



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS
INFECCIOSAS**

GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS
PROVOCADAS PELA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS
POR *Leishmania chagasi***

**Vitória
2015**

GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS
PROVOCADAS PELA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS
POR *Leishmania chagasi***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Coorientador: Prof^ª Dr.^a. Tatiani Uceli Maioli - UFMG

Vitória
2015

S245a Sarnáglia, Glênia Daros, 1987-
Avaliação de alterações imunológicas provocadas pela
obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos
C57BL/6 infectados por *Leishmania chagasi* / Glênia Daros
Sarnáglia – 2015.
79 f. : il.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.
Coorientador: Tatiani Uceli Maioli.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Leishmaniose visceral. 2. Distúrbio. 3. Metabolismo.
4. Infecção. 5. Obesidade. I. Gomes, Daniel Cláudio de Oliveira.
II. Maioli, Tatiani Uceli. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA apresentou a dissertação intitulada “Avaliação de alterações imunológicas provocadas pela obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6 infectados por *Leishmania chagasi*” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 06 de fevereiro de 2015

Prof. Dr. Luis Carlos Crocco Afonso
(Membro externo)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro interno)

Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes
(Orientador)

Profa. Dra. Tatiane Uceli Maioli
(Coorientador)

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Perly e Celma, e aos meus avós Ninfa,
Ana e José. A vocês minha imensa
gratidão e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Deus por me dotar de capacidade para tentar compreender sua criação, e chamar a isso de ciência.

A Jesus por me ensinar a trilhar seus bons caminhos.

À Maria, minha mãe, por ser minha intercessora junto ao Pai.

Ao Espírito Santo, por me conduzir.

Aos Anjos e Santos de guarda, por me protegerem diante das batalhas de cada dia.

À minha família, que me apoiou e acreditou nos meus sonhos. Ao meu pai Perly, por me apoiar. À minha mãe Celma, por me ensinar muito sobre a vida e por me fazer ter um lar aqui, junto aos meus irmãos e meu padrasto. Aos meus avós, que mesmo sem entender o que eu faço, se orgulhavam da minha realização.

Aos meus amigos que me sustentaram com sua alegria e motivação.

A vida de todos os animais utilizados neste trabalho. Elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

A meu orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo incentivo, compreensão e ensinamentos durante esses anos e principalmente pela confiança depositada durante minha orientação.

A minha co-orientadora Dr^a. Tatiani Uceli Maioli pela disponibilidade em me ensinar e esclarecer cada dúvida durante este trabalho.

A Luciana Polaco Covre, que se dispôs em me acompanhar a cada experimento, cada dúvida, cada choro e cada correção dessa dissertação. Aprendi muito com você.

A todos do laboratório de imunologia celular e molecular, por todos esses anos de convivência, trabalho, risadas e choros. Foi maravilhoso aprender um pouco com cada um. Em especial Janine, Nataly, Marcelle, Priscila, Bruna, Estevão, Carlos, Caio, Emannoel, Lorenzo.

As queridas funcionárias do NDI, Lau, Mona, Rose, Dete, pela disponibilidade em ajudar, pelo bom trabalho e apoio de todos os dias.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas pelo conhecimento, em especial Fausto Edmundo Lima Pereira por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho, pelo exemplo profissional, pela oportunidade de convivência, por cada técnica ensinada e pelas conversas, que acrescentam em muito na minha formação científica e pessoal.

Aos professores Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, Dr. Luis Carlos Crocco Afonso, pela disponibilidade de participar da banca avaliadora e enriquecer com sugestões e ideias esse trabalho.

A Mary Orletti, por me permitir participar de sua pesquisa e por me incentivar a batalhar pela minha própria. Seus ensinamento e apoio foram essenciais para ingressar nessa jornada.

A Rafael Faitanin, por me fazer acreditar em mim e lutar por esse sonho.

A Natália Néspoli, por me ajudar a crescer e compreender o quanto sou capaz.

A amiga Tereza De Nadai, meu anjo.

A Leonardo Scalabrin, pelo apoio e auxílio na formatação.

Ao programa CAPES/REUNI pela bolsa concedida que permitiu minha dedicação total à pesquisa durante o período de vigência da bolsa.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente auxiliaram e torceram pelo desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada!

*“Mais vale a paciência do que o heroísmo, mais vale quem domina o coração do que
aquele que conquista uma cidade.*

As sortes lançam-se nas dobras do manto, mas do Senhor depende toda decisão.”

Provérbios 16, 32 e 33

RESUMO

Os fatores ambientais, incluindo a dieta, desempenham um papel central sobre o equilíbrio da homeostase imune normal, influenciando-o. Contudo, muitos dos mecanismos celulares que mantêm este equilíbrio permanecem por ser elucidados. Usando um modelo de camundongos alimentados com dieta indutora de obesidade, rica em carboidratos simples e gordura saturada, foi examinada a influência deste comportamento alimentar sobre o desenvolvimento da leishmaniose visceral causada por *L. chagasi*. Camundongos C57BL / 6 do sexo feminino (6-8 semanas), alimentados com dieta controle (AIN93G) ou com dieta com alto teor de açúcares e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* após oito a dez semanas alimentação e sacrificados após quatro semanas de infecção. A administração de dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada foi eficiente na indução da obesidade experimental em modelo murino, provocando alterações sistêmicas. Camundongos obesos foram capazes de gerar uma alta resposta inflamatória em resposta a infecção com *L. chagasi*, porém apresentaram aumento da susceptibilidade à infecção. Estes resultados mostram que um macroambiente hipercalórico pode interferir diretamente na resposta a sinais provenientes de organismos patogênicos e distorcer o desenvolvimento de uma imunidade anti-leishmania.

Palavras-chave:

Leishmaniose Visceral, Distúrbio Metabólico, Obesidade, Infecção

ABSTRACT

Environmental factors, including diet, play a central role in the balance of normal immune homeostasis, is already known that diets rich in simple carbohydrate or in saturated fat acids can influence the secretion of immune mediators altering the metabolism. However, many of the cellular mechanisms that control this maintenance or disturbance of this balance remain to be elucidated. Together with this, there are no results showing the impact of a hypercaloric diet on intracellular parasite response. Using mouse model feeding with high sugar and high fat diet, we examined the influence of this diet on the visceral leishmaniasis development caused by *L. chagasi*. C57BL/6 female mice (6-8 weeks) fed with control (AIN93G) or high sugar and fat diet (HSF) were infected with 10^7 *L. chagasi* promastigotes at 11th feeding week and euthanized four-week post-infection. A diet high in simple carbohydrates and saturated fat was efficient in the induction of experimental obesity in mice, causing systemic changes. Obese mice were able to generate a high inflammatory response in response to challenge with *L. chagasi*, but showed increased susceptibility to infection. These results show that a hypercaloric macroenvironment can directly interfere with responses to pathogen-derived signals and skew the development of an anti-leishmania immunity.

Keywords: *Visceral leishmaniasis, metabolic disorder, obesity, infection.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Avaliação do ganho de peso pela administração das dietas AIN93G e HSF. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. p <0,05 (*) p <0,01 (**).41
- Figura 2:** Ingestão alimentar média diária durante a administração das dietas AIN93G e HSF. A avaliação do consumo energético em quilocalorias foi resultado do produto do consumo diário em gramas (g) de cada animal, multiplicado pelo valor energético de cada dieta (AIN93G = 4 kcal/g; HSF = 5 kcal/g). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. p<0,0001 (****).42
- Figura 3:** Peso do tecido adiposo gonadal após alimentação com as dietas AIN93G ou HSF. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. p <0,05 (*).44
- Figura 4:** Cortes histológicos de tecido adiposo gonadal. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Fragmentos de cada órgão foram removidos, fixados, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5 μ m de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas por microscopia de luz. Imagens com aumento de 100x. (A) Grupo AIN93G; (B) Grupo HSF.....45
- Figura 5:** Adiposidade. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e

- eutanasiados 28 dias após a infecção. A relação de adiposidade foi calculada a partir da divisão do peso do tecido adiposo gonadal pelo peso corporal de cada camundongo ao final do experimento. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. $p < 0,01$ (**).46
- Figura 6.** Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue periférico. Contagem global de leucócitos realizada com alíquotas de sangue fresco solubilizadas em solução de Turk e contabilizadas em câmara de Neubauer por microscopia ótica em aumento de 100X (A). Contagem diferencial de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido e contabilizadas por microscopia ótica em aumento de 1000X (B). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. $p < 0,05$ 47
- Figura 7.** Carga parasitária no baço (A) e fígado (B). Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (LDA). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****)49
- Figura 8.** Peso do baço (A) e fígado (B). Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. $p < 0,05$ (*).50
- Figura 9:** Característica macroscópica de baços. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 5 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção.....51
- Figura 10.** Cortes histológicos de baço e fígado. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e

eutanasiados 28 dias após a infecção. Fragmentos de cada órgão foram removidos, fixados, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5µm de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas por microscopia de luz. Imagens com aumento de 100x e 400x. (A) Grupo AIN93G baço; (B) Grupo HSF baço; (C) Grupo AIN93G fígado; (D) Grupo HSF fígado.....54

