

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

Franciele Carolina Silva

**ALTERAÇÕES IMUNO-METABÓLICAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 OBESOS  
INFECTADOS COM *LEISHMANIA MAJOR***

Belo Horizonte

2015

Franciele Carolina Silva

**ALTERAÇÕES IMUNO-METABÓLICAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 OBESOS  
INFECTADOS COM *LEISHMANIA MAJOR***

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

Orientadora: Liza Figueiredo Fellicori Vilela  
Co-orientadora: Tatiani Uceli Maioli

Belo Horizonte

2015

À vocês pai e mãe dedico esse  
trabalho com todo amor do mundo!

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos...

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém. Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente...

Achei que o sonho era audacioso demais... Pensei inclusive em projetá-lo em outros, mas enfim compreendi que o simples fato de tentar me tornaria diferente. Foi então que percebi que eu era capaz. O desejo de acertar me impulsionou e o medo de errar me fortaleceu. A compreensão de alguns me confortou e os obstáculos impostos por outros me desafiou. Dizer que o voo foi tranquilo e com ventos sempre a favor não posso, entretanto o apoio de todos me permitiu ir mais longe. Não faltaram grandes obstáculos, frequentes foram as cercas, ajudando a transpor abismos... As subidas e descidas foram realidade sempre presente, mas sobrava vontade de vencer. Hoje olho para trás e vejo quanta coisa aconteceu nesse período e o sentimento é comum: VALEU TUDO! Valeram as novidades, os conhecimentos obtidos, os prazeres e as dores, as pessoas que encontrei, as amizades que cultivei e das quais sempre recordarei.

Obrigada...

À Deus...

Minha eterna gratidão pela oportunidade de vivenciar esse momento, pela vida, saúde e perseverança. “ Provai, e vede que o senhor é bom; bem aventurado o homem que nele se refugia” SI 34:8

À professora Liza pela credibilidade e confiança.

À professora Tatiani por me mostrar o caminho e, ao mesmo tempo, me tornar segura para segui-lo. Como uma boa líder, me direcionou nas pesquisas e, como boa amiga, me doou valores preciosos: amizade, tempo e conhecimento. Você é muito especial! Adoro você! Muito obrigada!

Ao professor Marcelo Santoro (*in memoriam*) por me mostrar valores preciosos da vida. Em especial que competência e humildade podem andar juntas! Você sempre será um grande exemplo para mim.

Ao alunos de iniciação científica envolvidos nesse projeto, Vinícius Dantas e Felipe Caixeta pela grande ajuda nos experimentos, pela competência, precisão e interesse. Muito obrigada.

À professora Ana Caetano por abrir as portas do seu laboratório e por me acolher com tanto carinho e respeito. Muito obrigada.

Aos amigos do LIB pela convivência no laboratório e aprendizados ao longo desses anos. Em especial Sarah, Luiza, Luiz, Jú, Andrezza, Alice! Adoro vocês.

Ao Lab. de Gnotobiologia e Imunologia, em especial Prof. Leda, Grazi e Mateus, pelas culturas de *Leishmania* e por colaborarem com o nosso trabalho. Ao Caio pelas preciosas contribuições e por toda ajuda!

Aos amigos do Labin, Lana, Edenil, Paola e Penélope, pela valiosa e imprescindível contribuição na execução desse trabalho e pela disponibilidade em solucionar minhas dúvidas sempre! Vocês são muito especiais.

Aos amigos do laboratório de química de proteínas, em especial Anderson, Paulo, Guilherme, Jamil, Jacque, Mari e Livia pela amizade e pela ajuda nos experimentos!

À Ildinha e ao Hermes, pela carinho e cuidado com o biotério e com os animais.

Ao Deiber, meu amor e companheiro de todas as horas. Seu carinho, compreensão e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui! Amo você.

Ao Gabrielzinho fonte de inspiração para minha vida! Obrigada por me fazer acreditar que a vida vale a pena! Titia te ama muito.

Aos meus amados pais que muitas vezes renunciaram seus sonhos em favor dos meus! Minha eterna gratidão e carinho

Às minhas irmãs, Fabiana, Juliana e Fernanda por me ensinarem o que amar de verdade! O amor que nos une supera e transcende a vida terrena! Fernanda você se faz presente em minha vida me todos os dias... Obrigada por sonharem junto comigo.

Aos meus familiares, em especial Tio Walter e Tia Eliana por acreditarem e confiarem em mim, muitas vezes mais que eu mesma!

À equipe Nutrimed/Danone por me engradecerem como profissional! Obrigada pelo apoio.

A Carina, Patrícia e Nádia por ouvirem minhas angústias e por me apoiarem! Vocês são presentes de Deus na minha vida! Obrigada pelo carinho e apoio.

Meu muito obrigado a todos que direto ou indiretamente contribuíram para tornar esse sonho uma realidade!

"De tudo ficam três coisas:  
A certeza de que estamos sempre  
começando,  
A certeza de que é preciso continuar  
E a certeza de que podemos ser  
interrompidos antes de terminarmos.  
Devemos fazer da interrupção um  
caminho novo,  
Da queda uma dança,  
Do medo uma escada,  
Do sonho uma ponte,  
Da procura um encontro"

Fernando Sabino



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Obesidade: Conceito, epidemiologia, alterações metabólicas e imunológicas.....	17
1.2 Leishmaniose: conceito, epidemiologia e relação com o sistema imunológico.....	26
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Dieta indutora de obesidade.....	36
4.3 Parasito.....	38
4.4 Obtenção do antígeno.....	38
4.5 Desenho experimental.....	39
4.6 Infecção por <i>Leishmania major</i> .....	40
4.7 Quantificações de parasitas na orelha.....	40
4.8 Coleta de sangue.....	40
4.9 Cultura de células.....	41
4.10 Medida do título de anticorpos específicos.....	41
4.11 Dosagens bioquímicas.....	42
4.12 Avaliações da glicemia.....	42
4.13 Ensaio imunoenzimático para medida da concentração de citocinas em sobrenadante de cultura.....	42
4.14 Dosagem de óxido nítrico (NO) .....	43
4.15 Análise estatística dos dados.....	43

<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Determinação do modelo de obesidade: ganho de peso e ingestão alimentar.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação das alterações de glicemia em camundongos que consumiram dieta hipercalórica antes e após a infecção por <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.3</b>	<b>Alterações de lipídeos séricos em camundongos que consumiram dieta hipercalórica infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da medida de lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação do perfil das citocinas IL-4, INF-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-17 e IL-10 produzidas por células de baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação do perfil das citocinas IL-4, IFN-<math>\gamma</math>, TNF- <math>\alpha</math>, IL-17 e IL-10 no sobrenadante de células do linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação da produção de óxido nítrico por células de baço e do linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>5.8</b>	<b>Avaliação do perfil de imunoglobulinas presentes no soro de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Leishmania major</i> .....	28
Figura 2	Modelo do desenvolvimento da resposta Th1/Th2.....	30
Figura 3	Desenho experimental.....	39
Figura 4	Estabelecimento da obesidade em camundongos C57BL/6: ganho de peso e ingestão alimentar.....	45
Figura 5	Avaliação das alterações de glicemia em camundongos que consumiram dieta hipercalórica antes e após a infecção por <i>Leishmania major</i> .....	46
Figura 6	Alterações de lipídeos séricos nos camundongos infectados com <i>Leishmania major</i> .....	47
Figura 7	Avaliação da medida de lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i> .....	48
Figura 8	Avaliação do perfil de citocinas produzidas por células de baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i> .....	50
Figura 9	Avaliação do perfil de citocinas produzidas por células de linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i> .....	52
Figura 10	Avaliação da concentração de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células de baço e do linfonodo drenante de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i> .....	53
Figura 11	Avaliação do perfil de imunoglobulinas no soro de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania major</i> .....	55

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Ingredientes das dietas controle e hipercalórica.....	37
Tabela 2	Composição nutricional (macronutrientes) das dietas controle e hipercalórica.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu\text{g}$  – microgramas  
 $\mu\text{L}$  – microlitros  
ABTS – *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*  
AIN 93G – dieta padrão para roedores  
AKt – proteína cinase B  
AMPC – adenina monofosfato cinase  
BHT – Hidroxitolueno butilado  
BSA – albumina soro bovina  
C57BL/6 – camundongo C57 *black 6*  
CD – células dendríticas  
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais  
 $\text{CO}_2$  – gás carbônico  
dL – decilitro  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
ELISA – Ensaio Imunoenzimático  
ESC – estruturas em forma de coroa  
H1N1 – vírus influenza  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio  
HDL – lipoproteína de alta densidade  
HSF – dieta indutora de obesidade  
IFN- $\alpha/\beta/\gamma$  – interferon *alfa/beta/gama*  
Ig – imunoglobulina  
IL – interleucina  
IMC – índice de massa corporal  
iNOS – óxido nítrico sintase induzível  
Kcal – quilocalorias  
 $\text{Kg/m}^2$  – quilogramas por metro ao quadrado  
*L. major* – *leishmania major*  
LDL – lipoproteína de baixa densidade  
LPS – lipopolissacarídeo  
M1 e M2 – macrófagos do tipo M1 ou do tipo 2  
mg – miligramas

MHC – complexo de histocompatibilidade principal  
min – minutos  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
NF-kB – fator nuclear *kappa* B  
NK – Natural *Killer*  
nm – nanômetros  
NO – óxido nítrico  
°C – graus Celsius  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
OPD – ortofenileneamina  
PAI-1 – inibidor ativador do plasminogênio tipo 1  
PBS - salina tamponada com fosfato  
PCR – proteína C reativa  
PMN – polimorfonuclear  
POF – pesquisa de orçamento familiar  
RNA – ácido ribonucleico  
RPMI – meio para cultura de células desenvolvido pelo “Institute Roswell Park Memorial” - (RPMI)  
STAT – sinal de transdução e ativação de transcrição  
TGF- $\beta$  – fator de transformação de crescimento *beta*  
Th1 – células T *helper* tipo 1  
TH2 – células T *helper* tipo 2  
TLR – *toll like receptor*  
TNF – fator de necrose tumoral  
TTOG – teste de tolerância oral à glicose  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade  
x g – giros

## RESUMO

A obesidade é considerada uma doença crônica multifatorial e está relacionada ao aumento da taxa de mortalidade, pois predispõe o organismo à uma variedade de doenças. Trata-se de um problema de saúde pública que tem crescido no Brasil e no mundo em todos os estratos da sociedade. Muitos dos efeitos da obesidade sobre o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares já são conhecidos, no entanto, pouco se sabe sobre o impacto da obesidade sobre o sistema imunológico e as doenças infecciosas. Estudos recentes têm demonstrado que indivíduos obesos apresentam uma resposta imunológica diminuída predispondo ao aumento da susceptibilidade à infecção por diferentes agentes patogênicos. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a obesidade induzida por dieta hipercalórica altera a resposta imunológica em camundongos C57BL/6 frente à infecção por *Leishmania major*. Camundongos C57BL/6 foram divididos nos grupos AIN 93G (dieta normal) e HSF (dieta hipercalórica). Após 4 semanas de dieta os grupos foram infectados com *L. major* e eutanasiados 2, 4 e 8 semanas após a infecção. Avaliou-se o ganho de peso, glicemia, lipídeos séricos, tamanho da lesão, parasitismo, perfil de citocinas e imunoglobulinas e produção de óxido nítrico. Os dados apresentados no presente estudo sugerem que a obesidade e suas complicações metabólicas parecem alterar a resposta imunológica durante à infecção por *L. major*. A alteração do perfil de citocinas (redução de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-10 ambos na segunda semana de infecção) possivelmente podem explicar os mecanismos envolvidos pelos quais os animais obesos apresentam maior tamanho de lesão e maior permissividade ao parasito.

**Palavras-chaves:** Obesidade, infecção, *Leishmania major*, resposta imune.

## ABSTRACT

Obesity is a multifactor chronic disease and is associated with increased mortality, as it predisposes to a variety of diseases. This is a public health problem that has grown in Brazil and worldwide in all segments of society. Many effects of obesity on the development of metabolic and cardiovascular disorders are known, however little is known about the impact of obesity on the immune system and infectious diseases. Recent studies have shown that obese subjects have an impaired immune response predisposing to increased susceptibility to infection by various pathogens. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether obesity induced by high calorie diet alters the immune response in C57BL / 6 mice to infection by *Leishmania major*. C57BL / 6 mice were divided into groups AIN 93G (normal diet) and HSF (hypercaloric diet). After 4 weeks of diet groups were infected with *L. major* and euthanized 2, 4 and 8 weeks after infection. We evaluated weight gain, blood glucose, serum lipids, lesion size, parasitism, cytokine profile and immunoglobulins and nitric oxide production. The data presented in this study suggest that obesity and its metabolic complications appear to alter the immune response during infection with *L. major*. Changes in the cytokine profile (reduction of IFN- $\gamma$  and increase of IL-10 in the second week of infection) may possibly explain the mechanisms by which obese animals present higher lesion size and more permissiveness to the parasite.

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



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade: Conceito, epidemiologia, alterações metabólicas e imunológicas

A obesidade é caracterizada como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode causar danos à saúde. O Índice de Massa Corporal (IMC), definido como o peso do indivíduo em quilos dividido pelo quadrado da sua altura em metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), é comumente utilizado para classificar a obesidade. Indivíduos com valores de IMC de 25 a  $29,9\text{kg}/\text{m}^2$  são considerados com sobrepeso, enquanto indivíduos com IMC igual ou maior que  $30\text{kg}/\text{m}^2$  são considerados obesos (Organization, 2014). Para manter o equilíbrio de energia, um adulto deve consumir e gastar calorias em quantidades iguais ao longo do tempo. Desequilíbrio de energia ocorre quando há o balanço energético positivo, ou seja, quando a ingestão alimentar é superior ao gasto energético necessário para a manutenção das funções metabólicas do organismo. Este aporte calórico positivo, ou desequilíbrio energético, é a principal causa da obesidade, já que este acúmulo excessivo de energia será armazenado sob a forma de lipídeos no tecido adiposo. Além do excesso de calorias, fatores genéticos, sedentarismo, estilo de vida e fatores constitucionais do indivíduo podem contribuir para as causas da obesidade (Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health., 1998; Blackburn *et al.*, 2010).

A obesidade é considerada uma doença crônica multifatorial e está relacionada ao aumento da taxa de mortalidade, pois predispõe o organismo à uma variedade de doenças como resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, síndrome metabólica, doenças respiratórias como a asma e apneia do sono, trombose, esteatose hepática, síndrome do ovário policístico, infertilidade, dislipidemias, neoplasias, acidente vascular cerebral, osteoartrite, dentre outras (Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation., 2000). Desde a década de 1980 a obesidade tem se tornado uma epidemia que afeta grande parte dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, dentre eles o Brasil, e representa hoje um grave problema de saúde pública. Em 2008 foi estimado que mais de 10% da população mundial era obesa (Flegal *et al.*, 2012; Organization, 2014). No Brasil, desde 1974, a obesidade cresceu mais de

quatro vezes entre os homens, de 2,8% para 12,4%, e mais de duas vezes entre as mulheres, de 8% para 16,9% e, segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) de 2008-2009, este aumento esteve relacionado a modificações dos hábitos alimentares, com aumento do consumo de carboidratos simples e gorduras saturadas e à diminuição dos alimentos *in natura* (Ibge, 2010).

Trata-se de uma doença metabólica com etiologia complexa e alterações em diversos mecanismos, inclusive imunológicos (Blackburn *et al.*, 2010; Kanneganti and Dixit, 2012; Fisher-Hoch *et al.*, 2013). Muitos dos efeitos da obesidade sobre o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares já são conhecidos, no entanto, pouco se sabe sobre o impacto da obesidade sobre o sistema imunológico e as doenças infecciosas. Estudos em animais e humanos têm demonstrado que a obesidade está associada à alteração da produção de células do sistema imunológico e citocinas, prejuízo da função das células dendríticas e comprometimento das células *natural killer* (NK) (O'shea *et al.*, 2013). Em relação às células dendríticas (CDs) observou-se um número menor dessas células em indivíduos obesos quando comparado aos indivíduos saudáveis. Além disso, indivíduos obesos apresentaram menor expressão de moléculas co-estimuladoras de linfócitos T, menor ativação via *toll like receptors* (TLR) e maior produção de IL-10 (O'shea *et al.*, 2013). A soma desses fatores favorece a proliferação e sobrevivência de agentes infecciosos (O'shea *et al.*, 2013).

