.1111/imm.13028> PMID: 30472727
56. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol.* 2000; 165: 969–977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.969> PMID: 10878373
57. Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol.* 1996; 157: 827–835. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752935>