Figura 11: IFN- γ (ng/mL), IL-10 (ng/mL), IL-4 (ng/mL) e NO (μ M) em sobrenadante de células de baço e fígado. de camundongos C57BL/6 fêmeas (6-8 semanas), alimentados com dieta controle. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche e o NO pelo método de Griess. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. p <0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***), p<0,0001 (****).....53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Distribuição de componentes da dieta controle (AIN93G) e hipercalórica (HSF).....32
- Tabela 2: Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (AIN93G) e hipercalórica (HSF).32

LISTA DE SIGLAS

AIN93G - Dieta controle
CDs – Células dendríticas
CMSP - Células mononucleares do sangue periférico
DMEM - *Dulbecco's minimal essential medium*
ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
HSF – *High sugar and fat* - dieta experimental
IFN – *Interferon*
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IMC - Índice de Massa Corporal
iNOS - Óxido nítrico-sintase induzível
L. - Leishmania
LV – Leishmaniose visceral
MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
MS - Ministério da Saúde
NK - Células *natural killer*
NO - Óxido nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAI-1- inibidor do ativador de plasminogênio
PBS - Salina tamponada com fosfato
PRRs – Receptor de reconhecimento padrão
SFB – Soro fetal bovino
T CD4+- Linfócito T auxiliar
T CD8+- Linfócito T citolítico
TGF - Fator de crescimento e transformação
Th - Célula T auxiliar
TLRs - Receptores tipo Toll
TNF - Fator de necrose tumoral
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL OU CALAZAR.....	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LV.....	18
1.3 ETIOPATOGENESE DA LV	19
1.4. RESPOSTA IMUNE DA LV	20
1.5 OBESIDADE COMO DISTÚRBO METABÓLICO	24
1.6 OBESIDADE E SISTEMA IMUNE.....	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS.....	31
3.2 PARASITOS.....	31
3.3 DIETAS	31
3.4 DETERMINAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA.....	33
3.5 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL MÉDIO	33
3.6 INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	33
3.7 AVALIAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES.....	34
3.7.1 Contagem total de leucócitos no sangue.....	34
3.7.2 Contagem diferencial de leucócitos no sangue.....	34
3.8 PESO DO TECIDO ADIPOSEO PELO PESO CORPORAL.....	34
3.9 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E FÍGADO	35
3.10 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA.....	35
3.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ESPLENÓCITOS E HEPATÓCITOS.	36
3.12 QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLENÓCITOS E HEPATÓCITOS	37
3.13 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO GONADAL, BAÇO E FÍGADO.....	37
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38

4. RESULTADOS	39
4.1 A ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM DIETA HIPERCALÓRICA INDUZ ALTERAÇÕES SISTÊMICAS	40
4.2 A OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA HIPERCALÓRICA AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÃO POR <i>L. chagasi</i>	48
4.3 A OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA HIPERCALÓRICA PROMOVE UM PERFIL INFLAMATÓRIO INCAPAZ DE CONTROLAR A INFECÇÃO POR <i>L. chagasi</i>	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS	65

1. Introdução

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL OU CALAZAR

Leishmaniose é um termo utilizado genericamente para definir um complexo de doenças clinicamente diferentes, que tem como agente etiológico várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos pertencentes ao reino Protista, à ordem Kinetoplastida, à família *Tripanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. Todas as espécies são parasitos intracelulares obrigatórios, infectando preferencialmente células do sistema fagocitário mononuclear de hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre eles, roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e o homem (ALENCAR et al., 1991). Em decorrência da interação parasito-hospedeiro, a doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas não letais até a forma visceral, fatal se não há tratamento (GRIMALDI; TESH, 1993; CARVALHO et al., 1985).

A Leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave da doença, podendo variar desde manifestações discretas (oligossintomáticas) e moderadas, até às graves. Pacientes portadores da forma grave apresentam febre, geralmente prolongada e irregular, associada a calafrios, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia progressiva, palidez cutâneo-mucosa devido à pancitopenia e hipergamaglobulinemia. Há ainda desnutrição grave, edema de membros inferiores, hemorragias, icterícia e ascite. O óbito decorre de infecções bacterianas e/ou sangramentos, e pode ocorrer em mais de 90% dos casos não tratados (CARNEIRO et al., 2013).

Os sinais clínicos em LV são dependentes da resposta imune, a qual está diretamente associada a fatores genéticos do hospedeiro. Resposta imune celular e humoral estão envolvidos, e a gravidade e manifestações clínicas dependem de um equilíbrio entre tropismo e virulência do parasito (HONORE et al., 1998; GARIN et al., 2001). Os protozoários são encontrados parasitando células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides. Um dos fatores de virulência em parasitos que causam LV são os genes de A2 (ZHANG; MATLASHEWSKI, 1997; ZHANG; MATLASHEWSKI 2001), relacionados com a habilidade do parasito em visceralizar, sendo altamente expresso durante a forma amastigota em leishmanias do complexo *Donovani*, causadoras da LV. (GHEDIN et al., 1997; ZHANG et al, 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LV

Ainda hoje as leishmanioses representam a quinta doença infecto-parasitária de maior importância mundial. A enfermidade possui ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas. É endêmica em 98 países colocando em risco cerca de 350 milhões de pessoas que residem em áreas com transmissão ativa do parasito (LETA *et al.*, 2014; CECÍLIO *et al.*, 2014). Ela afeta as pessoas que vivem nas regiões mais pobres do planeta e estão associadas com o desequilíbrio social relacionado à pobreza, incluindo desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e falta de recursos sociais (WHO, 2014; KHADEM; UZONNA, 2014).

Anualmente, é estimado de 200.000 a 400.000 novos casos de LV no mundo sendo que mais de 90% das notificações registradas ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2014; LETA *et al.*, 2014).

Na América Latina, a LV apresenta-se em 12 países, e 96.6% dos casos (38.808) foram registrados no Brasil, entre 2001 a 2011. Dentre as doenças tropicais, esse número só não é superado pelos casos registrados de malária (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2001).

No país, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2014). Na década de 80, a doença era restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro. Entretanto, a partir dos anos 90 avançou para outras regiões alcançando a periferia dos grandes centros urbanos, com a ocorrência de surtos e epidemias registrados em vários lugares como: Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luis (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (SILVA *et al.*, 2001; BRASIL, 2014).

A doença é mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O sexo masculino é o mais afetado (60%). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (SILVA *et al.*, 2001; BRASIL, 2014).

No Estado do Espírito Santo, durante o período de 2008 a 2011, o estado apresentou um total de 19 casos, com média de 05 casos por ano, sendo que 55% dos casos ocorreram no sexo feminino e 60% em crianças na faixa etária de 0 a 9 anos. (BRASIL, 2012).

1.3 ETIOPATOGENESE DA LV

A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo de vida: a forma flagelada móvel, denominada promastigota, presente no tubo digestivo do flebotomíneo, e a forma amastigota, imóvel, com flagelo rudimentar contido no saco flagelar, que se desenvolve em células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros mamíferos.

A transmissão da leishmania para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (FERRO et al., 1995; ROGERS; TITUS, 2003). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*.

Em relação à transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados, as fêmeas de insetos vetores infectadas, ao realizar o repasto sanguíneo, injetam intradermicamente, junto com sua saliva, formas promastigotas metacíclicas de leishmania (ROGERS et al., 2002). A transmissão é facilitada, pois durante a infecção há a inoculação de moléculas da saliva dos insetos com efeitos anticoagulantes, vasodilatadores e anti-inflamatórios, como o maxadilán, a hialuronidase e a apirase (LERNER; SHOEMAKER, 1992; RIBEIRO, 1995; BASANOVA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2000), além de moléculas derivadas do próprio parasito, como filamentos proteofosfolípicos (fPPG) (ROGERS et al., 2004). Como resultado da inoculação dessas moléculas, temos uma diminuição da exposição dos parasitos ao sistema imune recém infectado, um aumento no número de macrófagos para o local da inoculação graças à quimiotaxia, acelerando a fagocitose dos promastigotas, ao mesmo tempo que há a inibição da apresentação de antígeno para linfócitos T, a inibição da produção de citocinas T auxiliar tipo 1 (Th1), a redução da ativação celular causada pela ação da citocina interferon-gama (IFN- γ) e a regulação negativa da produção de óxido nítrico (NO) (ZER et al., 2001).

Seguido da fagocitose, as formas promastigotas metacíclicas que estão albergadas no vacúolo parasitóforo se transformam em amastigotas. Estas se multiplicam por divisão binária até que a quantidade de parasitos dentro do vacúolo seja tal que leve ao rompimento da célula. As formas amastigotas recém liberadas podem então ser novamente fagocitadas por outras células fagocíticas e estas células podem ser ingeridas por um inseto vetor não infectado durante seu repasto sanguíneo (ROGERS et al., 2002).

No trato digestivo anterior do inseto, ocorre o rompimento das células fagocitárias infectadas e liberação das formas amastigotas, que se diferenciam em promastigotas em

aproximadamente 13 a 15 horas. As formas promastigotas multiplicam-se rapidamente por divisão binária e transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes metacíclicas durante o próximo repasto sanguíneo, quando são regurgitadas juntos com a saliva (ROGERS et al., 2002).

1.4 RESPOSTA IMUNE DA LV

Os mecanismos da resposta imune contra a LV são complexos, envolvendo diferentes células e moléculas. Inicialmente as células recrutadas após o repasto sanguíneo (neutrófilos e monócitos/ macrófagos), iniciam a resposta inflamatória local, além de serem células importantes no direcionamento e desfecho da infecção (TEIXEIRA et al., 2005).