É crescente o número de pacientes obesos que são mais vulneráveis a adquirirem infecção hospitalar, que necessitam de terapia intensiva e que são mais susceptíveis ao óbito. A obesidade em si apresenta um componente inflamatório que leva ao desenvolvimento de doença metabólica e outras alterações de saúde associadas. Estima-se que o risco de pneumonias, infecções do trato urinário e aumento de feridas infeccionadas em obesos tenha até o dobro da incidência de indivíduos eutróficos (De Heredia *et al.*, 2012; Milner and Beck, 2012; Yuan and Chen, 2013). Além do mais, sabe-se que a resposta aos antibióticos comumente utilizados não é a mesma diante do excesso de tecido adiposo, embora os mecanismos que desencadeiem esses fenômenos ainda não sejam bem compreendidos (De Heredia *et al.*, 2012; Milner and Beck, 2012; Yuan and Chen, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a resposta imunológica diminuída no indivíduo obeso leva ao aumento da susceptibilidade à infecção por diferentes

agentes patogênicos, tais como vírus influenza (H1N1), *Mycobacterium tuberculosis*, vírus coxsackie, *Helicobacter pylori* e vírus da encefalomiocardite (Vaillant *et al.*, 2009; Karlsson and Beck, 2010; Nave *et al.*, 2011; Sheridan *et al.*, 2012). Embora os mecanismos específicos definidos para a resposta imune diminuída às doenças infecciosas no hospedeiro obeso ainda sejam desconhecidos, várias alterações associadas à obesidade, tais como a inflamação excessiva, alteração na sinalização de adipocinas, alterações metabólicas e mesmo regulação epigenética poderiam afetar a resposta imunológica (Karlsson and Beck, 2010). Trabalhos evidenciam que uma maior incidência de doença crônica associada à inflamação e maior suscetibilidade à infecção em pessoas obesas representa uma ameaça crescente à saúde (Kanneganti and Dixit, 2012). Segundo Fisher-Hoch e colaboradores (2013), pneumonias são mais frequentes e muitas vezes mais difíceis de tratar em pessoas obesas, sendo que os principais patógenos incluem o vírus influenza, pneumococos, estafilococos, tuberculose, bem como fungos e outros agentes patogênicos oportunistas. Este aumento de susceptibilidade é, em grande parte, devido à característica do estado inflamatório crônico, o que resulta em comprometimento de uma ampla gama de respostas imunes (Fisher-Hoch *et al.*, 2013). A obesidade tem sido relacionada a episódios graves de influenza (Vaillant *et al.*, 2009) e a presença de pneumonia por bactérias pneumococos em gripe fatal ((Cdc), 2009). Indivíduos obesos podem ter susceptibilidade aumentada à infecção do trato respiratório inferior devido a um maior risco de aspiração, volume pulmonar reduzido, alteração no padrão de ventilação e ao prejuízo das respostas mediadas por células B e T do sistema imunológico (Falagas and Kompoti, 2006). Além disso, a obesidade também está relacionada às doenças crônicas que podem aumentar o risco de pneumonias, incluindo a diabetes, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, asma, refluxo gastro-esofágico, alguns tipos de cânceres e doença hepática (Falagas and Kompoti, 2006; Kornum *et al.*, 2010). Estudo de coorte realizado por Kornum e colaboradores (2010) avaliou a associação entre obesidade e o risco de hospitalização por pneumonia, concluiu que a obesidade nesses pacientes está associada a um risco significativamente maior de hospitalização entre os homens, mas não entre as mulheres. Esse maior risco aparentemente foi explicado pela presença de co-morbidades em indivíduos obesos (Kornum *et al.*, 2010). Assim, a melhor compreensão dos processos imunológicos que regulam a obesidade podem contribuir para o desenvolvimento de tratamentos para doenças associadas à ela

(Kanneganti and Dixit, 2012). A obesidade está associada positivamente com o risco de desenvolver asma e doenças alérgicas, embora os mecanismos que expliquem esta observação ainda não sejam totalmente compreendidos (Wang *et al.*, 2003). Um relatório recente em um ambulatório de asma na Nigéria documentou taxas de 54% de obesidade em pacientes atendidos e mostrou que obesos asmáticos têm a função pulmonar mais baixa do que os não obesos (Wang *et al.*, 2003). Pesquisas sugerem que a inflamação sistêmica, medida usando níveis de proteína C reativa (PCR), pode ser importante na relação entre obesidade e asma. A PCR é um marcador para a inflamação sistêmica e seus níveis são frequentemente elevados em indivíduos com excesso de peso (Butland *et al.*, 2008). Embora muitas pessoas desenvolvam asma na infância, o número de casos com início na fase adulta tende também a aumentar. Cerca de 30% dos casos de asma com início na fase adulta são desencadeadas por alergias, uma estatística que pode estar vinculada concomitantemente com o aumento da obesidade (Diaz and Farzan, 2014; Raj *et al.*, 2014). Dados recolhidos do *National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006* (NHANES), indicam uma associação entre alergias e obesidade. Nesta investigação em que mais de 4000 crianças e adolescentes de 2-19 anos foram avaliados, os níveis da Imunoglobulina E (IgE) foram 26% mais altos em indivíduos obesos quando comparados aos de peso normal, sugerindo que a obesidade pode mediar a expressão do fenótipo alérgico (Visness *et al.*, 2009). Os linfócitos T CD4+ produzem as citocinas responsáveis pelos processos imunológicos. Essas citocinas podem ser classificadas, quanto ao padrão de produção, podendo ser do tipo T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2). Ainda que haja controvérsias sobre o equilíbrio entre a produção das citocinas de padrão Th1 e Th2 na obesidade, uma das hipóteses para sua associação com a asma e doenças alérgicas é que a obesidade resulta em alterações imunológicas, causando diminuição da tolerância a antígenos e inclinação do sistema imunológico para um perfil de citocinas mediadas por Th2, aumentando o risco de alergia e outras doenças imuno-mediadas. Contudo, mais estudos são necessários para explorar os efeitos imunológicos da obesidade e seus possíveis efeitos sobre as doenças (Raj *et al.*, 2014). Estudos também têm associado às complicações da infecção crônica pelo vírus da hepatite B à síndrome metabólica (Chung *et al.*, 2014; Jarčuška *et al.*, 2014; Jinjuvadia and Liangpunsakul, 2014).

A síndrome metabólica está intimamente associada à obesidade, diabetes *mellitus* e com a doença hepática gordurosa não alcoólica (o tipo mais comum de esteatose hepática) e pode acelerar a progressão da doença hepática e induzir cirrose ou mesmo o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Adicionalmente, a obesidade e diabetes podem aumentar mais de 100 vezes o risco de carcinoma hepatocelular, sugerindo um efeito sinérgico dos fatores metabólicos (Wang *et al.*, 2015).

Existem dois tipos de tecido adiposo. O tecido adiposo branco e o marrom. O tecido adiposo, especialmente o branco, possui intensa atividade metabólica e tem grande contribuição para o controle da homeostase do organismo. Além da função de armazenar lipídeos, ele é um importante órgão secretor, pois produz e libera vários fatores peptídicos e não-peptídicos denominadas adipocinas. Grande parte dessas adipocinas atua como citocinas ou quimiocinas e desempenham funções autócrinas, parácrinas ou endócrinas, fazendo com que os adipócitos apresentem propriedades que se assemelhem às do sistema imunológico, já que produzem mediadores pró e anti-inflamatórios e outros que atuam na ativação do sistema complemento (Santos and Torrent, 2010). As adipocinas interferem no metabolismo de lipídios e de glicose e contribuem para o desenvolvimento de processos inflamatórios e de doenças relacionadas à obesidade, como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 e síndrome metabólica (Prado *et al.*, 2009; Santos and Torrent, 2010; Ohashi *et al.*, 2014). Dentre as principais adipocinas estudadas, estão a leptina, adiponectina, TNF, IL-6 e resistina.

A Leptina é um hormônio polipeptídico produzido pelo tecido adiposo branco e secretado na circulação. Suas concentrações plasmáticas nos seres humanos estão altamente correlacionadas com a massa de tecido adiposo, sendo que a maioria dos pacientes obesos têm concentrações elevadas de leptina. Estudos indicam que as concentrações de leptina são elevadas em animais e humanos obesos, indicando que a obesidade está associada à resistência à leptina (Friedman, 2009). Essa adipocina atua como fator de sinalização entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central (hipotálamo), controlando a massa corporal pela regulação da ingestão alimentar e do gasto energético (Prado *et al.*, 2009). Vários estudos sobre a obesidade em animais utilizam os camundongos *ob/ob* (obesos-hiperglicêmicos), que são deficientes em leptina. Esses animais se tornam super obesos devido ao consumo alimentar excessivo e se tornam hiperglicêmicos, hiperlipidêmicos e

hiperinsulinêmicos, além de terem distúrbio na termorregulação e menor atividade física, causando baixo gasto energético (Lindström, 2007). Dentre vários problemas apresentados por esses animais observa-se a imunossupressão (Falagas and Kompoti, 2006). Esses animais são altamente susceptíveis a *Listeria monocytogenes* e à infecção por parasitas intracelulares (Ikejima *et al.*, 2005). Isto porque a leptina também é capaz de ativar monócitos, modular células dendríticas e NK e influenciar no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006). A leptina tem efeito potencial sobre a resposta dos linfócitos T quanto à regulação da proliferação de células *naive* e T de memória, estimulando ou suprimindo a produção das citocinas, Th1 e Th2, respectivamente. Sendo assim, a leptina é um forte fator mediador do estado nutricional sobre a função imunológica e pode ser um importante alvo da interação imunológica em diversas fisiopatologias. Além disso, é importante salientar que algumas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 aumentam a expressão de RNAm para síntese de leptina (Friedman, 2009; Prado *et al.*, 2009).

A adiponectina é produzida exclusivamente pelo tecido adiposo e está envolvida na regulação do balanço energético devido ao seu papel anorexígeno. Na resposta inflamatória tem uma função anti-inflamatória e atenua a progressão da aterosclerose através da diminuição da expressão de moléculas de adesão, reduzindo a adesão de monócitos às células endoteliais e a captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Também aumenta a sensibilidade à insulina e a oxidação muscular dos ácidos graxos, e reduz a concentração de glicose plasmática através do AMPK (adenina monofosfato cinase) (Silveira *et al.*, 2009; Wajchenberg *et al.*, 2009). A expressão de adiponectina diminui à medida que o tecido adiposo aumenta e sua concentração é menor em indivíduos obesos, especialmente com resistência à insulina (Gottschall *et al.*, 2004). Níveis de adiponectina reduzem com o aumento de alguns mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2009). Em contraste com os resultados encontrados em relação às disfunções metabólicas, a maioria dos recentes estudos relatam níveis elevados de adiponectina em pacientes com patologias imuno-mediadas tais como doenças autoimunes e pulmonares, insuficiência cardíaca e renal, hepatite viral, dentre outras. Logo, os mecanismos que conduzem a este aumento e o papel específico da adiponectina na fisiopatologia destas condições ainda devem ser melhor elucidados (Fantuzzi, 2013).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória produzida pelo tecido adiposo e também por macrófagos, inclusive os infiltrados neste tecido, e linfócitos. Está associada a processos inflamatórios, aumento na secreção de óxido nítrico, citotoxicidade, apoptose e inibição da lipogênese e ativação da lipólise, resistência à insulina, além da produção de outras citocinas como IL-1 e IL-6 (Santos and Torrent, 2010). Está bem caracterizado por sua capacidade de induzir a necrose em células tumorais (Prado *et al.*, 2009). A adiponectina e o TNF se inibem mutuamente, sendo que a expressão e secreção TNF está aumentada na obesidade (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007). A adiponectina parece ter importante capacidade de depuração bacteriana, devido à sua participação nos processos inflamatórios, mas na obesidade seus níveis estão reduzidos. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que o aumento de ácidos graxos livres pode modular a atividade de enzimas e de proteínas que participam na exocitose da insulina e inibir a fosforilação de Akt (proteína quinase B) e de iNOS (óxido nítrico sintase induzível). Como consequência, há diminuição da resposta inflamatória (Zhou *et al.*, 2011) e também cicatrização cutânea tardia (Paulino Do Nascimento and Monte-Alto-Costa, 2011).

A IL-6, além de ser produzida por monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, esta citocina também é sintetizada pelo tecido adiposo. Tem grande potencial pró-inflamatório, ativa células do sistema imunológico e tem correlação com complicações cardiovasculares, obesidade e resistência à insulina. Assim como TNF- $\alpha$ , induz a produção de proteína C reativa no fígado (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2009; Santos and Torrent, 2010) e pode ser detectada precocemente em caso de invasão bacteriana na corrente sanguínea. É sinalizadora para a ativação e diferenciação de células T citotóxicas, promove a secreção de anticorpos pelas células B e estimula a liberação de outras citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Procianoy and Silveira, 2004). IL-6 é uma citocina com propriedades pró e anti-inflamatórias. Em diversos modelos murinos foi demonstrado que a IL-6 media a ativação de vias anti-inflamatórias em células alvo (Scheller *et al.*, 2011).

A resistina, secretada por monócitos e adipócitos, apresenta propriedades pró-inflamatórias e tem potencial regulador da adipogênese e efeito promotor da resistência à insulina por meio do aumento da gliconeogênese hepática (Fonseca-Alaniz *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2009). Possui ação aterogênica pelo aumento da atividade do fator NF-kB e pelo aumento da expressão de moléculas de adesão.

Agentes pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, glicocorticóides e lipopolissacarídeos (LPS) podem regular a expressão do gene da resistina, mas sabe-se que seus níveis estão aumentados na obesidade (Silveira *et al.*, 2009).

A obesidade pode provocar um desequilíbrio na produção e liberação das citocinas pró e anti-inflamatórias, estimular a infiltração progressiva de macrófagos e induzir respostas inflamatórias ou de hipersensibilidade (alergias) (Prado *et al.*, 2009). Evidências indicam que obesos possuem maiores concentrações de resistina e leptina e que esses indivíduos têm maior susceptibilidade às doenças inflamatórias e infecciosas. Em contrapartida, possuem menores concentrações de adiponectina, mas por esta adipocina apresentar uma correlação negativa com o tecido adiposo, indivíduos obesos podem não usufruir dos benefícios protetores relacionados aos aspectos imunológicos (Prado *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2009). Embora crônico, o processo inflamatório da obesidade é considerado de baixa intensidade, mas há evidências que ainda assim este poderia ser um fator desencadeante na origem de doenças como resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 e de doenças cardiovasculares como a hipertensão. Alimentação em excesso, sobretudo rica em gorduras saturadas, e também outros fatores como estresse, podem contribuir para a obesidade e para aumento da secreção, principalmente pelo tecido adiposo visceral, de citocinas como PAI-1, PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$ , que levariam à hiperinsulinemia e à doença cardiovascular. Ainda, o aumento na secreção de adipocinas pró-inflamatórias aumentam a secreção de leptina e diminuem as concentrações de adiponectina, fator que contribui ainda mais para o desenvolvimento dessas comorbidades (Rader, 2007). Indivíduos obesos apresentam quantidade significativa de infiltrado de macrófagos quando comparados a indivíduos eutróficos. Provavelmente esses macrófagos são atraídos para este tecido devido hipóxia tecidual de adipócitos hipertrofiados e pela secreção de citocinas pró-inflamatórias (Ros Pérez and Medina-Gómez, 2011). O ambiente pró-inflamatório leva à ativação de macrófagos que se apresentam em “estruturas semelhantes a coroas” (ESC), envolvendo completamente adipócitos necróticos e fagocitando os lipídios remanescentes (Cinti *et al.*, 2005). Esses macrófagos presentes no tecido adiposo são sensíveis a ácidos graxos livres e a ligação dessas moléculas em receptores específicos levam a troca de fenótipo celular de macrófagos de M2 (anti-inflamatórios) para M1 (pro-inflamatórios) (Harford *et al.*, 2011; De Heredia *et al.*, 2012). Elevadas quantidades de espécies reativas de



oxigênio são produzidas durante a obesidade devido ao estado de estresse oxidativo provocado pelo ambiente tipicamente inflamatório. Isso se deve à ativação do fator de transcrição NF-kB (Ros Pérez and Medina-Gómez, 2011). O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo também pode ser responsável pela resistência à insulina observada em animais submetidos a dietas ricas em gorduras. Outras citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-8 e IL-18 também estão aumentadas na obesidade e estão relacionadas a síndrome metabólica e resistência à insulina (Volp *et al.*, 2008; Wajchenberg *et al.*, 2009).

A obesidade também está associada a lipogênese ectópica, ou seja, a gordura que deveria ser armazenada sob a pele (gordura subcutânea) é acumulada em órgãos como o fígado, músculo, e outros como os órgãos linfoides primários (Kanneganti and Dixit, 2012). Este acúmulo ectópico de gordura pode estar relacionado ao processo de envelhecimento tímico, que é caracterizado por alterações substanciais no compartimento de células T, redução da produção de células T *naive*, com conseqüente envelhecimento do sistema imunológico (Yang *et al.*, 2009; Nave *et al.*, 2011; Milner and Beck, 2012; Sheridan *et al.*, 2012). A obesidade pode comprometer os mecanismos regulatórios da geração de células T, induzindo involução prematura do timo devido ao maior acúmulo de gordura no órgão. Conseqüentemente, a involução do timo contribui para redução do repertório de linfócitos, aumento da susceptibilidade à infecções e câncer e para maior risco de falhas nas vacinas, que poderão apresentar proteção parcial com baixa produção de anticorpos após administração (Yang *et al.*, 2009; Nave *et al.*, 2011; Milner and Beck, 2012; Sheridan *et al.*, 2012). Ainda, a redução do repertório de linfócitos leva a oligoclonalidade, isto é, grupos de linfócitos indevidamente expandidos em relação ao sistema imunológico, o que contribui para o desenvolvimento de alergias, aterosclerose, esclerose sistêmica, susceptibilidade a infecção e autoimunidade (Vaz and Pordeus, 2005; Vallejo, 2006). Em um estudo realizado por Louie *et al.* (2011), entre adultos hospitalizados com infecção por H1N1, observou-se que, embora pacientes obesos possam ter múltiplas co-morbidades que contribuam para o risco de agravamento da influenza, pessoas com obesidade grau III (IMC  $\geq 45$  kg/m<sup>2</sup>) parecem ter maior risco de morte por infecção por H1N1, independente de outros fatores de risco. (Louie *et al.*, 2011). Para determinar a resposta dos anticorpos à vacina contra influenza, estudo conduzido por Sheridan e colaboradores (2012) mostrou que, após 12 meses de vacinação, os indivíduos com

sobrepeso e obesos apresentaram maior declínio nos níveis de anticorpos da gripe, diminuição da ativação linfócitos T CD8<sup>+</sup> e da expressão de proteínas funcionais comparados aos indivíduos de peso saudável. Estes resultados sugerem que a obesidade pode prejudicar a capacidade do organismo em montar uma resposta imunológica protetora para o vírus (Sheridan *et al.*, 2012).