A leishmania é captada inicialmente por meio da interação de receptores de superfície. Nos macrófagos os seguintes receptores são importantes: Receptores de Complemento CR1 e CR3 (Mac-1), Receptor de Fibronectina e Receptor Manose-Fucose (KANE et al., 2000). Os receptores lipofosfoglicano (LPG), gp63 e proteofosfoglicanos são encontrados na superfície do patógeno (YAO et al., 2003; NADERER; MCCONVILLE, 2008). Componentes do patógeno podem ser reconhecidos também por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores tipo Toll (TLRs), levando a maturação e ao tráfico das células dendríticas (CDs) para os linfonodos locais, onde há a apresentação de antígenos para células T virgens, dando início à imunidade adaptativa contra o patógeno invasor (KAISHO; AKIRA, 2001; FITZGERALD-BOCARSLY, 2002).

Os neutrófilos são as primeiras células hospedeiras que chegam ao local da inoculação de promastigotas de leishmania e ali já iniciam a resposta imune contra o patógeno. Podem fagocitar ativamente os promastigotas, assim como produzir fatores microbicidas contra o patógeno, tais como NO (CHARMOY et al., 2007), elastase de neutrófilos (NE) (RIBEIRO-GOMES et al., 2007), fator ativador de plaquetas (CAMUSSI, et al., 1987), e armadilhas extracelulares de neutrófilos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). Os neutrófilos têm, geralmente, um papel protetor na maioria das formas de infecções por leishmania (NOVAIS et al., 2009), embora os resultados são dependentes da espécie de leishmania, das características genéticas do hospedeiro e o estado de apoptose ou necrose dos neutrófilos (NOVAIS et al., 2009; RIBEIRO-GOMES et al., 2004).

Por meio de ensaios de microscopia em tempo real, foi demonstrado que ocorre uma infiltração maciça de neutrófilos na derme de camundongos expostos à picada de flebótomos infectados com *Leishmania major* (*L. major*) (PETERS et al., 2008). No trabalho os autores observam que os parasitos associam-se inicialmente com neutrófilos, ao invés de monócitos/macrófagos ou CDs. Em outro trabalho, promastigotas de *L. major* fagocitadas por neutrófilos continuavam viáveis, o que poderia favorecer o estabelecimento da doença neste modelo experimental. Essa hipótese chamada de “Cavalo de Tróia”, foi estabelecida por ensaios *in vitro*, nos quais se demonstrou que ao entrar em apoptose, os neutrófilos humanos infectados com *L. major* liberam ligante de quimiocina 4 (CCL4) e induzem o recrutamento de monócitos. Assim, ocorre a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos e a entrada dos parasitos na célula hospedeira de forma silenciosa (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Em um trabalho recente, THALHOFER et al., (2011) estudaram a cinética de migração de neutrófilos em camundongos infectados com *Leishmania L. infantum chagasi*. Os autores observaram um pico de migração de neutrófilos seis horas após a inoculação dos parasitos na orelha e notaram que a presença de neutrófilos infectados se manteve até um dia após a infecção. Já o pico de migração de macrófagos foi observado após três dias de infecção.

Os macrófagos são as principais células efetoras na LV e após a entrada do parasito nessa célula fagocítica ocorre o processamento de antígeno e apresentação para as células T. A população de linfócitos T auxiliares subdivide-se em três subpopulações: linfócitos Th1, linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) e linfócitos T reguladores (Tregs), as quais são definidas com base no seu padrão de citocinas (MOSMANN et al., 1986). As células Th1 secretam interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ induzindo a ativação de macrófagos e a resposta mediada por células (CHER; MOSMANN, 1987), enquanto que as células Th2 secretam interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) fornecendo suporte à resposta mediada por anticorpos (COFFMAN et al. 1988; BACELLAR et al. 2000).

No estabelecimento da resposta imediata, as CDs são potentes células apresentadoras de antígeno, induzindo uma eficiente ativação de células T e estas produzem citocinas IL-12, IL-10 e IFN- γ . As CDs plasmocitóides são incapazes de fagocitar os parasitos, porém estimulam a produção de IL-12 de maneira dependente de TLR 9, sendo importantes durante a infecção. As CDs mielóides exercem efeitos citotóxicos em *Leishmania infantum* (*L. infantum*) por estimularem a produção IL-12 sob a estimulação do receptor TLR 9 e por induzirem células natural killer (NK) a liberarem a citocina IFN- γ . (SCHLEICHER et al., 2007). Estudos de infecção com leishmania, em modelos experimentais e humanos,

mostraram que o parasito é capaz de inibir a produção de IL-12 por CDs, comprometendo a ativação das NK e, conseqüentemente, a produção de IFN- γ e a diferenciação dos linfócitos T auxiliares tipo 0 (Th0) em Th1 (SCHARTON; SCOTT, 1993).

A citocina mais importante para o controle da doença é o IFN- γ . É a principal citocina produzida pelos linfócitos Ths e pelas células NK, cuja função central é ativar os macrófagos, tanto nas respostas imunes inatas como nas respostas imunes adquiridas mediadas pelas células (ABBAS et al.; 2003). A produção dessa citocina é regulada pela IL-2 que promove sua estimulação, e IL-10 que é capaz de suprimir sua produção (BACELLAR et al., 2000). O IFN- γ exacerba a ação microbicida dos macrófagos estimulando a produção óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), enzima que catalisa a formação de NO a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina (LIEW et al., 1990); estimula a expressão das moléculas de classe I e de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e dos co-estimuladores sobre as APCs e promove a diferenciação das células T CD4+ virgens para a sub população Th1. Outras citocinas inflamatórias como IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IFN- α e IFN- β também estão envolvidas em sua produção por promoveram a ativação de macrófagos e o aumento da expressão da iNOS (BRONTE; ZANOVELLO, 2005). Na infecção humana por leishmania a produção de IFN- γ aumenta a atividade microbicida dos macrófagos (MURRAY et al., 1983), e está envolvida no mecanismo de proteção. Apesar de sua importância no controle da doença, somente a presença de IFN- γ não é suficiente para eliminar o parasito, pois, é necessário também que se tenha à produção de IL-12, migração de células T e CDs para os sítios de parasitismo crônico (MELBY et al., 2001)

A sobrevivência da leishmania ocorre quando a ativação de macrófagos é induzida por citocinas Th2, como a IL-4, IL-10 e IL-13 (GORDON, 2003). A IL-10 é uma citocina produzida pelos macrófagos ativados e por algumas células T auxiliares, é uma importante citocina reguladora, que inibe a explosão respiratória dos macrófagos, a produção de citocinas pró-inflamatórias (KROPF P et al, 2005; GORDON, 2003) e respostas linfoproliferativas em resposta ao reestímulo com antígenos do parasito (HAILU et al., 2005). A presença dessa citocina está relacionada com a diminuição da capacidade citotóxica de células TCD8+ e supressão da atividade de células TCD4+, influenciando diretamente na capacidade microbicida contra o parasito (RIBEIRO DE JESUS et al., 1998). Ghalib et al. (1993) relataram que pacientes com LV aguda têm habilidade para responder especificamente ao antígeno de leishmania com produção de IL-10. Sugerem que esta seja importante para a persistência do parasito nas células do hospedeiro, possivelmente porque macrófagos e células

T estejam produzindo IL-10 em resposta a leishmania e ambos são importantes para a regulação negativa da resposta das células T.

Diferente do que ocorre na infecção murina por *L. major*, nenhuma associação entre a resposta imune Th1 e resistência à doença ou da resposta imune Th2 e susceptibilidade tem sido descrita na leishmaniose visceral humana (LVH) (ANTONELLI et al., 2004; KHALIL et al., 2005). Parece possível que exista um padrão misto Th1 e Th2 ativado, conforme revelado pelos níveis elevados de IFN- γ e IL-4 detectados em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LV causada por *L. donovani* estimuladas *in vitro* com antígenos do parasito. Entretanto, é consenso que a incapacidade de células T em proliferarem e produzirem IFN- γ implica no aumento da carga parasitária observada tanto em modelos experimentais quanto na LV humana. Indivíduos que desenvolvem a doença tendem a apresentar uma resposta imune do tipo Th2 ou a predominância da atividade de citocinas produzidas por células TCD4⁺ Th2 (CARVALHO et al., 1985; GHALIB et al., 1993; SUNDAR et al., 1997). Neste tipo de resposta, há uma maior produção de IL-10 e IL-4 comparado ao IFN- γ (KUMAR; NYLÉN, 2012).

A resposta de anticorpos anti-leishmania observada em pacientes LV ativa apresenta elevado nível de anticorpos anti-leishmania imunoglobulina E (IgE), IgM e IgG (GHOSH et al., 1995; ANAM et al., 1999; DA MATTA et al., 2000; RYAN et al., 2002), sugerindo a presença de anticorpos anti-leishmania com capacidade preditiva de doença (SINGH et al., 2002), mas esse dado não foi confirmado.

Embora ainda limitada a capacidade de distinguir entre ativa ou infecção subclínica, anticorpos têm se mostrado úteis no diagnóstico de LV (SUNDAR et al., 2002; SUNDAR; RAI, 2002; CLEMENTS et al., 2010; GIDWANI et al., 2011c). Altos títulos de anticorpos específicos contra leishmania são observadas em doentes com LV, enquanto que os pacientes com leishmaniose crônica tegumentar faltam anticorpos específicos ou estes apresentam uma montagem de resposta muito fraca. Assim, o desenvolvimento de uma resposta humoral forte está mais associada à patologia do que a proteção ou a resolução da doença (GALVÃO-CASTRO et al., 1984).

Em camundongos, há evidências de que as células B e anticorpos contribuem para a patologia da LV (RONET et al., 2008; DEAK et al., 2010). Camundongos com deficiência de células B foram menos suscetíveis à infecção por *L. donovani* (SMELT et al., 2000). A IL-10 promove a sobrevivência das células B e proliferação das células plasmáticas, além de mudar o isotipo IgG para IgG1 e IgG3 (CALDAS et al., 2005). Assim, altos títulos de anticorpos e a formação de imunocomplexos podem contribuir para os elevados níveis IL-10 observados em

humanos e participar do declínio progressivo no estado imunológico de pacientes com LV. No entanto, um papel de proteção de anticorpos não pode ser excluído.

1.5 OBESIDADE COMO DISTÚRBO METABÓLICO

A integração entre o metabolismo e a imunidade, que em condições fisiológicas é benéfica para a manutenção da saúde, pode se tornar deletéria em condições de baixo aporte energético, exemplificada pela imunossupressão característica de indivíduos desnutridos (KHOVIDHUNKIT, et al., 2004). A fome tem sido uma ameaça para a saúde humana ao longo da história, e por milhares de anos a ligação entre a infecção patogênica e a má nutrição foi bem estabelecida. No último século, entretanto, o pêndulo deslocou-se na direção oposta e hoje muitos indivíduos apresentam excesso de peso ou obesidade. Com o advento da sobrecarga metabólica crônica, um novo grupo de problemas e complicações na intersecção entre metabolismo e imunidade emergiu, incluindo doenças inflamatórias ligadas à obesidade como diabetes, esteatose hepática e aterosclerose (HOTAMISLIGIL, 2006). Entre as várias razões para se manter um peso ideal está o paradigma emergente segundo o qual o desequilíbrio metabólico leva ao desequilíbrio imune, com desnutrição e imunossupressão de um lado, e obesidade e aumento de marcadores inflamatórios do outro lado.

O problema do excesso de peso e da obesidade tem alcançado proporções epidêmicas. A obesidade mundial quase dobrou desde 1980. Em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos estavam acima do peso. Nesse contexto, o Brasil contribuiu de forma significativa para o aumento no número de pessoas acima do peso e obesas (WHO, 2015a).

A identificação e classificação mais simples para obesidade são baseados no parâmetro estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) conhecido como Índice de Massa Corporal (IMC). O IMC é calculado dividindo-se o peso corporal pela altura ao quadrado do indivíduo. Valores de 25 a 29,9kg/m² classifica excesso de peso e valores acima de 30kg/m² classifica obesidade. IMC fornece a medida de nível de população mais útil de sobrepeso e obesidade, uma vez que é o mesmo para ambos os sexos e para todas as idades de adultos. No entanto, deve ser considerado um guia, pois pode não corresponder ao mesmo nível de gordura em diferentes indivíduos (WHO, 2015b).

A obesidade é multicausal, porém a causa mais importante é o aumento do consumo de calorias além do que é necessário para manutenção das funções metabólicas. O aporte

calórico positivo de macronutrientes presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, carboidratos, lipídios e álcool) em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física) causa o acúmulo excessivo de tecido adiposo. Esse acúmulo de gordura corporal gera alterações tanto nos hábitos alimentares, como no estilo de vida, além de fatores sociológicos, alterações metabólicas, neuroendócrinas, imunológicas e dos componentes genéticos (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003; DE HEREDIA et al., 2012) caracterizando a obesidade como uma doença multifatorial.

1.6 OBESIDADE E SISTEMA IMUNE

Até o início da década passada, acreditava-se que o papel essencial do tecido adiposo era a deposição de gordura, além de promover isolamento térmico e proteção mecânica contra traumas. Em 1994, com a descoberta da leptina por ZHANG e colaboradores, iniciou-se uma nova era de estudos sobre a função do tecido adiposo, como órgão endócrino. Atualmente, sabe-se que além do seu papel na homeostase energética, via armazenamento e mobilização de energia, o tecido adiposo é um tecido envolvido em vários processos fisiopatológicos e metabólicos (HIROSUMI et al., 2002; SABIO et al., 2008; KRYSIAK et al., 2010).

Após a descoberta da secreção de leptina pelo tecido adiposo, ocorreu uma rápida expansão no conhecimento de proteínas e outras moléculas secretadas por esse tecido denominadas adipocinas. Entre elas estão, além da leptina, a adiponectina, a resistina, o TNF- α , a interleucina seis (IL-6), o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), angiotensinogênio, dentre outras (DE LORENZO et al., 2007). A primeira ligação entre obesidade e inflamação foi sugerida quando se descobriu que o TNF- α , uma citocina com atividade pró-inflamatória, é expressa no tecido adiposo de roedores obesos (HOTAMISLIGIL, et al., 1993). O TNF- α é capaz de ativar macrófagos e aumentar a secreção de NO (GREEN et al., 1994), fatores que seriam importantes na resistência a parasitos intracelulares. No entanto, por algum motivo ainda obscuro, no indivíduo obeso esse mecanismo não leva ao controle de infecção (ZHOU et al., 2011).

Estudos mostram que o tecido adiposo de animais obesos apresenta características de um processo inflamatório e infiltração progressiva de macrófagos, onde o grau de infiltração correlaciona-se positivamente com a adiposidade corporal (WEISBERG et al., 2003).

Uma proteína abundante no tecido adiposo é adiponectina, que estimula as células do sistema imunológico a produzir citocinas anti-inflamatórias e pode explicar a função imunológica perturbada em indivíduos com obesidade severa (ENGELI et al., 2003)

As alterações do sistema imune não se mantêm apenas nas modificações da produção de citocinas. Animais obesos apresentam involução tímica, com maior acúmulo de gordura no órgão. Esse fator prejudica a diversidade de linfócitos T, em especial CD4+, além disso, aparece maior quantidade de macrófagos, porém, com a função também alterada. A redução do repertório de linfócitos leva a oligoclonalidade o que contribui com o desenvolvimento de alergias, susceptibilidade a infecção e autoimunidade (MILNER; BECK, 2012).

A obesidade está associada a uma infiltração de macrófagos constante no tecido adiposo, tais que, em indivíduos grosseiramente obesos, os macrófagos constituem até 40% da população celular do tecido. Além da relevância destes resultados para a patogênese da síndrome metabólica, o estado inflamatório relacionado com a obesidade também pode interferir com a recuperação da lesão (KANNEGANTI; DIXIT, 2012).

As CDs, que são células apresentadoras profissionais de antígenos, tem papel fundamental na resposta a agentes infecciosos. Quando foram avaliadas as CDs de indivíduos com obesidade foi verificado que elas estão em menor número comparado com indivíduos saudáveis. Além disso, apresentam menor expressão de moléculas co-estimuladoras de linfócitos T, menor ativação via TLRs e maior produção de IL-10 (KARLSSON et al., 2010). Esses fatores somados, favorecem a maior chance de disseminação de agentes infecciosos.

Outro fator muito importante é a resposta imune a longo prazo, o que permite a ineficácia de protocolos de vacinação, fato que há anos têm controlado a disseminação de algumas doenças infecciosas. Indivíduos obesos tem menor capacidade de resposta a esses protocolos. Ou seja, estudos mostraram que indivíduos obesos vacinados com três diferentes cepas do vírus H1N1 ou hepatite tiveram a produção de anticorpos alterada. Logo após a vacinação, houve a produção de anticorpos semelhante entre indivíduos normais e obesos, porém um ano depois os títulos de anticorpos em indivíduos obesos foram menores, sugerindo a menor capacidade de manutenção de células de memória e maior susceptibilidade a aquisição e manutenção de agentes infecciosos (SHERIDAN et al. 2012).

Em modelos murinos usando camundongos, uma deficiência de leptina (ob / ob) ou o receptor da leptina (db / db) obteve-se a susceptibilidade aumentada a infecções bacterianas e pneumonia (MANCUSO et al., 2010) Em relação ao *Mycobacterium tuberculosis*, Wieland e colaboradores, em 2005, observaram que camundongos ob / ob apresentam uma maior carga pulmonar desta bactéria. Em adição a estes modelos de infecção pulmonar, os camundongos

sem o receptor de leptina (db / db) foram mais susceptíveis a infecção estafilocócica na pata traseira e exibiram uma resposta inflamatória exacerbada quando comparados a camundongos controles (PARK et al., 2009).

Um estudo interessante relatado por Shamshiev e colaboradores em 2007, utilizando camundongos com duplo nocaute para o gene ApoE, alimentados com alto teor de gordura e de colesterol na dieta exibiam maior suscetibilidade a infecção por *L. major* devido ao prejuízo na função de CDs e imunidade celular do tipo Th1.