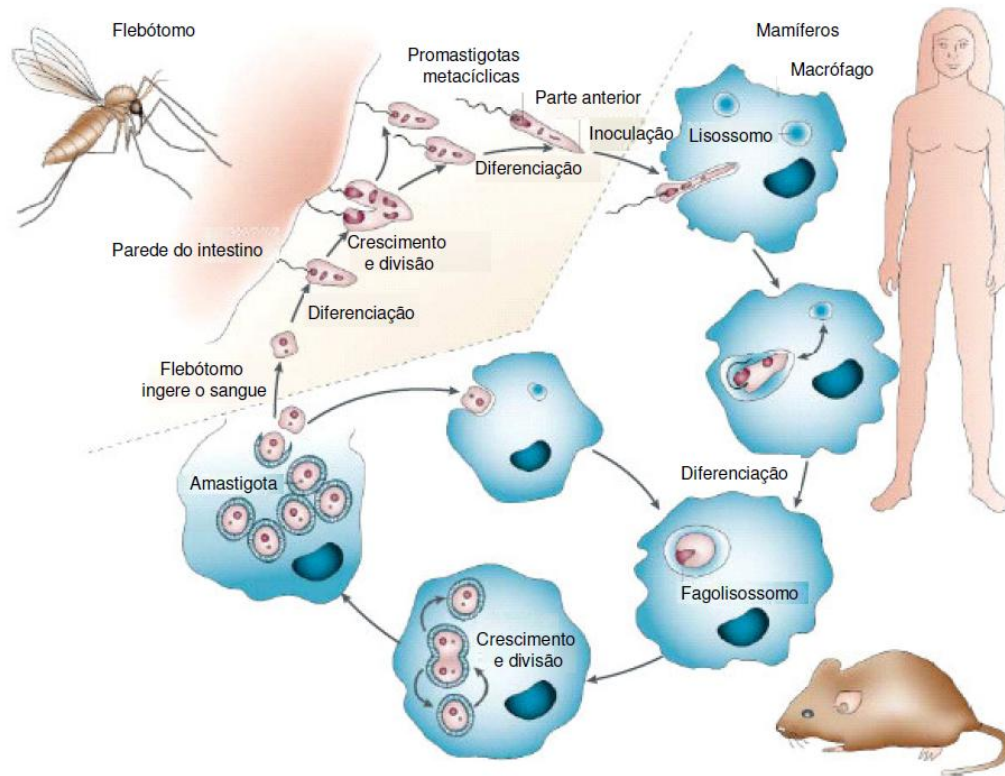
## **1.2 Leishmaniose: conceito, epidemiologia e relação com o sistema imunológico**

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários unicelulares pertencentes ao reino Protista, à ordem Kinetoplastida, à família Tripanosomatidae e ao gênero *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 1985; Mougneau *et al.*, 2011). O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros. As espécies que se desenvolvem no intestino médio do vetor pertencem ao subgênero *Leishmania* e as que se desenvolvem no intestino anterior e no posterior do vetor pertencem ao subgênero *Viannia* (Lainson and Shaw, 1987; Silveira *et al.*, 2004). Pelo menos 20 espécies de leishmanias são patogênicas para o homem (WHO, 2007b). Todas as espécies do gênero são parasitos intracelulares obrigatórios no hospedeiro vertebrado (Carvalho *et al.*, 1985). São transmitidas aos seres humanos pela picada de flebotomíneos infectados. Apenas as fêmeas são capazes de infectar os vertebrados, completando o ciclo do parasito. Há cerca de 500 espécies de flebótomos, mas somente cerca de 30 são capazes de transmitir as leishmanioses. Existem duas formas principais da doença: a tegumentar e a visceral. A forma tegumentar pode apresentar-se nas formas cutânea simples, difusa e mucocutânea (Desjeux, 1996). Na leishmaniose cutânea simples a lesão é restrita a área da picada, na forma difusa ocorrem lesões em outras partes do corpo e na mucocutânea ocorre acometimento das mucosas. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, é caracterizada por causar úlceras nas partes expostas do corpo, levando a desfiguração e/ou cicatrizes permanente. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, e pode ser fatal se não tratada. É caracterizada por episódios de febre irregular, perda de peso, aumento do baço e do fígado, e anemia. Embora a leishmaniose visceral seja a forma mais grave da doença já que leva ao óbito, a forma cutânea é a que mais acomete indivíduos no mundo, As espécies do gênero *Leishmania* estão relacionadas à forma clínica da doença. As espécies relacionadas à manifestação

classificada como cutânea simples são: *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo (Dowlati, 1996); e *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. peruviansis*, *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. laisoni*, *L. mexicana* e *L. pifanoi* no Novo Mundo (Weigle and Saravia, 1996). De acordo com dados atualizados pela OMS em 2012, acredita-se que a doença é endêmica em 82 países e que existem 10 milhões de pessoas infectadas, sendo que 10 desses países abrigam mais de 95% dos casos, dentre eles o Brasil. Estima-se que 0.7 a 1.3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente. Cerca de dois terços dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorrerem principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. O Brasil apresenta posição de destaque nos casos de leishmaniose, pois apresenta altos índices de novos casos tanto para a leishmaniose cutânea como visceral. A desnutrição é um fator de risco, uma vez que indivíduos com déficit calórico e proteico e com teores reduzidos de vitamina A e zinco tem uma resposta imunológica dificultada, permitindo melhor replicação do parasito no hospedeiro. Moradia inadequada e com grande número de pessoas vivendo em um espaço reduzido favorece a disseminação da doença entre os membros das famílias. Além disso, a invasão de áreas silvestres seja por urbanização ou agropecuária favorecem a inserção do homem no ciclo do parasito, aumentando o risco de infecção (Boelaert *et al.*, 2009).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxenos, sendo fundamental um hospedeiro invertebrado e o outro vertebrado para que o ciclo seja completo. Um dos hospedeiros da *Leishmania* é o inseto do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, cuja fêmea é hematófaga, portanto responsável pela disseminação do protozoário e propagação da doença. O gênero *Phlebotomus* é predominante na Europa, Ásia e África, já nas Américas prevalece o gênero *Lutzomyia*. Após o repasto sanguíneo os vetores ingerem, juntamente com o sangue, macrófagos infectados com as formas amastigotas, que são formas arredondadas e sem flagelo aparente (Courret *et al.*, 2002; Mougneau *et al.*, 2011). No intestino dos vetores as *Leishmanias* diferenciam-se na forma promastigota, alongada e flagelada. No aparelho digestivo do inseto as promastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, essas são as formas infectantes (Sacks, 1989). As promastigotas metacíclicas por sua vez são transmitidas aos mamíferos no momento do repasto sanguíneo do inseto vetor. No

hospedeiro vertebrado as amastigotas se multiplicam por divisão binária e quando a célula é rompida essas formas são capazes de infectar outras células (**Figura 1**).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Leishmania major*

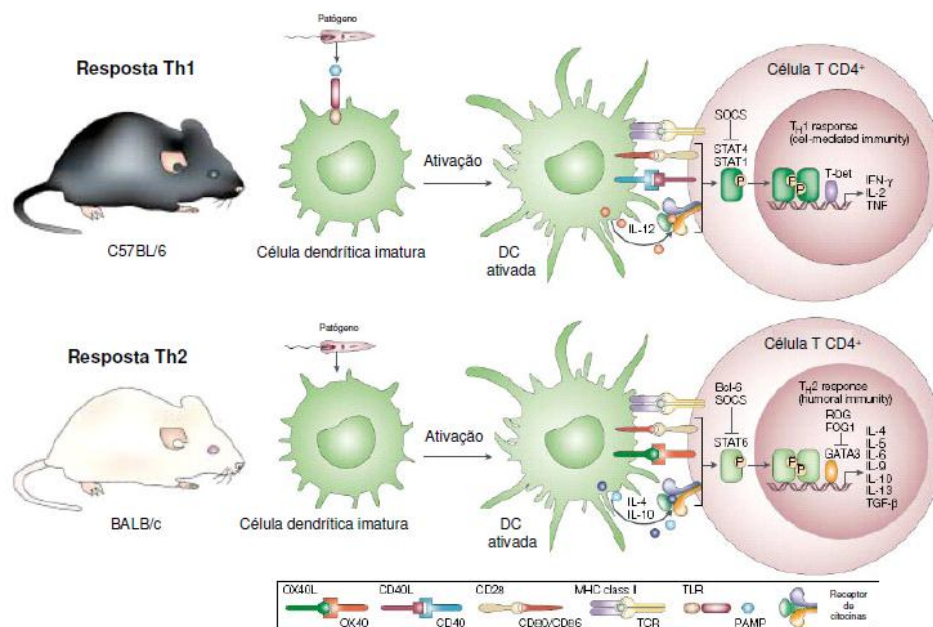
Parasitas são transmitidos pela picada de flebótomos fêmeas infectadas, a qual injeta promastigotas metacíclicas na pele. Essas formas são opsonizadas eficientemente pelos componentes do soro e captados pelos macrófagos. Nestas células o parasita reside em fagolisossomas e se diferencia em amastigotas replicativas. Macrófagos são ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo, estas células são lisadas no intestino do inseto, liberando parasitas que se dividem rapidamente. As formas promastigotas não infectivas passam por um processo na parede do intestino do flebótomo na qual se diferenciam para forma metacíclica e migram para a parte anterior do tubo digestivo do vetor. O ciclo se completa quando o inseto realiza novo repasto sanguíneo, transmitindo promastigotas metacíclicas. Fonte: (Sacks and Noben-Trauth, 2002).

Em contato com o hospedeiro as Leishmanias iniciam sua interação com o sistema imunológico. As primeiras células a migrarem para o sítio da infecção são as polimorfonucleares (PMN), porém nesse tecido já existem macrófagos residentes (Chang, 1981; Pearson and Steigbigel, 1981; Mougneau *et al.*, 2011). Os macrófagos são células importantes na infecção por leishmanias. Antes de sofrerem apoptose os neutrófilos secretam citocinas que influenciam diretamente a diferenciação e ativação de células T. A infecção dos macrófagos pode acontecer

pela entrada ativa do parasito, pela fagocitose do parasito opsonizado ou pela fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados. A interação dos parasitos com as células do hospedeiro ocorre devido a receptores presentes na superfície de macrófagos, células dendríticas e outras polimorfonucleares (Kima *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2003). Células dendríticas plasmocitóides, subtipos de células dendríticas residentes da pele, participam da resposta imunológica inicial à infecção por *L. major*. Essas células não respondem à infecção depois da fagocitose ou endocitose dos parasitas, porém podem ser ativadas pelo reconhecimento do DNA genômico dos parasitas e podem produzir IFN- $\alpha/\beta$  e IL-12 de maneira dependente de TLR-9 (Bajénoff *et al.*, 2006; Soong, 2008). As leishmanias podem ser opsonizadas por anticorpos o que acabam facilitando a fagocitose pelos macrófagos. Quando os anticorpos envolvem os parasitos ocorre uma interação entre a porção Fc do anticorpo com os receptores de Fc na superfície dos fagócitos, o que facilita a entrada dos parasitos nas células (Miles *et al.*, 2005). Quando as *Leishmanias* penetram ativa nas células fagocitárias, sejam os macrófagos ou as células dendríticas ocorre formação de fagossomo, cada subgênero de *Leishmania* induz a formação de determinado tipo de fagossomo. Ao serem fagocitados, os parasitos são processados e ocorre liberação de antígenos e apresentação dos mesmos para as células T. A apresentação pode ocorrer tanto via MHC de classe I como via MHC de classe II. Em infecções por *Leishmania major*, alguns estudos mostram que o MHC de classe II parece exercer um papel mais importante no desencadeamento da resposta do tipo Th1 (Mougneau *et al.*, 2011).

A infecção por *L. major* é o modelo experimental mais explorado e exemplifica o paradigma de desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, no qual a consequência da doença é determinada pela natureza e magnitude da resposta das células T CD4<sup>+</sup> e produção de citocinas no início da infecção (Mosmann and Coffman, 1989; Sacks and Noben-Trauth, 2002) (**Figura 2**). Entretanto, atualmente, outros estudos mostram que a indução do fenômeno de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. major* envolvem outros fatores como a cepa de *L. major* utilizada na infecção, ativação de populações de células T reguladoras, produção de IL-10, uso da via da arginase em detrimento da iNOS e participação de IL-17 (Belkaid *et al.*, 2001; Lopez Kostka *et al.*, 2009). Os camundongos da linhagem C57BL/6 são resistentes à *L. major* pelo desenvolvimento de uma resposta Th1 com produção de altas concentrações de

IFN- $\gamma$  (Aseffa *et al.*, 2002; Sacks and Noben-Trauth, 2002; Lopes *et al.*, 2014). A resposta imune do tipo 1 (Th1), é caracterizada pela presença de IL-12 produzida por células apresentadoras de antígenos, que induz as células NK. As células NK são importantes na resposta imune inata contra *Leishmania*, pois são produtoras de IFN- $\gamma$ , principal estímulo para a produção de IL-12. A produção de IL-12 é capaz de induzir a ativação do fator de transcrição nuclear, o NF- $\kappa$ B, que então leva à ativação de genes responsáveis pela síntese de IFN- $\gamma$  e também TNF- $\alpha$ . Além disso, a ligação de IL-12 ao seu receptor estimula a fosforilação de STAT-4 que induz as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> para o perfil Th1 (Reiner *et al.*, 1994; Aseffa *et al.*, 2002). A principal característica deste tipo de resposta é a indução da produção de intermediários de oxigênio e nitrogênio que são capazes de promover a eliminação das *Leishmanias* (Reiner *et al.*, 1994; Etges and Muller, 1998; Rogers *et al.*, 2002). Animais deficientes de IFN- $\gamma$  ou do receptor de IFN- $\gamma$  não são capazes de controlar a infecção (Wang *et al.*, 1993; Swihart *et al.*, 1995; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). Essa citocina, assim como TNF- $\alpha$ , são importantes ativadores da enzima iNOS que promove a produção de óxido nítrico a partir de L-arginina (Green *et al.*, 1982; Mosser and Edwards, 2008; O'shea and Murray, 2008; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012).



**Figura 2** – Modelo do desenvolvimento da resposta Th1/Th2.

A diferenciação das respostas imunes para o perfil Th1 e Th2 é dependente da apresentação de antígenos às células T CD4<sup>+</sup> *naive* pelas células dendríticas. A interação de moléculas coestimulatórias com seus respectivos ligantes (CD40-CD40L OX10-OX40L e/ou CD80 CTLA4/ CD28) associado com o ambiente de citocinas local, promovem a diferenciação de células T *naive* em células Th1 que secreta IFN- $\gamma$  ou células Th2 que libera IL-4. Fonte: (Sacks and Noben-Trauth, 2002).

A produção de óxido nítrico é fundamental para o controle da proliferação dos parasitos (Horta *et al.*, 2012). No caso da infecção de camundongos C3H com a *L. major* ocorre resistência ao parasito, como no caso do C57BL/6, com indução da secreção de IL-12 e consequente ativação da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Vieira *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2012; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2014). Já os camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *Leishmania major* e não conseguem controlar o parasito (Scott, 1991; Chatelain *et al.*, 1992). Isso ocorre em virtude de um cenário com altos níveis de IL-4. A IL-4 ao ativar macrófagos promove um aumento da expressão da enzima arginase I e diminui a expressão de receptores de IL-12, ou seja, a IL-4 promove a proliferação de células em um fenótipo Th2 em detrimento do fenótipo Th1 ao inibir a amplificação do sinal de IL-12, extremamente importante para a polarização Th1 (Chatelain *et al.*, 1992; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012; Hurdal and Brombacher, 2014). A hidrólise da L-arginina pela arginase I tem como produtos a ureia e a ornitina. A ornitina é utilizada para a síntese de poliaminas, que podem ser utilizadas como substrato para o crescimento do parasito (Roberts *et al.*, 2004). A ativação de arginase correlaciona-se com a susceptibilidade à infecção, pois dificulta o desenvolvimento de mecanismos efetores para a eliminação do parasito. Altos níveis de IL-4 estão associados a baixos níveis de IFN- $\gamma$  (Loke *et al.*, 2007). Esse cenário caracterizado pelo aumento de IL-4 e aumento da expressão de arginase I corresponde a um fenótipo de susceptibilidade à leishmaniose, caracterizado por uma resposta T *helper* do tipo Th2 (Scott *et al.*, 1988; Sacks and Noben-Trauth, 2002; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). As citocinas presentes no sítio de infecção poderão definir o fenótipo do macrófago durante o processo de estabelecimento da doença. Um macrófago na presença de altos níveis de IFN- $\gamma$  apresenta características que favorecem a inflamação, no caso da infecção por *L. major*, isso leva a morte do parasito. Já em um cenário com altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  gera macrófagos mais permissivos a permanência do parasito na lesão (Fröhlich *et al.*, 2007; Tumitan *et al.*, 2007; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012).