Diante das alterações decorrentes da obesidade nas respostas imunes podemos constatar que os indivíduos com excesso de peso parecem apresentar maior dificuldade em controlar certas doenças. Até o presente momento, pouco se conhece sobre os efeitos da obesidade na evolução das leishmanioses cutânea e visceral. Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar a influência da obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6 sobre a resposta imune após infecção com *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6 sobre a resposta imune após infecção com *L. chagasi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Induzir obesidade pela administração de dieta experimental rica em carboidratos simples e gordura saturada.
- 2- Avaliar o efeito da administração de dieta hipercalórica sobre os seguintes aspectos:
 - Adiposidade .
 - Celularidade e contagem diferencial de células do sangue periférico.
 - Aspectos histopatológicos do tecido adiposo, fígado e baço.
- 3- Avaliar os efeitos da obesidade sobre a capacidade microbicida de macrófagos após infecção com *L. chagasi*, pela quantificação da carga parasitária em baço e fígado.
- 4- Avaliar a produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) e óxido nítrico nos sobrenadantes de baço e fígado após infecção com *L. chagasi*.

3. Material e Métodos

3.1 ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 6 a 8 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais com maravalha previamente esterilizada, receberam água filtrada e a dieta determinada *ad libitum*. Durante todo o experimento as gaiolas dos animais ficaram em estufas sob condições apropriadas de temperatura (28°C), umidade e luz.

Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) conforme o registro nº 014/2011.

3.2 PARASITOS

As formas promastigotas totais de *L. chagasi* (cepa referência PP75) foram cultivadas em frascos de cultura de poliestireno de 125 cm² (100 mL) contendo Grace's Insect Medium (Sigma-Aldrich, EUA) com pH 6,8 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado a 56°C por 30 minutos (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 0,2% de hemina (Sigma-Aldrich), 0,5% de estreptomicina/penicilina (Sigma, USA) e 5% de urina humana (previamente centrifugada a 3000 rpm/4°C/10 minutos e esterilizada em membrana de 0,22 µm). As culturas foram armazenadas em estufa refrigerada BOD a 24°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. .

3.3 DIETAS

Os camundongos foram divididos em 2 grupos, recebendo dietas conforme especificação na tabela 1, por um período de doze a quinze semanas, conforme necessidade experimental. A diferença de composição entre as duas dietas foi feita pela substituição do

amido dextrinizado (carboidrato complexo) por maiores quantidades de sacarose e frutose (carboidratos simples) e adição de manteiga comercial sem sal à formulação da dieta HSF, tornando-a rica em carboidratos simples e gordura saturada.

Tabela 1. Distribuição de componentes da dieta controle (AIN93G) e experimental (HSF).

CONTEÚDO	DIETAS	
	Controle (AIN93G)	Experimental (HSF)
Amido de milho	397,5	397,5
Caseína	200	200
Amido dextrinizado	132	0
Sacarose e Frutose	100	232
Óleo de soja	70	70
Celulose	50	50
Mix mineral	35	35
Mix de vitaminas	10	10
Cistina (metionina)	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
BHT	0,014	0,014
Manteiga comercial	0	188,9
TOTAL (g)	1000	1000

HSF – high sugar and fat.

A distribuição macro e micronutrientes, assim como a densidade calórica (Kcal/g) provenientes da dieta controle (AIN93G) e experimental (HSF) foram obtidos através da análise bromatológica, realizada no Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Minas Gerais e pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta controle (AIN93G) e experimental (HSF).

	Dieta Controle (AIN93G)	Dieta Experimental (HSF)
Proteína (%)	20,0	20,0
Lipídio (%)	7,0	26,0
Carboidrato (%)	68,0	49,0
Energia (Kcal/g)	4,0	5,0

*Mix mineral 3,5% ; Mix de vitaminas 1,0%.

3.4 DETERMINAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA

A ingestão alimentar média foi determinada a partir da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais durante as trocas. O valor obtido foi dividido pelo número de animais em cada gaiola. A pesagem foi realizada em balança semi-analítica (Bel Engineering) com capacidade para 200 gramas e variação de 0,001 grama.

3.5 DETERMINAÇÃO DO PESO CORPORAL MÉDIO

O peso corporal de cada animal foi avaliado uma vez por semana, no mesmo dia e horário próximos, em balança semi-analítica (Bel Engineering) com capacidade para 200 gramas e variação de 0,001 grama.

3.6 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Oito semanas após o início das dietas os animais foram desafiados com *L. chagasi* e eutanasiados quatro semanas (28 dias) após a infecção, momento no qual observa-se o pico do parasitismo.

Para a infecção *in vivo*, formas promastigotas de *L. chagasi* (cepa PP75) foram cultivadas em meio Grace's (pH 6,8) suplementado. Ao atingir a fase estacionária de crescimento, a cultura foi centrifugada a 3000 rotações por minuto, 5°C por 10 minutos e lavada duas vezes com uma solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). Em seguida, o sedimento foi suspenso em PBS para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer e posterior ajuste para uma concentração final de 1×10^7 *leishmanias*/dose a ser inoculada em cada animal por via endovenosa (veia caudal).

3.7 AVALIAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES

3.7.1 Contagem total de leucócitos no sangue

Os camundongos foram anestesiados 50µl de anestésico ketamina: xilasina: PBS (3:1:4) na cavidade peritoneal. Procedeu-se então a coleta de uma amostra de sangue. Com uma ponteira embebida em solução de EDTA, 10µL de sangue dos sinos orbitais foram obtidos de cada animal e diluídos em 90µL da solução Turk (solução de Violeta Genciana a 1% em solução de ácido acético 2%, Renylab). Desta diluição, 10µL foram colocados na câmara de Neubauer, a qual foi levada ao microscópio óptico, em aumento final de 1000x, para proceder a contagem das células. Os resultados são expressos em leucócitos/mL.

3.7.2 Contagem diferencial de leucócitos no sangue

Para a contagem diferencial de leucócitos circulantes, 5 µL de sangue dos sinos orbitais foram obtidos de cada animal e transferidos para uma lâmina. Com o auxílio de outra lâmina, foi feito o esfregaço. As lâminas contendo o esfregaço foram coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin). A extensão hematológica foi submetida a ação de um fixador e duas soluções corantes, por meio de imersões de 5 segundos em cada, e ao final da última imersão encontrou-se pronta para leitura, após lavagem com água corrente. Foram analisadas 100 células e contadas células mononucleares e polimorfonucleares. A análise foi realizada com o auxílio do microscópio óptico, em aumento de 1000x.

3.8 PESO DO TECIDO ADIPOSEO PELO PESO CORPORAL

Após a eutanásia, o tecido adiposo gonadal, um tipo de tecido adiposo visceral, foi removido. Em seguida, o tecido adiposo foi pesado em balança analítica. O peso foi

registrado e posteriormente foi expresso com relação ao peso corporal, em forma de relação de adiposidade.

3.9 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E FÍGADO

Vinte e oito dias após a infecção com o parasito, os camundongos foram eutanasiados para a remoção do baço e fígado.

Os órgãos foram removidos em condições assépticas, e individualmente, transferidos para tubos cônicos (Falcon) independentes, previamente identificados e contendo 3 mL de Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, pH 7,2, Gibco®). Em seguida, cada órgão foi macerado para a obtenção das células e acrescido de DMEM (pH 7,2), suplementado com 10% de SFB, 4,7 mg/mL de HEPES (Sigma, USA), 5 mL/L de estreptomicina/penicilina (Sigma) e 3,7 mg/mL de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Vetec). Isso gerou uma suspensão que foi submetida à centrifugação a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos em um tubo cônico de 15 mL. O sobrenadante foi, então, coletado e armazenado para posterior uso na dosagem de citocinas e NO.

3.10 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA

A carga parasitária dos animais infectados por *L. chagasi* foi avaliada através da técnica de diluição limitante (BUFFET *et al.*, 1995) em fragmentos do fígado e baço extraídos dos animais vinte e oito dias após a infecção.

Para isso, os animais de cada grupo experimental tiveram o baço e o fígado removidos em condições assépticas, acondicionados em tubo cônico (Falcon) contendo 3 mL de meio Grace's suplementado. Os tubos foram então pesados e os fragmentos macerados individualmente sobre um filtro com espessura de 100µm, adaptado a um tubo cônico de 50 mL com o auxílio de um êmbolo de seringa. Foi retirada uma alíquota de 200 µL da suspensão de células de cada órgão e transferida em duplicata para o primeiro poço de uma placa de 96 poços estéril com fundo plano (BRANDplates). Os demais poços foram

preenchidos com 150 μ L de Grace's e seguiu-se com a diluição seriada 1:4 nos dezesseis poços subsequentes, divididos em 2 placas.

As placas foram incubadas em estufa BOD por dez dias a 26°C. Após este período cada placa foi levada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e observou-se o último poço em que houve o crescimento das formas promastigotas. O número de parasitos foi determinado em cada órgão tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento das leishmanias.

3.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ESLENÓCITOS E HEPATÓCITOS.

Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) foram utilizados para mensurar a concentração da IFN- γ , IL-10 e IL-4 presente em sobrenadantes *ex vivo* de esplenócitos e hepatócitos. A dosagem foi realizada utilizando o sistema comercial eBioscience com pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinizado seguindo as instruções do fabricante.

Para a sensibilização das placas de microtitulação de 96 poços foram utilizados anticorpos de captura durante 18 horas, a 25°C. Em seguida, os poços foram lavados com solução de lavagem (PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich)) e as amostras foram adicionadas e incubadas na mesma temperatura por 2 horas. As placas, então, foram lavadas novamente com solução de lavagem e incubadas com o anticorpo biotinizado por 1 hora (25°C). Em seguida, foi feita mais uma lavagem na placa e seguiu-se com a adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience) durante 30 minutos a 25°C.