Outra citocina importante descrita na infecção experimental por *L. major* é a IL-17. A IL-17 promove a migração de células polimorfonucleares, como os neutrófilos, com função de eliminação de parasitas extracelulares (Gaffen, 2011). Os neutrófilos são células importantes na fase inicial da infecção por *L. major*. Essas células fagocitam os parasitas e os eliminam. Entretanto, alguns autores acreditam

que a permanência de *L. major* no interior de neutrófilos e, como consequência, a fagocitose desses neutrófilos apoptóticos por macrófagos seja uma forma de entrada “silenciosa” de parasitas na célula hospedeira (Laufs *et al.*, 2002). De outra forma, foi mostrado que camundongos BALB/c *knock out* para IL-17 apresentam menor número de neutrófilos nas lesões (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Estudos recentes mostram um papel importante do neutrófilo durante a infecção por *L. amazonenses*. Essas células contribuem não só para o controle do número de parasitos e desenvolvimento da lesão como também na manutenção de altas porcentagens de células T reguladoras (Sousa *et al.*, 2014). Trabalhos mostram que a ação de células Th17+ são controladas pela sinalização de IL-10 proveniente de células T reguladoras FoxP3+ (Huber *et al.*, 2011).

As células T reguladoras são células responsáveis por manter a homeostase limitando a inflamação em excesso. São derivadas do timo e expressam FoxP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Alexander and Brombacher, 2012; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). Na infecção por *Leishmania* seu papel é variável de acordo com o modelo utilizado e a espécie do parasito. No camundongo C57BL/6 infectado por *L. major* as células T reguladoras tem sido relacionadas ao aumento de IL-10 na lesão e no linfonodo drenante e estão relacionadas à persistência do parasito na lesão (Belkaid *et al.*, 2001; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). A IL-10 derivada de células T reguladoras tem uma relação direta com a persistência das *Leishmanias* em lesões curadas no modelo de resistência (C57BL/6). Um provável mecanismo que poderia explicar essa situação seria um o papel inibidor da IL-10 sobre a ativação de macrófagos, pois a IL-10 secretada pelas células T reguladoras pode se sobrepor, na fase crônica da doença, ao mecanismo efetor de produção de INF- $\gamma$  (Belkaid *et al.*, 2001; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). Além disso, a IL-10 é capaz de reduzir as respostas ao IFN- $\gamma$  e conseqüentemente inibir os mecanismos efetores na eliminação do parasito mediados por macrófagos (Moore *et al.*, 2001; Tacchini-Cottier *et al.*, 2012). Em seu estudo Sousa e colaboradores (2014) mostram que na ausência de neutrófilos ocorre aumento da IL-10 o que favorece a proliferação do parasito.

A fagocitose de parasitos opsonizados por IgG induz a produção de IL-10 nos macrófagos (Snapper and Paul, 1987; Kane and Mosser, 2001; Yang *et al.*, 2007). O IFN- $\gamma$  é importante para a manutenção da resposta imune humoral, uma vez que ao estimular a produção de IL-12, inibe a proliferação de linfócitos Th2, e coordena a mudança de isótipo para IgG2a por linfócitos B (Snapper and Paul, 1987; Gajewski



and Fitch, 1988; Gajewski *et al.*, 1988). A fagocitose de parasitos opsonizados por imunoglobulinas prejudica a resposta durante a infecção por *L. amazonensis* e parece exercer um papel negativo no controle da infecção por induzir a produção de IL-10 nos macrófagos (Kane and Mosser, 2001; Lopes *et al.*, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante dos fatores descritos anteriormente, pode-se perceber que certas doenças parecem apresentar maiores dificuldades de serem controladas em indivíduos com excesso de peso, corroborando para a afirmativa de que a obesidade leva a alterações do sistema imunológico, reduzindo as respostas aos agentes infecciosos. Portanto, torna-se cada vez mais relevante a investigação dos mecanismos associados à obesidade e das consequências provocadas por agentes infecciosos em indivíduos com excesso de tecido adiposo. Pesquisas que busquem melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na atividade de células do sistema imunológico de indivíduos obesos e com distúrbios metabólicos diante de infecções são necessárias. Nesse contexto, qual seria o comportamento do sistema imunológico frente a uma infecção por *L. major* em camundongos obesos?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar se a obesidade induzida por dieta hipercalórica pode alterar a resposta imunológica em camundongos C57BL/6 frente à infecção por *Leishmania major*.

#### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Gerar camundongos obesos com obesidade induzida por dieta.
- ✓ Analisar o desenvolvimento da lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major* e alimentados com a dieta hipercalórica ou dieta padrão.
- ✓ Avaliar a resposta imune através do perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no baço e linfonodos dos animais (IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , IL-17, IL10).
- ✓ Avaliar a produção de NO nos animais infectados com *Leishmania major* alimentados com dieta hipercalórica ou dieta padrão.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica, em gaiolas de plástico, contendo no máximo 5 animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, foram vermifugados com ivermectina 2%. Os animais receberam dieta controle (AIN93G) ou dieta indutora de obesidade (HSF) *ad libitum*. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo de submissão número 338/ 2012 (Anexo 1).

### **4.2 Dieta indutora de obesidade**

A composição da dieta encontra-se abaixo. Os animais foram alimentados *ad libitum* com a dieta indutora de obesidade (HSF) ou com a dieta controle (AIN 93G) (Tabela 1) (Tabela 2).

**Tabela 1 – Ingredientes das dietas controle e hipercalórica**

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

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

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

	<b>Controle (AIN 93G)</b>	<b>HSF(Hipercalórica)</b>
<b>Carboidrato (kcal)</b>	1990	2518
<b>Proteína (kcal)</b>	812	812
<b>Lipídio (kcal)</b>	630	630
<b>Calorias (por gramas)</b>	3,43	3,96
<b>Calorias (kcal)</b>	3432	3960
<b>Carboidrato (%)</b>	58	64
<b>Proteína (%)</b>	24	21
<b>Lipídio (%)</b>	18	16

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

### 4.3 Parasito

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

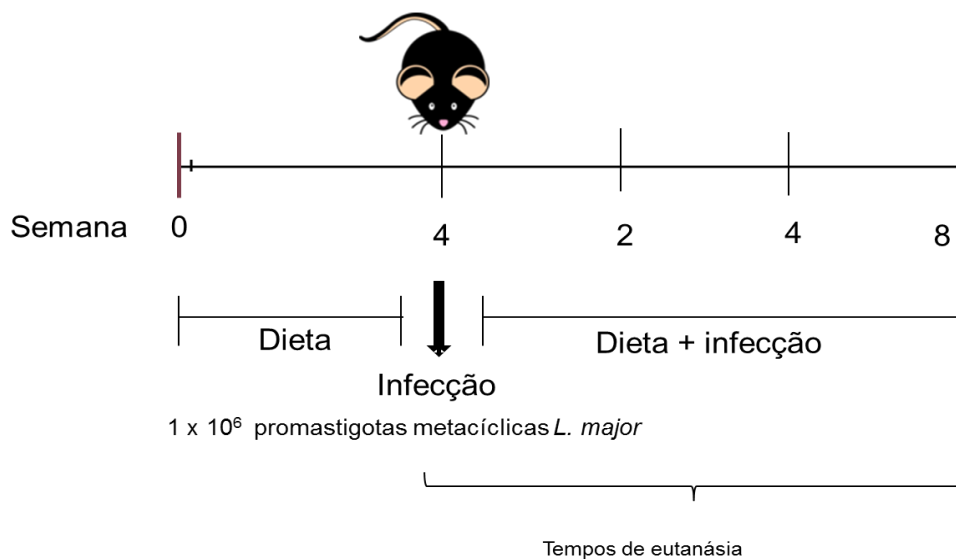
### 4.4 Obtenção do antígeno

Para preparação do antígeno particulado total de *L. major* os parasitos foram cultivados em garrafas de 75cm<sup>2</sup> de poliestireno por 2 a 3 dias, ou seja, fase logarítmica de crescimento. As células foram centrifugadas e lavadas com salina

tamponada com fosfato (PBS) por duas vezes. Após a obtenção de aproximadamente  $10^9$  parasitos os mesmos foram rompidos por choque térmico, sendo congelados em nitrogênio líquido e descongelados em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ , por sete vezes. Foi retirada uma alíquota para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). A concentração foi ajustada para  $1\text{mg/mL}$  e o antígeno foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do uso.

#### 4.5 Desenho experimental

Camundongos fêmeas C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas foram separados em dois grupos: animais controles alimentados com dieta AIN 93G e animais experimentais alimentados com dieta indutora de obesidade (HSF). Iniciou-se o tratamento com as dietas AIN 93G e HSF e após 4 semanas de dieta os animais foram infectados com  $1 \times 10^6$  promastigotas metacíclicas de *Leishmania major* e acompanhados até a oitava semanas de infecção, sendo que a dieta foi mantida durante todo o período. Semanalmente, os animais tiveram o peso corporal, glicemia de jejum e a ingestão alimentar avaliados. Os sacrifícios foram realizados com 4 semanas de dieta, 2, 4 e 8 semanas de infecção (**Figura 3**).



**Figura 3:** Desenho experimental. Na quarta semana de dieta (4) os animais obesos e controles foram submetidos à infecção por  $1 \times 10^6$  *L. major* e analisados durante 8 semanas.

#### **4.6 Infecção por *Leishmania major***

Para infecção, foram utilizados  $1 \times 10^6$  promastigotas metacíclicas obtidas após 5 dias de cultivo, fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram inoculados por via subcutânea na orelha esquerda de cada animal (10  $\mu$ L). O curso de infecção foi acompanhado semanalmente por meio do cálculo da diferença entre o diâmetro e a espessura da orelha infectada e da orelha não infectada. O diâmetro da lesão foi obtido com paquímetro (Starret).

#### **4.7 Quantificações de parasitas na orelha**

Após a eutanásia, coletou-se a orelha infectada. A orelha infectada foi picotada em eppendorf® estéril. Em seguida foi macerado o tecido infectado com PBS. Esse ensaio foi realizado conforme descrito por (Vieira *et al.*, 1996). Em tubos falcon® de 15 mL foi completado o volume para 4 mL com PBS estéril e logo em seguida o material foi centrifugado a 150 x g por 1,5 min a 4°C para retirada de fragmentos de tecido remanescentes. O sobrenadante foi centrifugado a 1540 x g por 10 min a 4°C. O sedimento foi, então, recuperado em 450  $\mu$ L de meio Grace acrescido de 20% de soro fetal bovino, L-glutamina a 2 mM e 20  $\mu$ g/mL de sulfato de gentamicina. O material foi distribuído, em duplicatas, em placa estéril de 96 poços. Fez-se diluição seriada 1:10 por 12 poços subsequentes. A placa foi incubada em estufa a 25°C por 10 dias, quando foi feita a leitura do crescimento de parasitas, em microscópio invertido (Zeiss). O resultado obtido foi expresso como o logaritmo do inverso da maior diluição que apresentou crescimento positivo de parasitos.

#### **4.8 Coleta de sangue**

As amostras de sangue foram retiradas após jejum de 6 a 8 horas. Ao término do experimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (70 mg/kg) e Xilazina (11,5 mg/kg) (preconizado pelo CEUA Da UFMG) e foram eutanasiados por exanguinação pela artéria femural. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos em



centrifuga de mesa eppendorf para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

#### 4.9 Cultura de células

Os órgãos coletados para cultura foram linfonodo cervical drenante e o baço. Os órgãos foram processados em homogeneizador de vidro (Afonso and Scott 1993) e as células ajustadas na concentração  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI (HYCLONE – Logan, Utah, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab – Campinas, SP, BR), 2mM de L-glutamina (GIBCOBRL – Life Technologies, Grand Island, NY, MO, EUA), 25mM de HEPES (SIGMA – St. Louis, MO, EUA), 50 $\mu\text{M}$  de 2-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech – Uppsala, Suíça) e 20  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de gentamicina (Schering-Plough – Rio de Janeiro). As células foram plaqueadas (100  $\mu\text{L/poço}$ ) em placas de cultura de poliestireno de 96 poços (Falcon, Lincoln Park) e incubadas por 72 horas em estufa umidificada a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Para avaliação da produção de citocinas as células foram estimuladas com 50 $\mu\text{g/mL}$  de antígeno de *Leishmania major*. O sobrenadante foi coletado 72 horas e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

#### 4.10 Medida do título de anticorpos específicos

O nível de anticorpos foi determinado por ELISA de captura utilizando-se 20 $\mu\text{g/mL}$  de antígeno particulado de *L. major* para sensibilizar as placas de ELISA (Max-sorp, NUNC). A diluição dos soros foi 1:10 em PBS contendo 0,5% de caseína. Os níveis de IgG1 e IgG2a no soro foram detectados com anticorpos de cabra específicos para imunoglobulinas de camundongos IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, EUA). O ensaio foi revelado pela reação pela enzima peroxidase e como substrato peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30V) e o efeito colorimétrico foi atribuído pela orto-fenileneamina (OPD) (Sigma Chemical Co.) diluído em tampão citrato pH 4,5. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico. Os resultados foram expressos em valores de absorvância em leitura espectrofotométrica a 492nm.

#### **4.11 Dosagens bioquímicas**

As frações de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos foram quantificados por Kit enzimático colorimétrico (Bioclin). Foi utilizado como amostra soro obtido livre de hemólise. De acordo com as informações do fabricante a amostra foi colocada em contato com os reagentes incubadas por 5 minutos a 37°C. Para dosagem do HDL, o VLDL, LDL e quilomícron foram precipitados com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o HDL foi determinado no sobrenadante. Os resultados foram expressos em valores de absorbância em leitura espectrofotométrica a 500nm.

#### **4.12 Avaliações da glicemia**

Para realização das avaliações glicêmicas os animais foram mantidos em jejum durante 8 horas. Para realização da glicemia de jejum foram coletados sangue da veia caudal. A glicemia foi medida em mg/dL com glicosímetro e tiras (Accu - Chek Performa®). Para realização do teste de tolerância oral a glicose (TTOG) a glicose foi dada por gavagem a uma concentração de 2 g / kg de peso corporal. A glicemia foi medida em mg/dL com glicosímetro e tiras (Accu - Chek Performa®) antes da gavagem de glicose e nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos depois.

#### **4.13 Ensaio imunoenzimático para medida da concentração de citocinas em sobrenadante de cultura**

As placas foram sensibilizadas com 50 µL/poço de anticorpos monoclonais (Propetech) reativos contra INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-17, 1µg/mL (Propetech), diluídos em PBS e mantidas *overnigth* a temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução salina com 0.05% de tween 20 e bloqueadas com 200 µL/poço de PBS-BSA 1%, por, no mínimo, 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes e as placas foram incubadas por 2 horas em estufa de 37°C. Logo após, as placas foram novamente lavadas e foram incubados por mais 2 horas à temperatura ambiente com 50µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para INF- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-4 (Propetech) e TGF- $\beta$  (R&D SYSTEMS) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/mL. Uma

solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (50  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:2000 foi adicionada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,5mg/mL ABTS em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de uma solução de SDS a 1%. A absorbância ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

#### **4.14 Dosagem de óxido nítrico (NO)**

O sobrenadante das culturas de células do baço e do linfonodo cervical de camundongos infectados foram incubadas em placas de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml. A produção de óxido nítrico foi medida como nitrito no sobrenadante de cultura usando a reação de Griess (Green *et al.*, 1982).

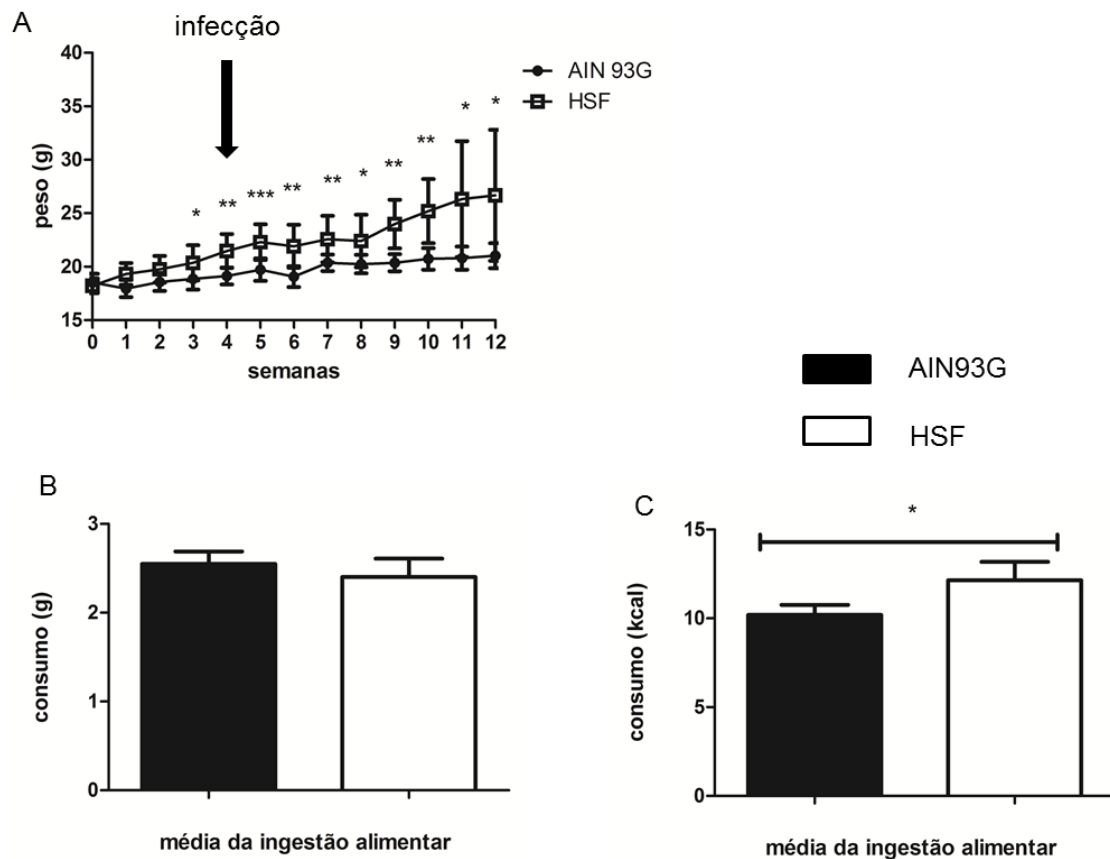
#### **4.15 Análise estatística dos dados**

Os dados foram inicialmente analisados usando o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar sua simetria. Como todos os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizado teste T de *Student* e Anova One-Way, para comparar grupos. Foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação do modelo de obesidade: ganho de peso e ingestão alimentar

Sabendo que o aporte calórico positivo, em virtude do consumo alimentar superior ao gasto energético, é a principal causa da obesidade (Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults - The Evidence Report. National Institutes of Health., 1998; Blackburn *et al.*, 2010) utilizamos no modelo experimental em questão uma dieta hipercalórica para induzir o ganho de peso. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão AIN 93G (controle) ou com dieta hipercalórica rica em gordura e açúcar (HSF) e após quatro semanas consumindo essas dietas, os mesmos já apresentavam diferenças significativas de peso (**Figura 4A**). O consumo alimentar foi monitorado semanalmente. Observa-se que o grupo que consome a dieta HSF tem um consumo de calorias superior ao grupo que consome a dieta AIN 93G (**Figura 4B**), porém consomem a mesma quantidade de dietas em gramas (**Figura 4C**). O aporte aumentado de calorias ocorre em virtude de a dieta HSF ser rica em gordura e carboidrato simples.

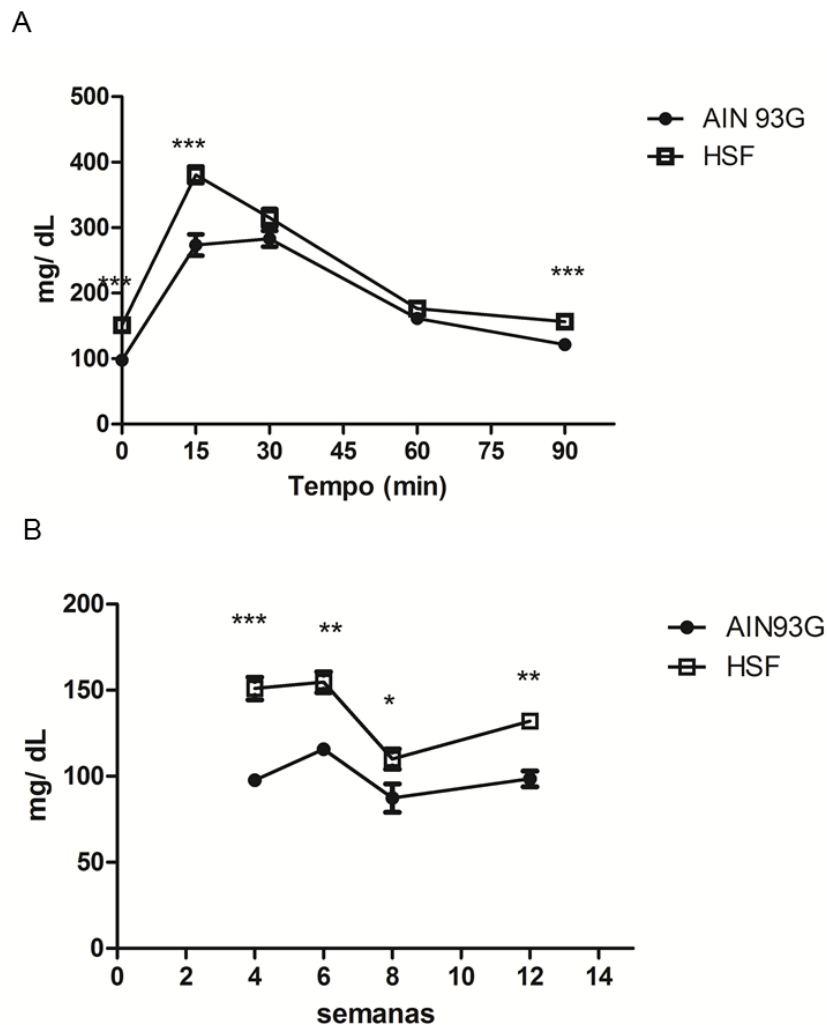


**Figura 4** - Estabelecimento da obesidade em camundongos C57BL/6: ganho de peso e ingestão alimentar. Os camundongos foram alimentados com dieta controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF) *ad libitum* durante 4 semanas. Na quarta semana os camundongos foram infectados com *L. major* na orelha. O peso e a ingestão alimentar foram aferidos semanalmente. (A) representa as medidas de peso dos camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle (AIN 93G) e dieta hipercalórica durante doze semanas (4 semanas de dieta + 8 semanas dieta com infecção). (B) representa a média dos dados de ingestão alimentar quantificados em grama por dia (média dos dias de experimento). (C) representa a média dos dados de ingestão alimentar quantificados em quilocalorias consumidas por dia (os valores representam a média de calorias consumidas por cada dia do experimento). Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  e \*\*\* =  $p < 0,0005$ ). Os resultados são representativos de quatro experimentos desenvolvidos independentemente.

## 5.2 Avaliação das alterações de glicemia em camundongos que consumiram dieta hipercalórica antes e após a infecção por *Leishmania major*

Em nosso modelo, após indução da obesidade verificou-se as alterações glicêmicas nos camundongos para assegurar que os animais estavam intolerantes a glicose antes da infecção. Após quatro semanas consumindo a dieta hipercalórica os camundongos apresentaram intolerância a glicose verificada pelo teste de tolerância

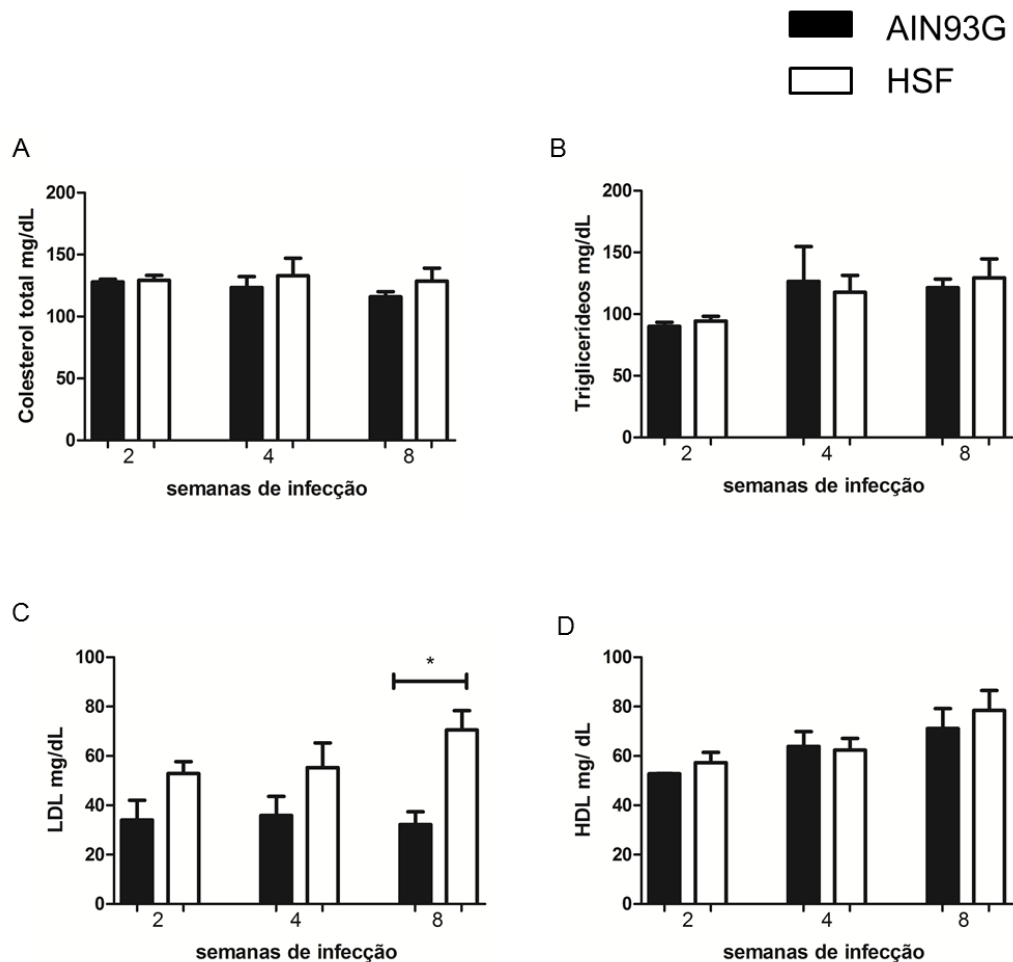
oral a glicose (TTOG). A glicemia basal dos camundongos que consomem a dieta hipercalórica foi mais alta que a dos camundongos que consomem dieta padrão (**Figura 5A**). Após quatro semanas de dieta os camundongos foram infectados e a glicemia de jejum foi aferida semanalmente. Os camundongos alimentados com a dieta HSF apresentam maiores valores de glicemia de jejum que seu controle (**Figura 5B**).



**Figura 5** - Avaliação das alterações de glicemia em camundongos que consumiram dieta hipercalórica antes e após a infecção por *Leishmania major*. Foi realizado o teste de tolerância oral a glicose nos camundongos alimentados durante 4 semanas com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF). Após a quarta semana foi realizado semanalmente o teste de glicemia de jejum. (A) representa os dados do teste de tolerância oral a glicose em animais não infectados na quarta semana de dieta. Os camundongos ficaram em jejum durante 8 horas, posteriormente receberam solução de glicose (30%) e tiveram sua glicemia aferida nos tempo 0, 15, 30, 60 e 90 minutos. (B) representa os dados de glicemia de jejum em animais infectados. A glicemia foi aferida após 8 horas de jejum. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  e \*\*\* =  $p < 0,0005$ ). Os resultados são representativos de quatro experimentos desenvolvidos independentemente.

### 5.3 Alterações de lipídeos séricos em camundongos que consumiram dieta hipercalórica infectados com *Leishmania major*

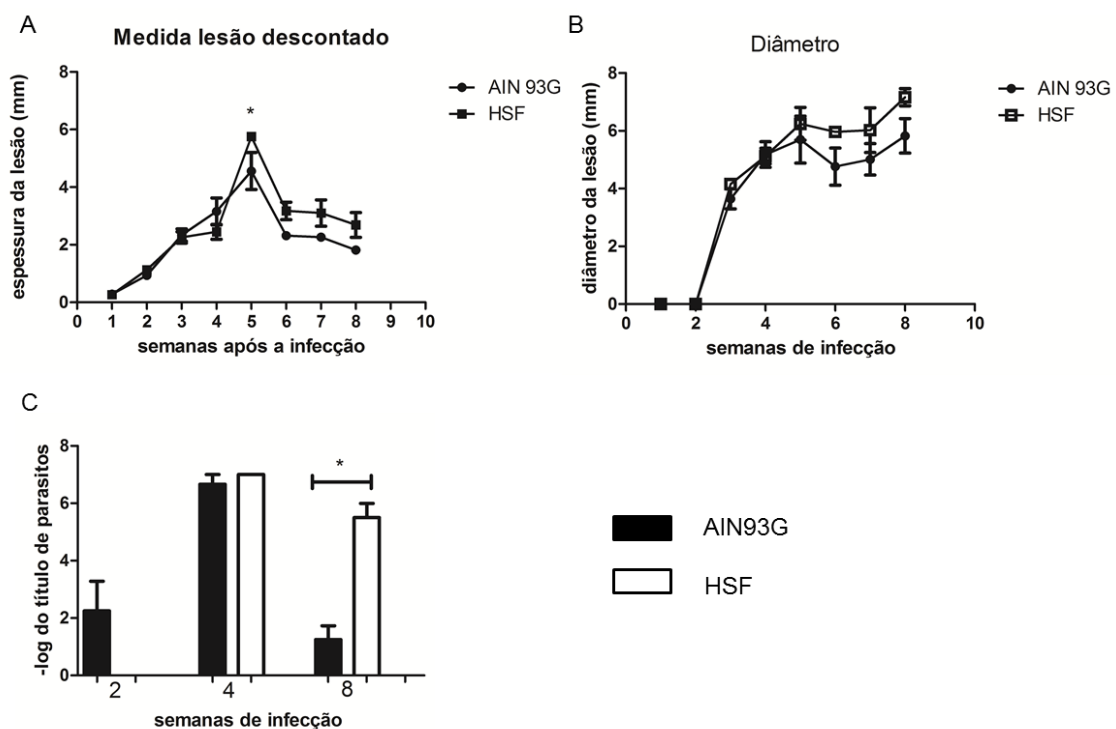
Para avaliar o impacto da dieta hipercalórica em associação com a infecção por *L. major* sobre a fração de lipídeos séricos foram medidos colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL nos tempos 2, 4 e 8 semanas após a infecção, ou seja, 6, 8 e 12 semanas de consumo de dieta, respectivamente. Não observamos diferenças significativas para colesterol total, triglicerídeos e HDL (**Figura 6A, 6B e 6D**). A fração de LDL mostrou diferença significativa na oitava semana de infecção (**Figura 6C**), ou seja, após receber dieta durante 12 semanas.



**Figura 6** - Alterações de lipídeos séricos nos camundongos infectados com *Leishmania major*. Foram realizadas MEDIDAS de colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL nos camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF). As dosagens foram realizadas nos tempos: 2, 4 e 8 semanas de infecção. (A) representa os dados da dosagem de colesterol total. (B) representa os dados de triglicerídeos. (C) representa os dados de LDL. (D) representa os dados de HDL. O soro dos camundongos foi coletado após 8 horas de jejum. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  e \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Os resultados são representativos de quatro experimentos desenvolvidos independentemente.

#### 5.4 Avaliação da medida de lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*

O cálculo da espessura da lesão mostra que houve aumento na lesão no grupo que consumiu dieta hipercalórica (HSF) na quinta semana de infecção quando comparado ao grupo controle que consumiu dieta padrão (AIN 93G). Nos demais tempos os camundongos apresentaram o mesmo perfil em relação ao tamanho da lesão (**Figura 7A**). Em relação ao diâmetro da lesão não houve diferença entre os grupos (**Figura 7B**). Com relação à quantificação dos parasitos, observamos na oitava semana, maior parasitismo nos camundongos obesos quando comparado aos camundongos controle (**Figura 7C**).