A reação foi revelada pela adição de 0,005% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% e solução tampão citrato fosfato com 5% ABTS. Interrompeu-se a reação com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Gibco) (1%) e prosseguiu-se com a leitura da densidade óptica em um espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices) com a absorbância determinada sob o comprimento de onda de 450 nm.

3.12 QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS E HEPATÓCITOS

A concentração de NO foi determinada nos sobrenadantes *ex vivo* de esplenócitos e hepatócitos dos camundongos infectados com *L. chagasi*.

Para esta análise cerca de 50 µL dos sobrenadantes *ex vivo* foram plaqueados em duplicatas em placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida, as amostras foram incubadas com igual volume de reagente de Griess, composto de 2,5% de ácido orto-fosfórico (H₃PO₄), 1% de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) e 0,1% de α-Naftiletilenoaminohidrocloro (Sigma-Aldrich). A reação foi lida após 10 minutos no leitor de placas utilizando o comprimento de onda de 540 nm (SpectraMax, Molecular Devices).

Para determinar a dosagem de NO formado foi utilizado uma curva padrão com nitrato de sódio iniciada com a concentração de 50 µM.

3.13 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO GONADAL, BAÇO E FÍGADO

Fragmentos do tecido adiposo gonadal, baço e fígado, com cerca de 50-100mg foram removidos e imersos em solução fixadora de Bouin (água destilada saturada de ácido pícrico acrescido de 25 % de formol 10% e 5% de ácido acético glacial) por um período de 24 horas. Em seguida, procederam-se várias etapas de desidratação em série crescente de álcoois (70°, 85°, 90°, 95°, 100°), a diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5µm de espessura. As secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina e, em seguida avaliadas por microscopia de luz.

As imagens foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio ótico por meio do software DinoCapture 2.0.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0 levando em consideração a natureza das variáveis estudadas sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de *T* de Student, para amostras não pareadas.

4. Resultados

4.1 A ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM DIETA HIPERCALÓRICA INDUZ ALTERAÇÕES SISTÊMICAS

Os camundongos C57BL/6 alimentados com as dietas controle (AIN93G) ou hipercalórica (HSF) e infectados conforme descrito anteriormente, foram monitorados semanalmente com objetivo de avaliar o ganho de peso. Conforme observado na figura 1, camundongos alimentados com ambas as dietas apresentaram um aumento progressivo no ganho de peso ao longo das semanas avaliadas. Entretanto, este aumento foi significativamente maior no grupo alimentado com a dieta HSF a partir da oitava semana, até o fim do experimento, ocorrido na 14^a semana.

As quantidades de ração fornecida aos animais foram acompanhadas durante toda a experimentação, possibilitando-nos obter os valores relativos a ingestão média de ração diária, bem como o consumo calórico baseado nas informações energéticas de cada dieta (AIN93G = 4 kcal/g; HSF = 5 kcal/g).

Assim, camundongos alimentados com dieta HSF apresentaram aumento significativo do consumo calórico diário quando comparado aos animais alimentados com dieta AIN93G, consumindo o dobro de quilocalorias que os animais controle (Fig. 2).

GANHO DE PESO

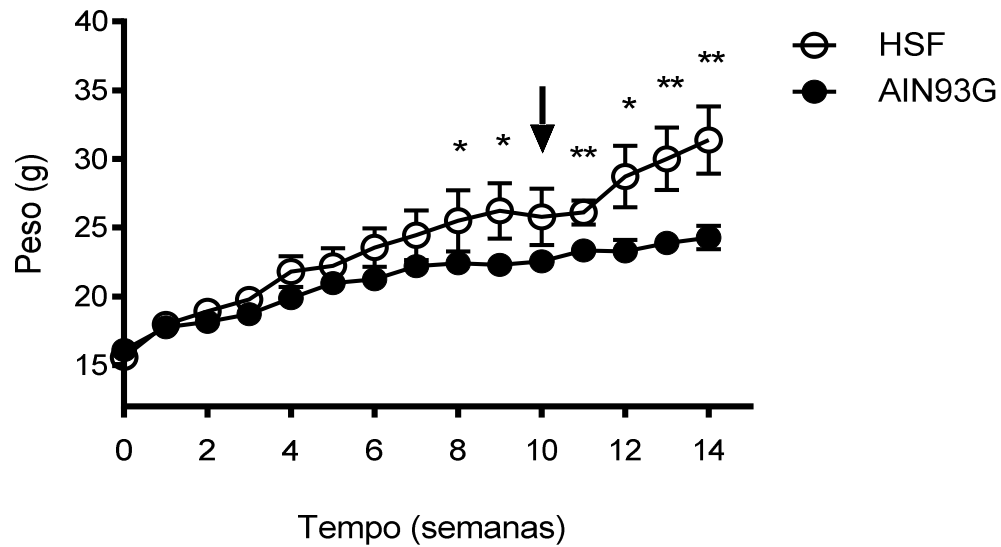


Figura 1: Avaliação do ganho de peso pela administração das dietas AIN93G e HSF. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. p < 0,05 (*) p < 0,01 (**).

INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA

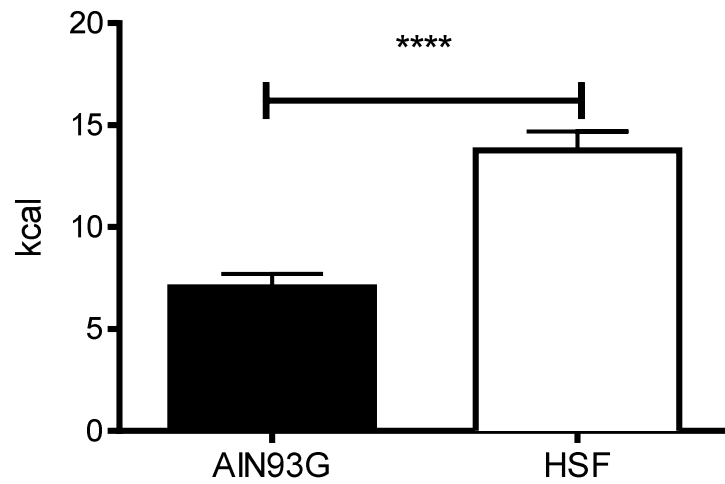


Figura 2: Ingestão alimentar média diária durante a administração das dietas AIN93G e HSF. A avaliação do consumo energético em quilocalorias foi resultado do produto do consumo diário em gramas (g) de cada animal, multiplicado pelo valor energético de cada dieta (AIN93G = 4 kcal/g; HSF = 5 kcal/g). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. $p < 0,0001$ (****).

Ao final das quatorze semanas de experimentação, os animais foram eutanasiados e o tecido adiposo gonadal foi recolhido e pesado para a comparação entre os grupos. Conforme demonstrado na figura 3, foi observado um aumento significativo no peso do tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta HSF em relação aos animais alimentados com dieta AIN93-G.

Além do peso, também foi avaliado o aspecto histológico do tecido adiposo gonadal de ambos os grupos. Os animais do grupo AIN93-G apresentaram adipócitos sem alterações histológicas (Fig. 4A). De forma contrária, adipócitos obtidos de animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram hipertrofia, com diâmetros significativamente superiores ao grupo controle (Fig. 4B). Além disso, camundongos alimentados com dieta HSF apresentaram uma relação de adiposidade, determinado pela razão entre o peso do tecido adiposo gonadal e peso corporal individual, significativamente maior quando comparados aos controles (Fig. 5).

Visto as alterações locais provocadas pela administração da dieta HSF, nos propusemos avaliar se o mesmo tratamento seria capaz de provocar alterações sistêmicas referente a celularidade dos animais. Diferentemente do observado anteriormente, não foram constatadas alterações significantes relacionadas a contagem global (Fig. 6A) ou proporções de células mononucleares e polimorfonucleares (Fig. 6B) nos grupos controle ou tratados com a dieta hipercalórica.

PESO DO TECIDO ADIPOSEO GONADAL

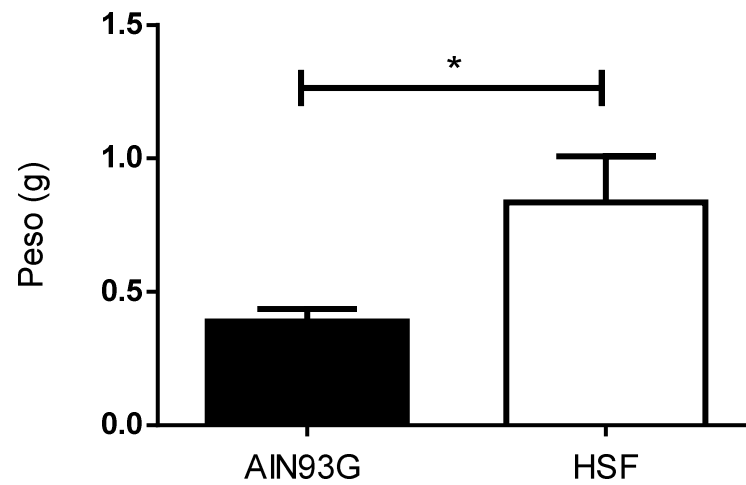


Figura 3: Peso do tecido adiposo gonadal após alimentação com as dietas AIN93G ou HSF. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. $p < 0,05$ (*).