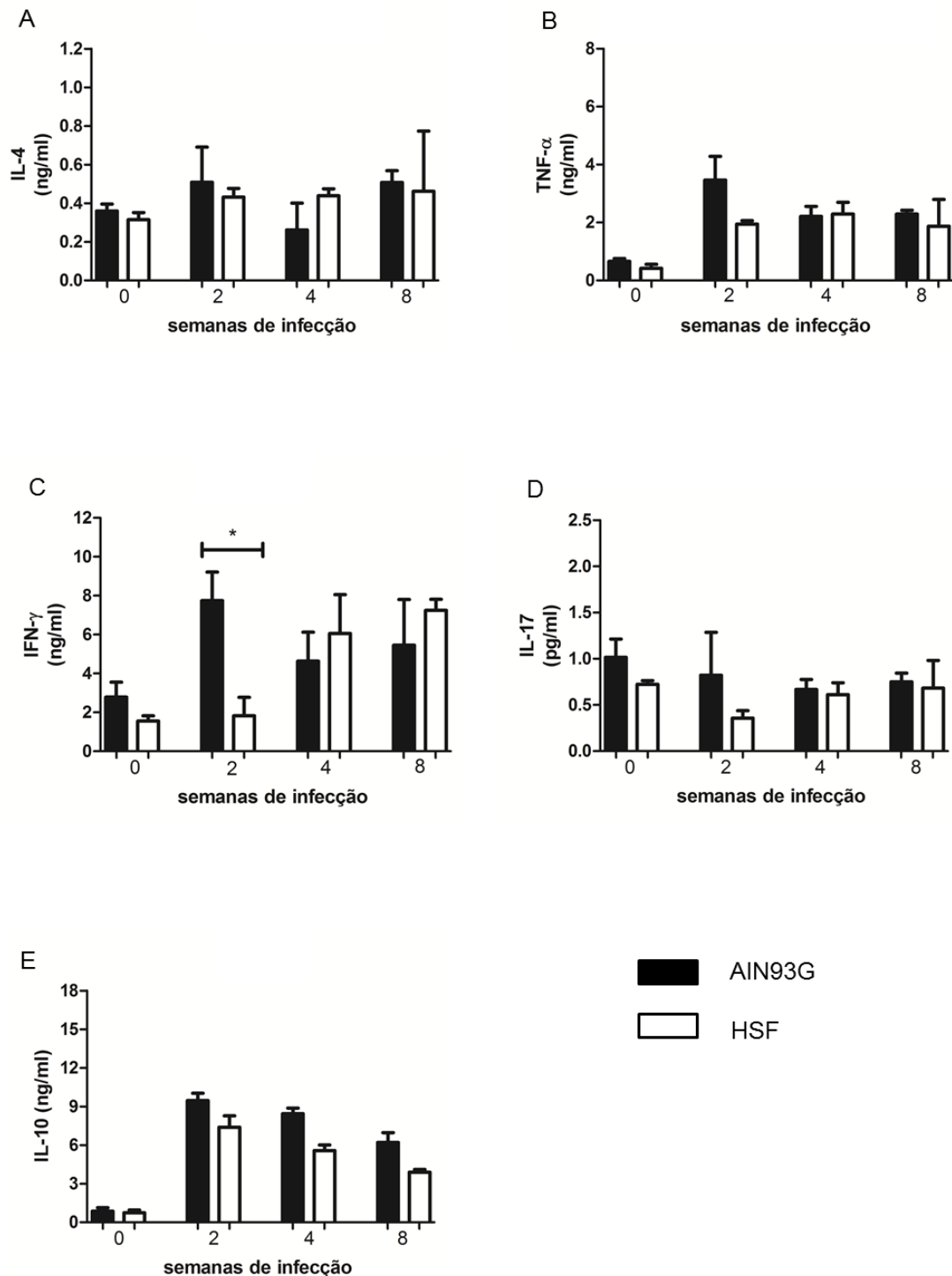


**Figura 7** - Avaliação da medida de lesão e carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Os camundongos foram infectados na orelha com  $1 \times 10^6$  formas promastigotas metacíclicas de *L. major* e as lesões foram medidas semanalmente. **(A)** representa as medidas das orelhas dos camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF) até a oitava semana de infecção. A média dos valores das orelhas de camundongos não infectados foi subtraída de cada orelha infectada para estimativa das lesões provocadas. **(B)** representa o diâmetro das lesões nas orelhas de camundongos durante 8 semanas de infecção. **(C)** representa a carga de parasitos nas orelhas de camundongos. Os valores de carga parasitária foram aferidos nos tempos 2, 4 e 8 semanas de infecção. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$ ). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.



### 5.5 Avaliação do perfil das citocinas IL-4, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 produzidas por células de baço de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*

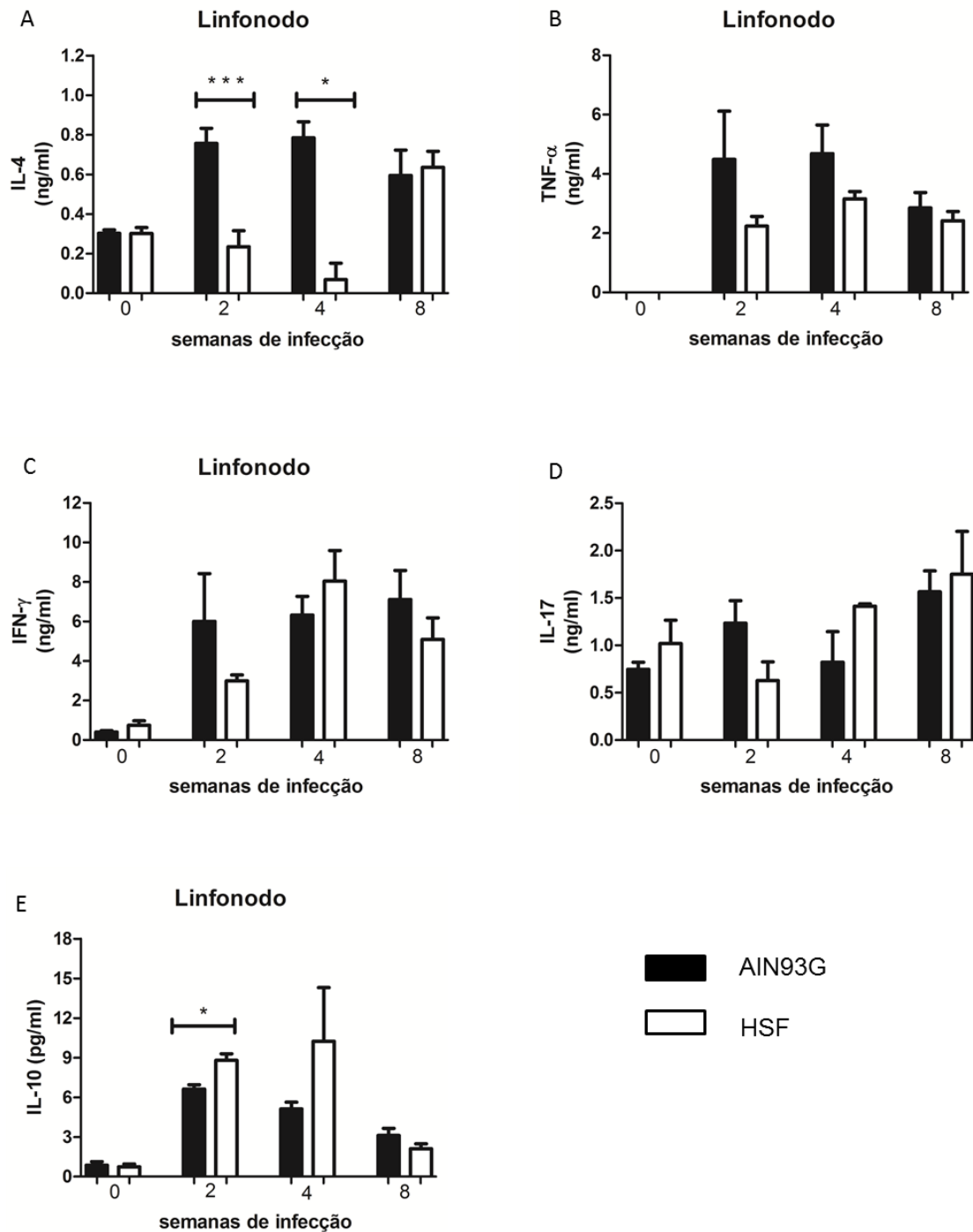
Com o objetivo de avaliar o efeito da dieta hipercalórica associada à infecção de *L. major* no perfil da resposta inflamatória, avaliamos a produção de citocinas IL-4, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 no sobrenadante de cultura de células de baço de camundongos tratados com dieta hipercalórica e camundongos tratados com a dieta AIN 93G. Com relação aos níveis de IL-4 não observamos diferenças significativas entre os grupos durante todos os tempos analisados (**Figura 8A**). Ao avaliarmos a produção de INF- $\gamma$ , observamos que, na segunda semana os camundongos alimentados com a dieta HSF apresentaram menores níveis dessa citocina quando comparados ao grupo alimentado com a dieta AIN 93G. Interessantemente somente partir da quarta semana após a infecção observamos aumento de INF- $\gamma$  no grupo HSF, enquanto no grupo AIN 93G esse aumento foi observado à partir da segunda semana de infecção (**Figura 8B**). Embora não tenha sido observado diferença nos níveis de TNF- $\alpha$  entre os grupos AIN 93G e HSF observamos aumento do nível dessa citocina à partir da segunda semana de infecção (**Figura 8C**). Observamos que a produção de IL-17 no baço não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 8D**). Quando avaliamos a produção de IL-10 no baço observamos que essa citocina não apresentou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 8E**).



**Figura 8.** Avaliação do perfil de citocinas produzidas por células de baço de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Foram realizadas medidas de IL-4, TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$ , IL-17 e IL-10 por ELISA nos sobrenadantes de cultura de células de baço de camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hiperclórica (HSF). As células foram coletadas e ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^6$ /ml de cultura e estimuladas com antígeno particulado de *L. major* na concentração de  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Para as células de animais não infectados (tempo zero) foi utilizado ConA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) como estímulo. As medidas. (A) representa os dados de IL-4. (B) representa os dados de TNF-  $\alpha$ . (C) representa os dados de IFN  $\gamma$ . (D) representa os dados de IL-17. (E) representa os dados de IL-10. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,005$  e \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

## **5.6 Avaliação do perfil das citocinas IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 no sobrenadante de células do linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major***

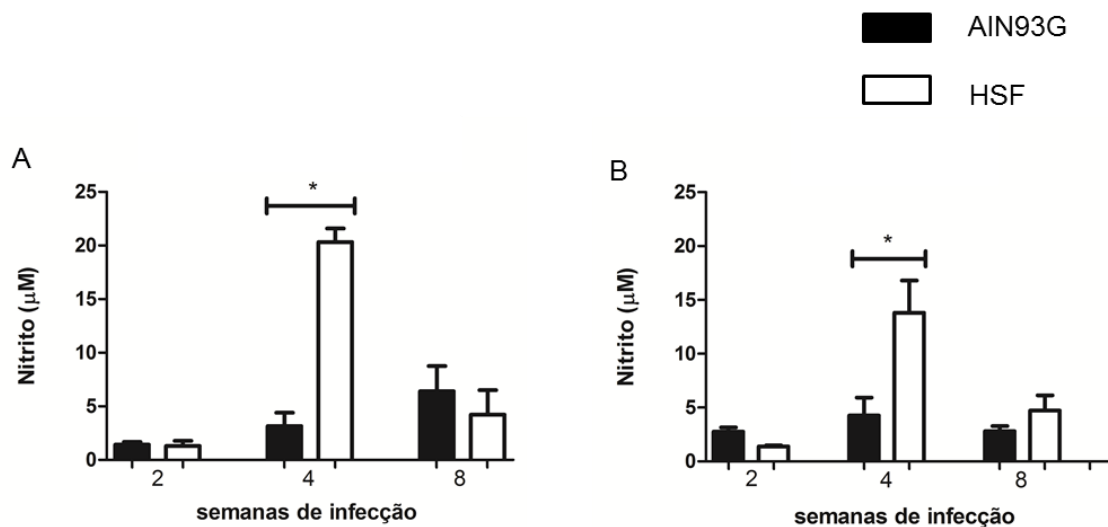
Foi avaliada a produção das citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-10 e IL-17 em sobrenadante de cultura de células do linfonodo drenante (cervical) dos camundongos. Observamos, na segunda e na quarta semana de infecção, níveis significativamente diminuídos de IL-4 em camundongos alimentados com a dieta hipercalórica (HSF) quando comparado ao grupo AIN 93G (**Figura 9A**). Ao observarmos os níveis de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no linfonodo cervical podemos verificar aumento do nível dessas citocina à partir da segunda semana de infecção em todos os grupos (**Figura 9B-C**). Observamos que a produção de IL-17 no linfonodo cervical não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos avaliados quando comparamos os grupos (**Figura 9D**). Notamos que, no grupo HSF, a produção de IL-10 aumenta na segunda semana de infecção, no entanto, a partir da quarta semana os níveis dessa citocina se igualam aos níveis do controle (**Figura 9E**).



**Figura 9.** Avaliação do perfil de citocinas produzidas por células de linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Foram realizadas medidas de IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 por ELISA nos camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF). As dosagens foram realizadas nos tempos: 0, 2, 4 e 8 semanas de infecção. As células foram coletadas e ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^6$ /ml de cultura e estimuladas com antígeno particulado de *L. major* na concentração de  $50 \mu\text{g/ml}$ . Para as células de animais não infectados (tempo zero) foi utilizado ConA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) como estímulo. (A) representa os dados de IL-4. (B) representa os dados de TNF- $\alpha$ . (C) representa os dados de IFN- $\gamma$ . (D) representa os dados de IL-17. (E) representa os dados de IL-10. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  e \*\*\* =  $p < 0,0005$ ). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

### 5.7 Avaliação da produção de óxido nítrico por células de baço e do linfonodo cervical de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*

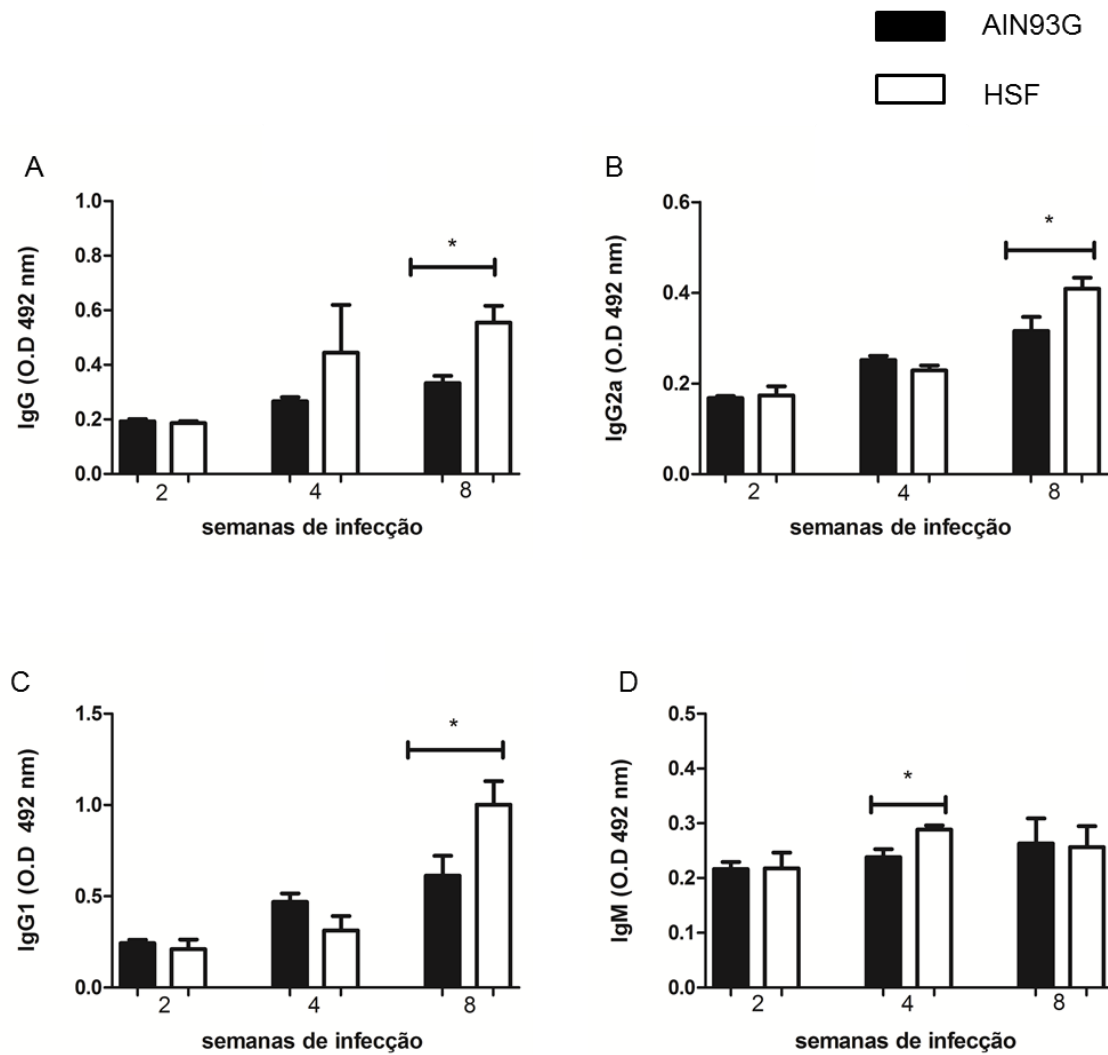
A produção de nitrito foi avaliada com o objetivo de inferir a quantidade de óxido nítrico produzido por células de baço e do linfonodo drenante (cervical) dos camundongos. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos no baço (**Figura 10A**) e no linfonodo (**Figura 10B**), ambos na quarta semana de infecção.