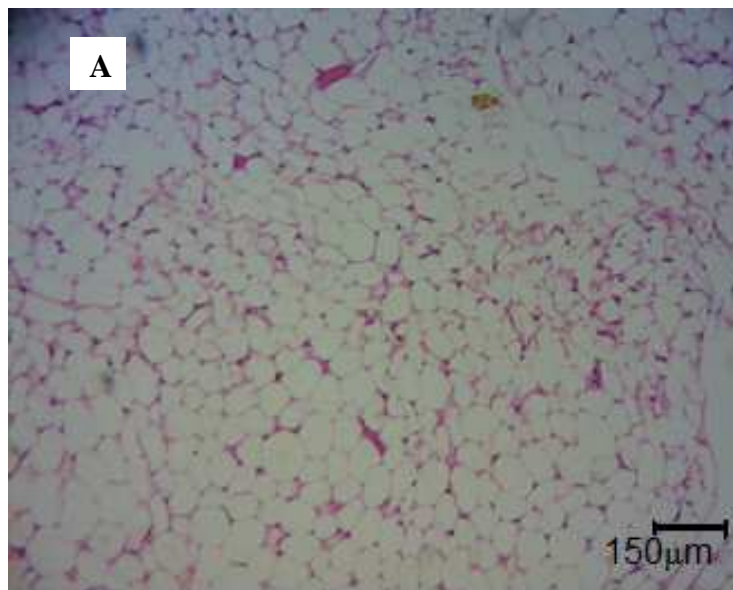
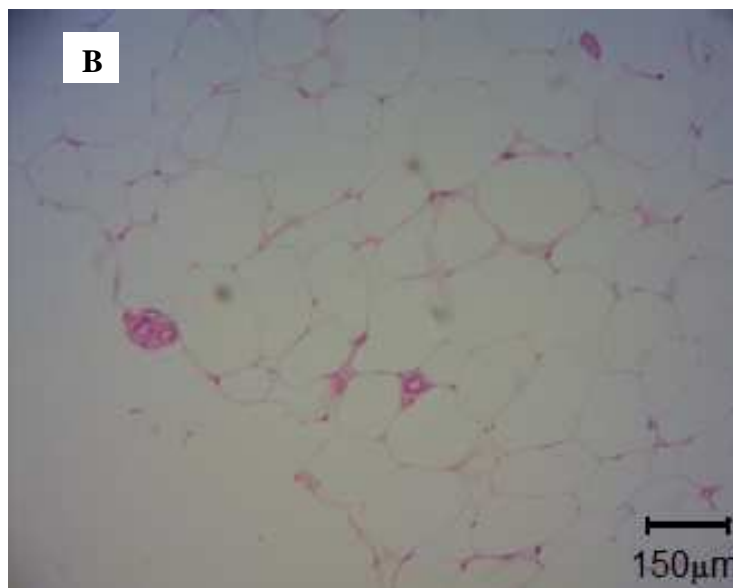
AIN93G**HSF**

Figura 4: Cortes histológicos de tecido adiposo gonadal. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Fragmentos de cada órgão foram removidos, fixados, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5 μ m de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas por microscopia de luz. Imagens com aumento de 100x. (A) Grupo AIN93G; (B) Grupo HSF.

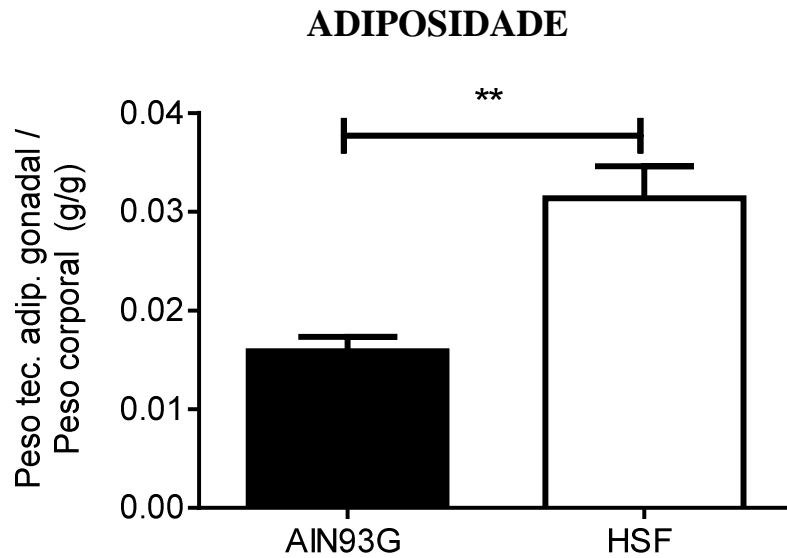


Figura 5: Adiposidade. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. A relação de adiposidade foi calculada a partir da divisão do peso do tecido adiposo gonadal pelo peso corporal de cada camundongo ao final do experimento. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. $p < 0,01$ (**).

CONTAGEM GLOBAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

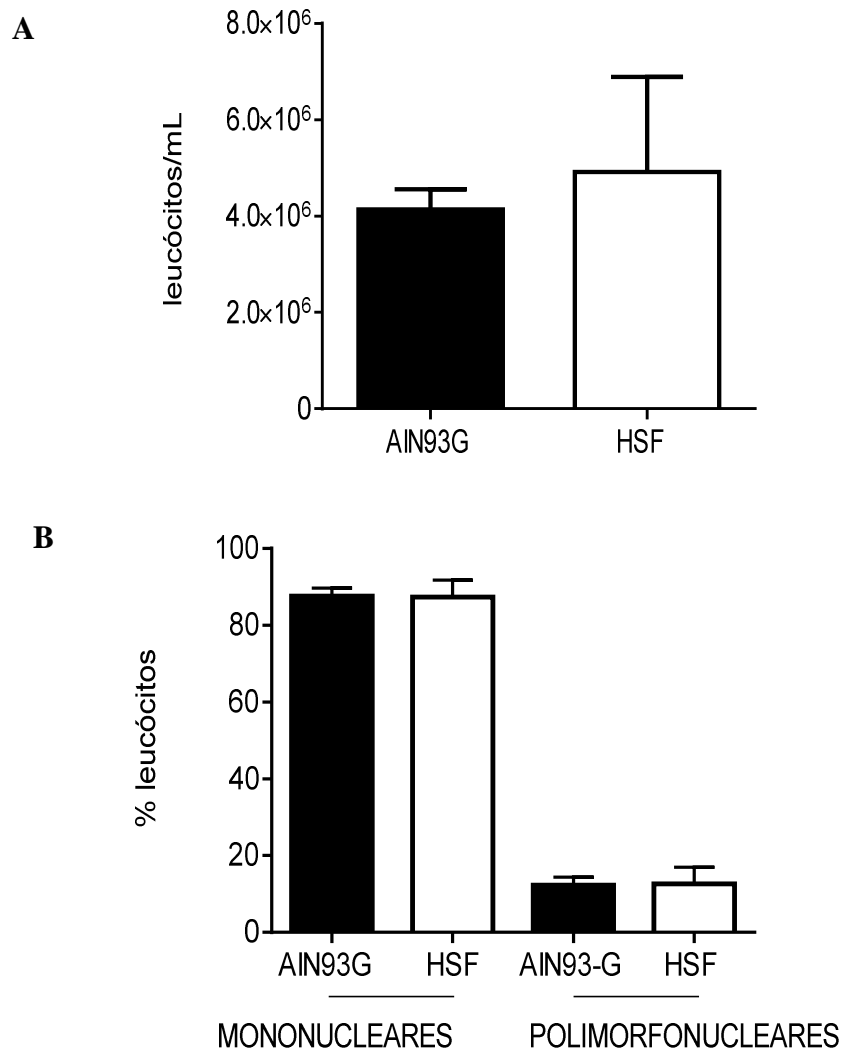


Figura 6. Contagem global e diferencial de leucócitos no sangue periférico. Contagem global de leucócitos realizada com alíquotas de sangue fresco solubilizadas em solução de Turk e contabilizadas em câmara de Neubauer por microscopia ótica em aumento de 100X (A). Contagem diferencial de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido e contabilizadas por microscopia ótica em aumento de 1000X (B). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. $p < 0,05$.

4.2 A OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA HIPERCALÓRICA AUMENTA A SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÃO POR *L. chagasi*.

O próximo passo de nosso trabalho foi avaliar os possíveis efeitos da obesidade induzida pela administração da dieta hipercalórica sobre alguns parâmetros imunológicos relacionados a resposta imune contra *L. chagasi*.

Os camundongos C57BL/6 tratados com ambas dietas foram infectados com 10^7 formas totais de *L. chagasi* na décima semana após o início da alimentação e eutanasiados vinte e oito dias após a infecção.

De forma interessante, animais que receberam a dieta hipercalórica apresentaram um aumento significativo no parasitismo do baço e fígado (Fig 7 A e B), bem como o aumento do peso total de ambos os órgãos (Fig 8 A e B), caracterizando manifestações clínicas observadas na LV. Ademais, camundongos tratados com a dieta HSF apresentaram esplenomegalia quando comparados aos animais tratados com a dieta controle (Fig 9).