**Figura 10.** Avaliação da concentração de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células de baço e do linfonodo drenante de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Foi realizada a medida da concentração de óxido nítrico para inferir a produção de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células de baço e do linfonodo drenante de camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF). As dosagens foram realizadas nos tempos: 0, 2, 4 e 8 semanas de infecção. As células foram coletadas e ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^6$ /ml de cultura e estimuladas com antígeno particulado de *L. major* na concentração de  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Para as células de animais não infectados (tempo zero) foi utilizado ConA ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) como estímulo. (A) representa os dados de nitrito no sobrenadante de células de baço. (B) representa os dados de nitrito no sobrenadante de células de linfonodo. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$  e \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

### **5.8 Avaliação do perfil de imunoglobulinas presentes no soro de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*.**

As imunoglobulinas IgG total, IgG1, IgG2a e IgM foram avaliadas em soro de camundongos alimentados com dieta padrão (AIN 93G) e dieta hipercalórica (HSF) e infectados com *L. major*. Verificou-se que na oitava semana os camundongos alimentados com a dieta hipercalórica (HSF) apresentam maior título de anticorpos totais (IgG) circulantes quando comparado ao grupo que recebeu a dieta AIN 93G frente ao antígeno particulado de *L. major* (**Figura 11A**). Em relação a IgG 1, os camundongos obesos apresentam maior produção de IgG1, na oitava semana, quando comparado aos camundongos controles (**Figura 11B**). Com relação a produção de IgG2a o grupo alimentado com a dieta hipercalórica (HSF) apresenta maior produção desse anticorpo quando comparado ao grupo alimentado com a dieta padrão (AIN 93G) na oitava semana (**Figura 11C**). Já a produção de IgM apresentou níveis aumentados no camundongo experimental quando comparado ao seu controle na quarta semana (**Figura 11D**).



**Figura 11.** Avaliação do perfil de imunoglobulinas no soro de camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major*. Foram realizadas dosagens de IgG total, IgG1, IgG 2a e IgM em soro de camundongos alimentados com as dietas controle (AIN 93G) e hipercalórica (HSF). As dosagens foram realizadas nos tempos: 2, 4 e 8 semanas de infecção. Para sensibilização da placa foi utilizado antígeno particulado de *L. major* na concentração de 20 $\mu$ g/ml. (A) representa os dados de IgG total. (B) representa os dados de IgG 1. (C) representa os dados de IgG 2a. (D) representa os dados de IgM. Análise estatística feita pelo teste *t student* (\* =  $p < 0,05$  e \*\*\* =  $p < 0,005$ ). Os resultados são representativos de dois experimentos desenvolvidos independentemente.

## 6 DISCUSSÃO

A obesidade resulta em alterações imunológicas que podem levar ao desequilíbrio na produção e liberação das citocinas pró e anti-inflamatórias, estimular o infiltrado progressivo de macrófagos no tecido adiposo e induzir respostas inflamatórias ou de hipersensibilidade (Prado *et al.*, 2009). No entanto, ainda não estão claros quais são os efeitos imunológicos da obesidade sobre os mecanismos das doenças (Raj *et al.*, 2014). Portanto, sabendo que fatores dietéticos são importantes no desenvolvimento da obesidade e disfunções metabólicas e que o aporte calórico positivo é a principal causa da obesidade (Ng *et al.*, 2010; Sampey *et al.*, 2011), foi utilizado neste estudo um modelo experimental de dieta hipercalórica para induzir o ganho de peso dos animais. Os camundongos dos grupos AIN 93G (dieta padrão) e HSF (dieta hipercalórica) consomem a mesma quantidade de dieta, porém o grupo que consome dieta hipercalórica apresenta maior consumo em calorias. O consumo aumentado de calorias permitiu o ganho de peso. Dessa forma, sabendo do impacto que o ganho de peso gera sobre o metabolismo e a importância do tecido adiposo sobre sistema imunológico (Prado *et al.*, 2009; Santos and Torrent, 2010; Ohashi *et al.*, 2014), este estudo teve como objetivo avaliar qual seria o curso da infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6 obesos, já que este animal representa um modelo clássico de resistência a esse parasito. Trabalhos que relacionam a obesidade à doenças infecto-parasitárias ainda são escassos na literatura. Alguns estudos descrevem a interação de protozoários com o acúmulo de gordura decorrente da obesidade. Um estudo desenvolvido por Vieira e colaboradores (1994), mostrou que o *Trypanosoma cruzi* é capaz de se desenvolver no adipócito e isso faz com que ocorra uma infecção crônica que pode gerar agravo na doença. Em estudos experimentais, o *T. cruzi* também se desenvolve no tecido adiposo e leva ao aumento da expressão do receptor TLR4 e maior proliferação de macrófagos (Nagajyothi *et al.*, 2012). Já em experimentos com camundongos transgênicos que desenvolvem obesidade (*db/db*), houve aumento da mortalidade dos animais infectados com *T. cruzi* e maior parasitismo do miocárdio (Machado *et al.*, 2012), confirmando a susceptibilidade aumentada a protozoários em animais obesos. Neste estudo, o mesmo foi observado, visto que animais obesos apresentaram com 8 semanas de infecção uma carga parasitária maior que animais não obesos.



Considerando dados que correlacionam obesidade e sistema imunológico (Prado *et al.*, 2009; Santos and Torrent, 2010; Ohashi *et al.*, 2014), na infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, era de se esperar que nesses animais a resposta imunológica seria exacerbada com conseqüente eliminação do parasito . Possivelmente, esta resposta imunológica do organismo é devido ao fato de que o tecido adiposo é um importante secretor de TNF- $\alpha$  e essa citocina é importante ativadora da produção de INF- $\gamma$  e também promotora da ativação de macrófago. Porém, neste trabalho, observou-se que os animais obesos e com alterações metabólicas, ao contrário dos animais com peso normal, apresentaram lesão aumentada e manutenção da carga parasitária até a oitava semana. Dessa forma, é imprescindível que se conheça qual a influência da obesidade, induzida por dieta hipercalórica, e de suas conseqüentes alterações metabólicas sobre o orquestramento da resposta imunológica frente a *L. major*.

A obesidade é uma doença complexa, multifatorial e que está relacionada ao aumento da mortalidade, uma vez que o excesso de tecido adiposo no organismo pode levar a danos a saúde (WHO, 2000). Está intimamente relacionada à resistência à insulina e ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2. Neste modelo experimental, os camundongos obesos apresentaram alterações glicêmicas. Após quatro semanas consumindo a dieta hipercalórica os camundongos do grupo HSF apresentaram intolerância à glicose, verificada pelo teste de tolerância oral a glicose (TTOG), e taxas de glicemia de jejum mais elevadas que às dos animais do grupo AIN 93G, confirmando que estes animais apresentaram aumento de peso com alterações metabólicas, resultado este de extrema relevância para a condução das demais avaliações. Estudos de Elased e colaboradores (1996) mostram que parasitos celulares podem induzir a hipoglicemia diretamente por estimular a produção de insulina, ou indiretamente pela alta produção de TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  estimula moléculas semelhantes à insulina e induz à reduzir a glicemia dos animais. A associação desses dois mecanismos gera hipoglicemia, que está intimamente relacionada ao curso da doença e pior prognóstico. Os resultados observados por Elased e colaboradores (1996) contradizem os nossos dados, pois mesmo o TNF- $\alpha$  sendo um importante fator para reduzir a glicemia em casos de doenças com parasitos celulares, os animais deste estudo apresentaram hiperglicemia, sugerindo que possivelmente os mecanismos da obesidade que favorecem a hiperglicemia sobrepõe a habilidade do TNF- $\alpha$  em gerar quadros de hipoglicemia. Estudos com

malária em roedores relacionam um pior prognóstico da doença em casos de hipoglicemia (Elased *et al.*, 1996).

O desencadeamento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares em organismos com excesso de tecido adiposo já é bem estabelecido na literatura. Seu impacto sobre o sistema cardiovascular se dá especialmente pelo acúmulo de tecido adiposo e consequente alteração sobre a fração de lipídeos séricos (Ng *et al.*, 2010; Sampey *et al.*, 2011). Neste trabalho os animais alimentados com dieta hipercalórica apresentaram na oitava semana de infecção aumento na fração de LDL. Esse dado corrobora outros achados da literatura de que a utilização da dieta HSF leva ao ganho de peso e alterações metabólicas sistêmicas, inclusive sobre a fração de lipídeos séricos (dados não publicados). Estudos evidenciam aumento do colesterol e LDL em roedores e coelhos infectados (Esteve *et al.*, 2005). Em seu trabalho, Nieto *et al.*, (1992) observam um aumento de colesterol total e LDL ao estudarem cães infectados com *L. infantum*. Os autores sugerem que a alteração nessa fração de lipídeos séricos deriva da alteração hepática causada pela doença. Como a obesidade altera o tecido hepático, o aumento de LDL observado pode também ser em virtude dessa alteração. Em seu estudo, Fernandes e colaboradores (2013) mostrou que o aumento da fração de colesterol total e LDL aumentados em camundongos infectados com *L. major*. A análise dos dados publicados evidenciam que tanto a dieta quanto a infecção podem gerar alteração sobre a fração de lipídeos séricos, sendo coniventes aos resultados observados neste trabalho.

Neste estudos observou-se alterações no curso da infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica, identificados por aumento da lesão na quinta semana se infecção e persistência de parasitos na lesão até a oitava a semana de infecção. Estudos recentes têm evidenciado que a resposta imunológica alterada em indivíduos obesos pode influenciar no curso das infecções (Vaillant *et al.*, 2009; Karlsson and Beck, 2010). O impacto do tecido adiposo excessivo em pacientes críticos é perceptível. Pacientes obesos são mais suscetíveis à adquirem infecção hospitalar, tem maior de risco de desenvolverem doenças do trato urinário, pneumonias e asma. Além disso, se comportam de maneira de diferente à antibiótico terapia, embora os mecanismos para esse processo ainda não estejam evidenciados(De Heredia *et al.*, 2012; Milner and Beck, 2012; Yuan and Chen, 2013; Diaz and Farzan, 2014; Raj *et al.*, 2014). Outros trabalhos mostram diminuição da resposta imune em obesos com infecções

adquiridas por fungos, vírus ou bactérias (Vaillant *et al.*, 2009; Karlsson and Beck, 2010; Nave *et al.*, 2011; Sheridan *et al.*, 2012). Em seu estudo, Karlsson e Beck (2010), sugerem alguns mecanismos pelos quais a obesidade poderia influenciar a resposta imune em hospedeiros, como inflamação exacerbada, alteração na sinalização de adipocinas, alterações metabólicas e até regulação epigenética, embora ainda estas ainda sejam desconhecidas.

Buscando identificar explicações para os dados relativos ao tamanho da lesão e carga parasitária, investigamos o perfil de citocinas. Conforme esperado, animais da linhagem C57BL/6 apresentam naturalmente baixos níveis de IL-4 (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Observou-se que animais obesos produzem quantidades reduzidas de IL-4 quando comparado ao grupo controle. Esses dados contrapõe aos dados observados no trabalho de Raj, Kabra e Lodha (2014) que, embora haja controvérsias em relação ao equilíbrio da produção de citocinas induzindo respostas Th1 e Th2 na obesidade, sua associação com algumas doenças está relacionada à inclinação da resposta para o perfil Th2. Conforme já é descrito na literatura, os níveis de TNF- $\alpha$  aumentam logo após a infecção (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Neste estudo observou-se, ao comparar animais não infectados com os infectados, um aumento nessa citocina, porém, nos demais tempos analisados avaliando animais obesos com animais de peso normal, não observamos variação entre os grupos. O IFN- $\gamma$  é a principal citocina que atua na eliminação do parasito (Sacks and Noben-Trauth, 2002), uma vez que ativa mecanismos efetores presentes nos macrófagos. Normalmente aumenta logo após o início da infecção e seus níveis começam a decair ao final da infecção. Esse mecanismo é importante na eliminação do parasito, uma vez que está relacionado à ativação de iNOS. Neste estudo, nos animais obesos, os níveis de IFN- $\gamma$  se mantiveram significativamente mais baixos na segunda semana e só começaram a aumentar por volta da quarta semana de infecção. Essa baixa nos níveis de IFN- $\gamma$  em uma fase importante para a eliminação do parasito pode estar diretamente relacionada à maior permissividade do parasito no hospedeiro com persistência do mesmo na lesão até a oitava semana. Estudos com *L. amazonensis* mostram que baixos níveis de IFN- $\gamma$  podem favorecer a replicação do parasito (Qi *et al.*, 2004).

Neste trabalho observou-se que animais obesos apresentam uma resposta diferente dos animais com peso normal em relação à produção de IL-10, com níveis aumentados no linfonodo na segunda semana de infecção. Os dados observados

para IL-10 no linfonodo contradiz aos dados observados por Esposito e colaboradores (2003), que observaram redução na produção de IL-10 no tecido adiposo de animais obesos (Esposito *et al.*, 2003; Gotoh *et al.*, 2012). Porém, outro grupo de estudo correlacionou obesidade à disfunção das células dendríticas, levando ao aumento da produção de IL-10 sistêmica. O'shea e colaboradores em seu trabalho relatam que obesos apresentam disfunção das células dendríticas, o que pode levar à desregulação da produção de citocinas, especialmente IL-4 e IL-10, gerando maior risco de infecções virais. A IL-10 reprime a ação do IFN- $\gamma$  e promove a inativação de macrófagos para eliminação do parasito via mecanismos dependentes de IFN- $\gamma$  (Moore *et al.*, 2001). A IL-10 também está associada ao aumento da atividade de arginase I nos macrófagos e consequente proliferação do parasito (Boutard *et al.*, 1995; Corraliza *et al.*, 1995). As células T reguladoras e seus produtos têm sido relacionados à susceptibilidade aumentada à infecção por *L. major* em linhagens de camundongos resistentes (Anderson *et al.*, 2005) e pela persistência dos parasitos na lesão (Belkaid *et al.*, 2001).

Observou-se neste trabalho uma produção de NO aumentada no grupo obeso, porém esses animais possuem maior carga parasitária e maior lesão. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda precisa ser elucidado. A produção de óxido nítrico é um importante mecanismo de eliminação do parasito (Vieira *et al.*, 1994), porém em associação com outros fatores, não foi efetivo na eliminação do parasito. Provavelmente os baixos níveis de IFN- $\gamma$  associados aos níveis aumentados de IL-10, ambos na segunda semana, podem ter facilitado a replicação do parasito contribuindo para o aumento da carga parasitária e dificultando sua eliminação por mecanismos classicamente efetores na eliminação do parasito como a produção de óxido nítrico. Em seu estudo em 2013, O'shea e colaboradores mostraram que animais obesos apresentaram menor expressão de moléculas co-estimuladoras de linfócitos T, menor ativação da via *toll like receptors* (TLR) e maior produção da IL-10, o que poderia estar relacionado à maior chance de proliferação de agentes infecciosos.

Embora a resposta imune celular seja um dos principais mecanismos de eliminação do parasito na infecção por *L. major*, as imunoglobulinas auxiliam em diversos mecanismos relativos à infecção, sinalizando e interferindo nos mecanismos efetores de eliminação do patógeno. Neste estudo houve aumento de IgG total e suas frações IgG1 e Ig2a na oitava semana de infecção no grupo obeso

quando comparado ao seu controle. A IL-10 tem sua produção induzida nos macrófagos e nos neutrófilos quando elas fagocitam formas opsonizadas do parasito com IgG do hospedeiro (Kane and Mosser, 2001; Lopes *et al.*, 2014), portanto o aumento de IL-10 pode ter sido induzido pelo aumento de IgG, consequentemente, mais parasitos foram opsonizados por essa imunoglobulina. Além disso, a fagocitose de formas amastigotas opsonizadas por IgG induz a ativação de vias de sinalização que levam à produção de IL-10 por macrófagos (Yang *et al.*, 2007).

O IFN- $\gamma$ , além de ser o principal fator produzido por células Th1, é também fundamental para a manutenção dessa resposta imune, uma vez que estimula a produção de IL-12, inibe a proliferação de linfócitos Th2, e coordena a mudança de isótipo para IgG2a por linfócitos B (Snapper and Paul, 1987; Gajewski and Fitch, 1988; Gajewski *et al.*, 1988).

No entanto, mais estudos de investigação, sobre os mecanismos pelos quais os camundongos Os dados apresentados no presente estudo sugerem que a obesidade e suas complicações metabólicas parecem alterar a resposta imunológica durante à infecção por *L. major*. A alteração do perfil de citocinas (redução de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-10 ambos na segunda semana de infecção) possivelmente podem explicar os mecanismos envolvidos pelos quais os animais obesos apresentam maior lesão e maior permissividade ao parasito.

C57BL/6 obesos têm maior lesão e maior carga parasitária no decorrer da infecção, são necessários.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados observados neste trabalho deixam evidente que a obesidade altera o orquestramento da resposta imunológica frente à infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, modelo clássico de resistência a esse parasito. Os achados mais relevantes demonstram que:

- A infecção não foi capaz de influenciar as alterações metabólicas esperadas na obesidade.

- A obesidade tornou o hospedeiro mais permissivo ao parasito com consequente alteração no tamanho da lesão.

- A alteração de citocinas, redução de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-10, ambos na segunda semana, podem justificar a persistência do parasito na lesão até a oitava semana e aumento da lesão na quinta semana.

- A obesidade provocou aumento de óxido nítrico na quarta semana de infecção no baço e no linfonodo, e embora esse mecanismo seja a principal via de eliminação do parasito, não foi efetivo para sua eliminação.

- Observou-se, nos animais obesos, aumento das imunoglobulinas IgG total e os subtipos IgG1 e IgG2a o que pode ter favorecido o aumento na produção de IL-10.

Uma vez que a obesidade é uma epidemia mundial, torna-se altamente relevante melhor elucidação dos mecanismos envolvidos e melhor compreensão do curso das doenças infecciosas e parasitárias em indivíduos obesos, especialmente em populações que vivem em áreas endêmicas para doenças como as Leishmanioses. Tais resultados evidenciam o papel imunomodulador da obesidade no modelo de infecção utilizado, reforçando a importância da continuidade nas pesquisas que relacionam obesidade e doenças infecto-parasitárias.

## 8 PERSPECTIVAS

- ✓ Concluir os experimentos em andamento.
- ✓ Concluir as análises histológicas da lesão e do tecido adiposo,
- ✓ Avaliar o perfil de células inflamatórias e reguladoras no linfonodo, baço e no tecido adiposo.
- ✓ Testar outras vias de envolvidas na resposta imunológica frente à *Leishmania*, como arginase e nível de mRNA de oxido nítrico sintase.
- ✓ Submissão do artigo.

## REFERÊNCIAS

(CDC), C. F. D. C. A. P. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 58, n. 38, p. 1071-4, Oct 2009. ISSN 1545-861X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798021> >.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant? **Front Immunol**, v. 3, p. 80, 2012. ISSN 1664-3224. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566961> >.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2934-41, Mar 2005. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728505> >.

ASEFFA, A. et al. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3232-41, Sep 15 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12218142](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218142) >.

BAJÉNOFF, M. et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 619-31, Mar 2006. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505138> >.

BECKER, I. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol Biochem Parasitol**, v. 130, n. 2, p. 65-74, Aug 2003. ISSN 0166-6851. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946842> >.

BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J Exp Med**, v. 194, n. 10, p. 1497-506, Nov 2001. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714756> >.

BLACKBURN, G. L.; WOLLNER, S.; HEYMSFIELD, S. B. Lifestyle interventions for the treatment of class III obesity: a primary target for nutrition medicine in the obesity epidemic. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 1, p. 289S-292S, Jan 2010. ISSN 1938-3207. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906805> >.



BOELAERT, M. et al. The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 6, p. 639-44, Jun 2009. ISSN 1365-3156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392741> >.

BOUTARD, V. et al. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J Immunol**, v. 155, n. 4, p. 2077-84, Aug 1995. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636258> >.

BUTLAND, B. K.; STRACHAN, D. P.; RUDNICKA, A. R. C-reactive protein, obesity, atopy and asthma symptoms in middle-aged adults. **Eur Respir J**, v. 32, n. 1, p. 77-84, Jul 2008. ISSN 1399-3003. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321940> >.

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 4144-8, Dec 1985. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4067312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4067312) >.

CHANG, K. P. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 30, n. 2, p. 322-33, Mar 1981. ISSN 0002-9637. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7235125> >.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R. L. IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice. **J Immunol**, v. 148, n. 4, p. 1182-7, Feb 15 1992. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1531351](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1531351) >.

CHUNG, T. H.; KIM, M. C.; KIM, C. S. Association between Hepatitis B Surface Antigen Seropositivity and Metabolic Syndrome. **Korean J Fam Med**, v. 35, n. 2, p. 81-9, Mar 2014. ISSN 2005-6443. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24724003> >.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, n. 11, p. 2347-55, Nov 2005. ISSN 0022-2275. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150820> >.

Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. **Obes Res**, v. 6 Suppl 2, p. 51S-209S, Sep 1998. ISSN 1071-7323. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813653> >.

CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 206, n. 2, p. 667-73, Jan 1995. ISSN 0006-291X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530004> >.

COURRET, N. et al. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 11, p. 2303-16, Jun 2002. ISSN 0021-9533. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006615> >.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 2, p. 332-8, May 2012. ISSN 1475-2719. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429824> >.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 5, p. 417-23, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0738-081X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889319> >.

DIAZ, J.; FARZAN, S. Clinical implications of the obese-asthma phenotypes. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 739-51, Nov 2014. ISSN 1557-8607. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25282287> >.

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 5, p. 425-31, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0738-081X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889320> >.

ELASED, K. M.; TAVERNE, J.; PLAYFAIR, J. H. Malaria, blood glucose, and the role of tumour necrosis factor (TNF) in mice. **Clin Exp Immunol**, v. 105, n. 3, p. 443-9, Sep 1996. ISSN 0009-9104. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809132> >.

ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1055-8, Mar 2003. ISSN 0021-972X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629085> >.

ESTEVE, E.; RICART, W.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. **Clin Nutr**, v. 24, n. 1, p. 16-31, Feb 2005. ISSN 0261-5614. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681098> >.

ETGES, R.; MULLER, I. Progressive disease or protective immunity to Leishmania major infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 6, p. 372-90, May 1998. ISSN 0946-2716 (Print)

0946-2716 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9625295](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9625295) >.

FALAGAS, M. E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 438-46, Jul 2006. ISSN 1473-3099. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790384> >.

FANTUZZI, G. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases.

**Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 1-10, Oct 2013. ISSN 1096-0023. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23850004> >.

FISHER-HOCH, S. P.; MATHEWS, C. E.; MCCORMICK, J. B. Obesity, diabetes and pneumonia: the menacing interface of non-communicable and infectious diseases.

**Trop Med Int Health**, v. 18, n. 12, p. 1510-9, Dec 2013. ISSN 1365-3156. Available

at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237786> >.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. **JAMA**, v. 307, n. 5, p. 491-7, Feb 2012.

ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22253363> >.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 216-29, Apr 2006. ISSN

0004-2730. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767288> >.

\_\_\_\_\_. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr**

**(Rio J)**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S192-203, Nov 2007. ISSN 0021-7557. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989837> >.

FRIEDMAN, J. M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n.

3, p. 973S-979S, Mar 2009. ISSN 1938-3207. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190071> >.

FRÖHLICH, A. et al. IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses in vivo. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2023-31, Mar 2007. ISSN 0006-

4971. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077330> >.

GAFFEN, S. L. Recent advances in the IL-17 cytokine family. **Curr Opin Immunol**, v.

23, n. 5, p. 613-9, Oct 2011. ISSN 1879-0372. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21852080> >.

GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J Immunol**, v. 140, n. 12, p. 4245-52, Jun 1988. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2967332> >.

GAJEWSKI, T. F.; GOLDWASSER, E.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J Immunol**, v. 141, n. 8, p. 2635-42, Oct 1988. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2971726> >.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **J Neurochem**, v. 120, n. 5, p. 752-64, Mar 2012. ISSN 1471-4159. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146087> >.

GOTTSCHALL, C. B. et al. [Nutritional assessment in patients with cirrhosis: the use of indirect calorimetry]. **Arq Gastroenterol**, v. 41, n. 4, p. 220-4, 2004 Oct-Dec 2004. ISSN 0004-2803. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806264> >.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982. ISSN 0003-2697. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105> >.

HARFORD, K. A. et al. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **Proc Nutr Soc**, v. 70, n. 4, p. 408-17, Nov 2011. ISSN 1475-2719. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835098> >.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 203818, 2012. ISSN 2090-0031. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570765> >.

HUBER, S. et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in an interleukin-10-dependent manner. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 554-65, Apr 2011. ISSN 1097-4180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21511184> >.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunol Lett**, v. 161, n. 2, p. 179-83, Oct 2014. ISSN 1879-0542. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412597> >.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - Avaliação Nutricional da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos no Brasil entre 2008-2009** 2010.

IKEJIMA, S. et al. Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 182-9, Jan 2005. ISSN 0012-1797. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616027> >.

JARČUŠKA, P. et al. Hepatitis B virus infection in patients with metabolic syndrome: a complicated relationship. Results of a population based study. **Eur J Intern Med**, v. 25, n. 3, p. 286-91, Mar 2014. ISSN 1879-0828. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24445023> >.

JINJUVADIA, R.; LIANGPUNSAKUL, S. Association between metabolic syndrome and its individual components with viral hepatitis B. **Am J Med Sci**, v. 347, n. 1, p. 23-7, Jan 2014. ISSN 1538-2990. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514672> >.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 1141-7, Jan 2001. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145695> >.

KANNEGANTI, T. D.; DIXIT, V. D. Immunological complications of obesity. **Nat Immunol**, v. 13, n. 8, p. 707-12, Aug 2012. ISSN 1529-2916. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814340> >.

KARLSSON, E. A.; BECK, M. A. The burden of obesity on infectious disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 235, n. 12, p. 1412-24, Dec 2010. ISSN 1535-3699. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127339> >.

KIMA, P. E. et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 191, n. 6, p. 1063-8, Mar 2000. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727468> >.

KORNUM, J. B. et al. Obesity and risk of subsequent hospitalisation with pneumonia. **Eur Respir J**, v. 36, n. 6, p. 1330-6, Dec 2010. ISSN 1399-3003. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351023> >.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The leishmaniasis in biology and medicine**. 1987.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 826-35, Feb 2002. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796617> >.

LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 666-85, 2007. ISSN 1537-744X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17619751> >.

LOKE, P. et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3926-36, Sep 2007. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785830> >.

LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate immunity to Leishmania infection: within phagocytes. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 754965, 2014. ISSN 1466-1861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110400> >.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 3039-46, Mar 2009. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19234200> >.

LOUIE, J. K. et al. A novel risk factor for a novel virus: obesity and 2009 pandemic influenza A (H1N1). **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 3, p. 301-12, Feb 2011. ISSN 1537-6591. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208911> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

MACHADO, F. S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 1743-58, 2012. ISSN 1945-0508 (Electronic)

1945-0494 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22201990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22201990) >.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 747-54, Mar 2005. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753208> >.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 2, p. 298-306, May 2012. ISSN 1475-2719. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414338> >.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001. ISSN 0732-0582. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051> >.



MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-73, 1989. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2523712](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2523712) >.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008. ISSN 1474-1741. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029990> >.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 286-96, Mar 2011. ISSN 1600-065X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349100> >.

NAGAJYOTHI, F. et al. Response of adipose tissue to early infection with Trypanosoma cruzi (Brazil strain). **J Infect Dis**, v. 205, n. 5, p. 830-40, Mar 1 2012. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22293433](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22293433) >.

NAVE, H.; BEUTEL, G.; KIELSTEIN, J. T. Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 14-5, Jan 2011. ISSN 1474-4457. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183146> >.

NG, S. F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963-6, Oct 2010. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962845> >.

O'SHEA, D. 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)**, v. 37, n. 11, p. 1510-3, Nov 2013. ISSN 1476-5497. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439322> >.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-87, Apr 2008. ISSN 1097-4180. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400190> >.

Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 894, p. i-xii, 1-253, 2000. ISSN 0512-3054. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234459> >.

OHASHI, K. et al. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 7, p. 348-355, Jul 2014. ISSN 1879-3061. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746980> >.

OLIVEIRA, C. F. et al. Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF-receptor-1-deficient mice infected by *Leishmania major*. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 865708, 2012. ISSN 1740-2530. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203861> >.

ORGANIZATION, W.-W. H. Obesity and overweight. 2014. Available at: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

PAULINO DO NASCIMENTO, A.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. **Br J Nutr**, v. 106, n. 4, p. 603-11, Aug 2011. ISSN 1475-2662. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21806853> >.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol**, v. 127, n. 4, p. 1438-43, Oct 1981. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7276565> >.

PRADO, W. L. D. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, p. 378-383, 2009. ISSN 1517-8692. Available at: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-86922009000600012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922009000600012&nrm=iso) >.

PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. A influência do tempo de coleta sobre os níveis de interleucina-6 na sepse neonatal precoce. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 407-410, 2004. ISSN 0021-7557. Available at: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572004000600012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572004000600012&nrm=iso) >.

QI, H. et al. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**, v. 72, n. 2, p. 988-95, Feb 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742545> >.

RADER, D. J. Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. **Am J Med**, v. 120, n. 3 Suppl 1, p. S12-8, Mar 2007. ISSN 1555-7162. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320517> >.



RAJ, D.; KABRA, S. K.; LODHA, R. Childhood obesity and risk of allergy or asthma. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 753-65, Nov 2014. ISSN 1557-8607. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25282288> >.

REINER, S. L. et al. Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. **J Exp Med**, v. 179, n. 2, p. 447-56, Feb 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7905017](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7905017) >.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. **J Biol Chem**, v. 279, n. 22, p. 23668-78, May 2004. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023992> >.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. **FEMS Microbiol Lett**, v. 209, n. 1, p. 1-7, Mar 19 2002. ISSN 0378-1097 (Print)

0378-1097 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12007646](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12007646) >.

ROS PÉREZ, M.; MEDINA-GÓMEZ, G. [Obesity, adipogenesis and insulin resistance]. **Endocrinol Nutr**, v. 58, n. 7, p. 360-9, 2011 Aug-Sep 2011. ISSN 1579-2021. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778123> >.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 11, p. 845-58, Nov 2002. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415308> >.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes. **Exp Parasitol**, v. 69, n. 1, p. 100-3, Jul 1989. ISSN 0014-4894. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2659372> >.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-17, Jun 2011. ISSN 1930-739X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331068> >.

SANTOS, L. C. D.; TORRENT, I. F. **O tecido adiposo e a produção de adipocinas**. Pará de Minas, Minas Gerais, Brasil: SynThesis Revista Digital FAPAM. 2: 110-119 p. 2010.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011. ISSN 0006-3002. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296109> >.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, v. 147, n. 9, p. 3149-55, Nov 1 1991. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Available at: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1833466](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1833466) >.

SCOTT, P. et al. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J Exp Med**, v. 168, n. 5, p. 1675-84, Nov 1988. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903212> >.

SHERIDAN, P. A. et al. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 8, p. 1072-7, Aug 2012. ISSN 1476-5497. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024641> >.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, May 2004. ISSN 0074-0276. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273794> >.

SILVEIRA, M. D. et al. **Correlation between obesity, adipokines and the immune system**. Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, São Paulo, Brasil Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum 11: 466-472 p. 2009.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-7, May 1987. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107127>

>.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. **J Immunol**, v. 180, n. 7, p. 4355-60, Apr 2008. ISSN 0022-1767. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354154> >.

SOUSA, L. M. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 1, p. 13-31, Jan 2014. ISSN 1365-3024. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24102495> >.

SWIHART, K. et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. **J Exp Med**, v. 181, n. 3, p. 961-71, Mar 1995. ISSN 0022-1007. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869054> >.

TACCHINI-COTTIER, F.; WEINKOPFF, T.; LAUNOIS, P. Does T Helper Differentiation Correlate with Resistance or Susceptibility to Infection with *L. major*? Some Insights From the Murine Model. **Front Immunol**, v. 3, p. 32, 2012. ISSN 1664-3224. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566916> >.

TUMITAN, A. R. et al. Pattern of macrophage activation in yersinia-resistant and yersinia-susceptible strains of mice. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 10, p. 1021-8, 2007. ISSN 0385-5600. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951992> >.

VAILLANT, L. et al. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. **Euro Surveill**, v. 14, n. 33, 2009. ISSN 1560-7917. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712643> >.

VALLEJO, A. N. Age-dependent alterations of the T cell repertoire and functional diversity of T cells of the aged. **Immunol Res**, v. 36, n. 1-3, p. 221-8, 2006. ISSN 0257-277X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337782> >.

VAZ, N. M.; PORDEUS, V. Visita à imunologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 350-362, 2005. ISSN 0066-782X. Available at: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2005001800012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005001800012&nrm=iso) >.

VIEIRA, L. Q. et al. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. **J Immunol**, v. 157, n. 2, p. 827-35, Jul 1996. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752935> >.

\_\_\_\_\_. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production in vivo. **Immunol Lett**, v. 40, n. 2, p. 157-61, May 1994. ISSN 0165-2478. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916331> >.

VISNESS, C. M. et al. Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 5, p. 1163-9, 1169.e1-4, May 2009. ISSN 1097-6825. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230960> >.

VOLP, A. C. et al. [Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 3, p. 537-49, Apr 2008. ISSN 1677-9487. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18506280> >.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 2, p. 145-50, Mar 2009. ISSN 1677-9487. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466206> >.

WANG, C. C.; TSENG, T. C.; KAO, J. H. Hepatitis B virus infection and metabolic syndrome: Fact or fiction? **J Gastroenterol Hepatol**, v. 30, n. 1, p. 14-20, Jan 2015. ISSN 1440-1746. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092429> >.

WANG, C. S. et al. Community-based study of hepatitis C virus infection and type 2 diabetes: an association affected by age and hepatitis severity status. **Am J Epidemiol**, v. 158, n. 12, p. 1154-60, Dec 2003. ISSN 0002-9262. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652300> >.

WANG, Z. E. et al. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. **J Immunol**, v. 151, n. 4, p. 2077-86, Aug 1993. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102158> >.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 5, p. 433-50, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0738-081X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889321> >.

YANG, H. et al. Obesity accelerates thymic aging. **Blood**, v. 114, n. 18, p. 3803-12, Oct 2009. ISSN 1528-0020. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721009> >.

YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. **J Immunol**, v. 178, n. 2, p. 1077-85, Jan 2007. ISSN 0022-1767. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202371> >.

YUAN, K.; CHEN, H. L. Obesity and surgical site infections risk in orthopedics: a meta-analysis. **Int J Surg**, v. 11, n. 5, p. 383-8, 2013. ISSN 1743-9159. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470598> >.

ZHOU, Q.; LEEMAN, S. E.; AMAR, S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 2867-72, Feb 2011. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282635> >.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

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

### CERTIFICATE

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

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

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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