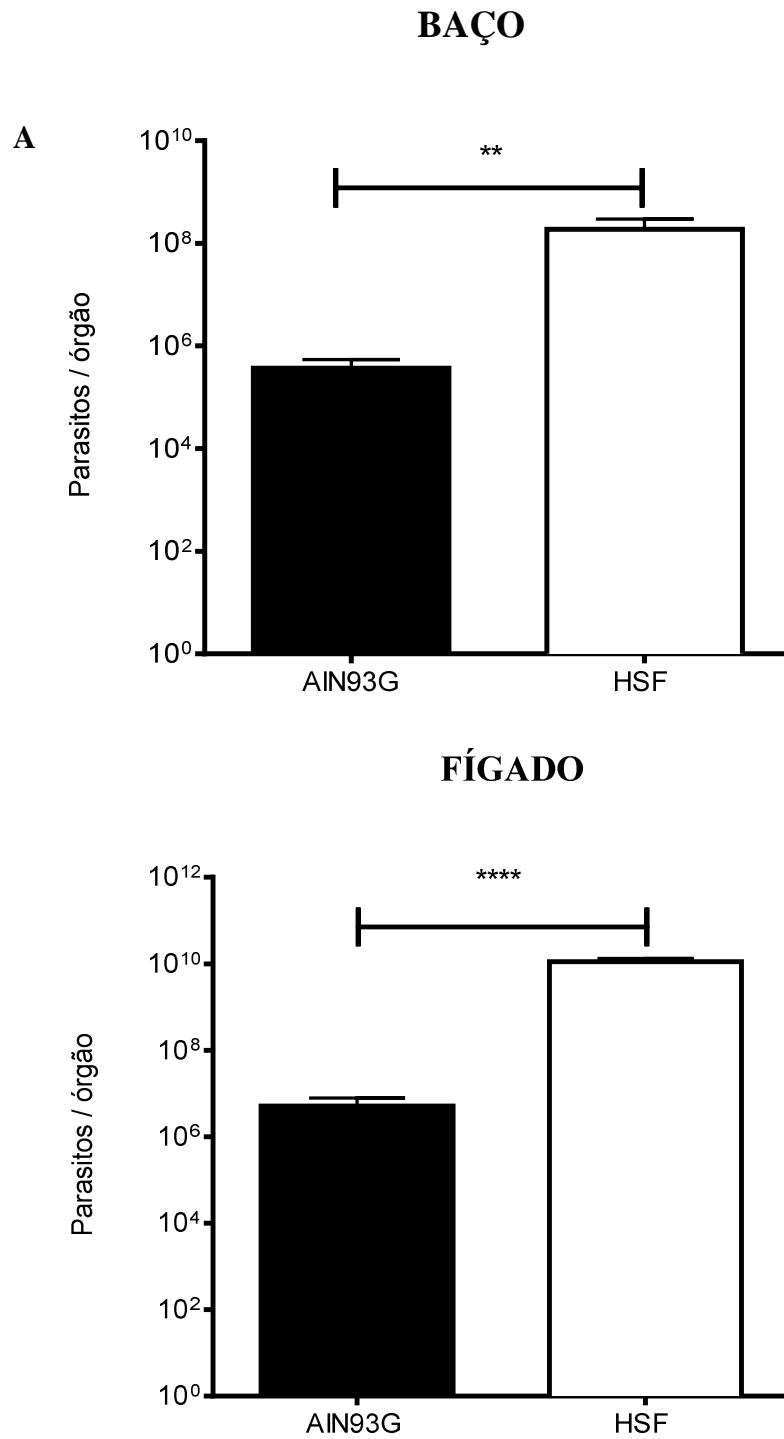


Figura 7. Carga parasitária no baço (A) e fígado (B). Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante (LDA). Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SD. $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****).

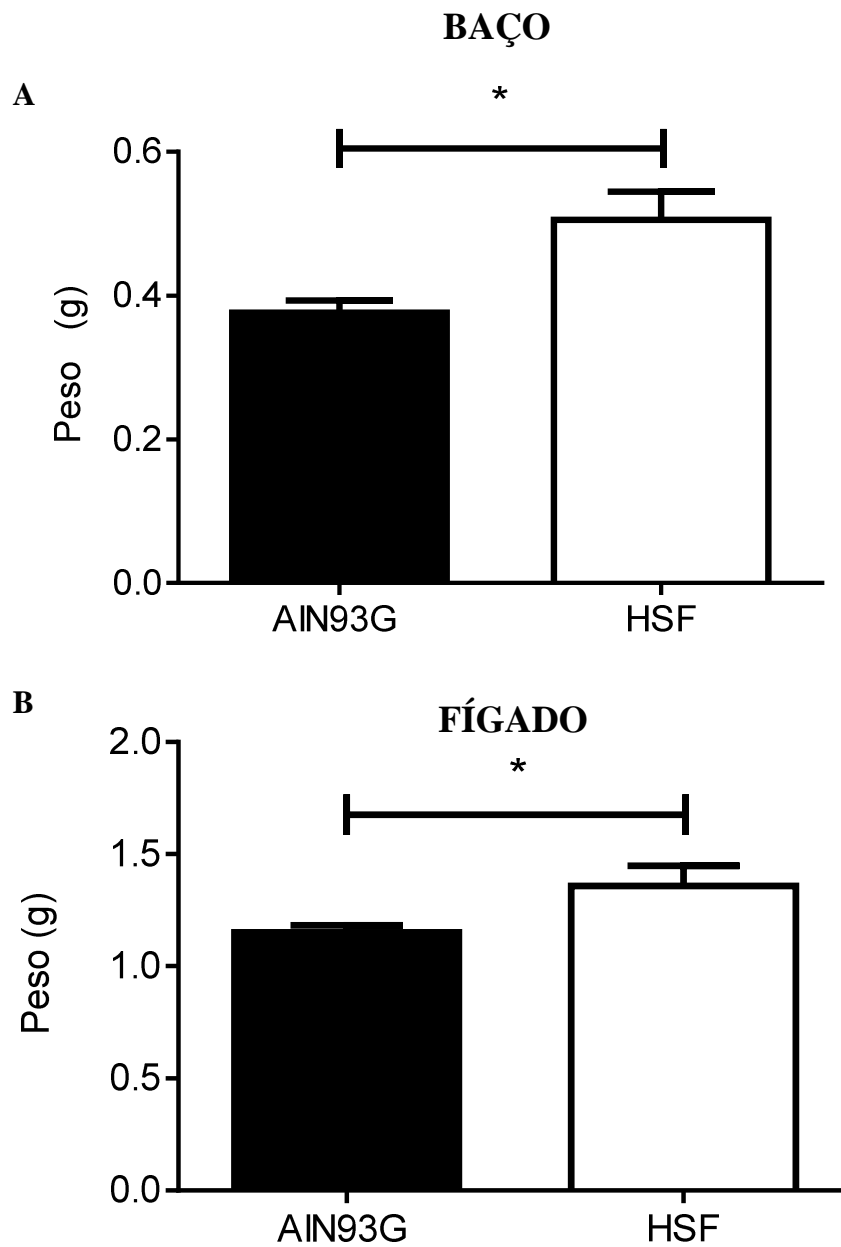


Figura 8. Peso do baço (A) e fígado (B). Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. $p < 0,05$ (*).

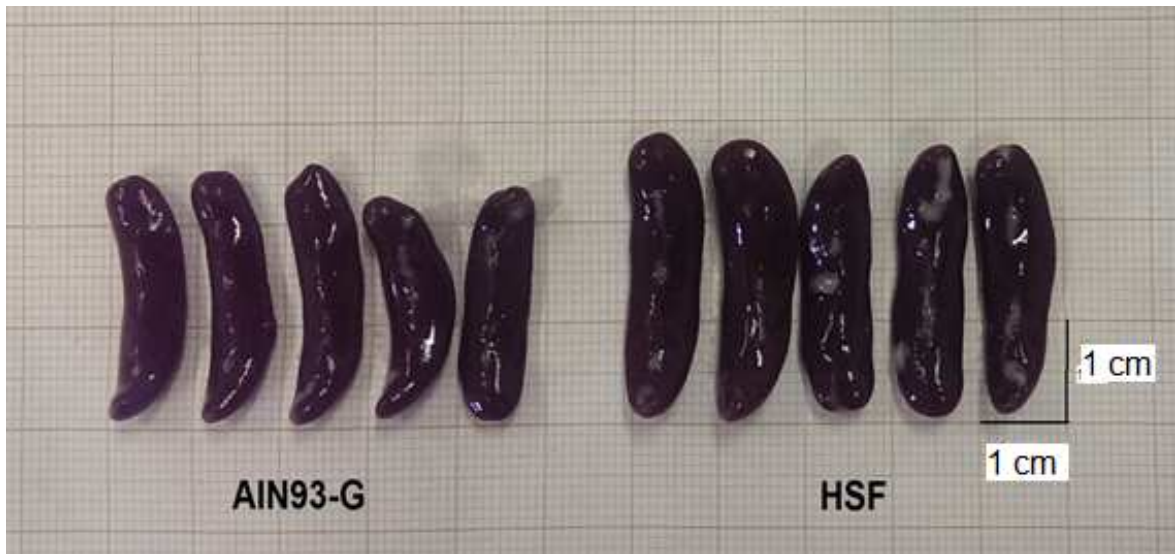


Figura 9: Característica macroscópica de baços. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 5 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção.

4.3 A OBESIDADE INDUZIDA PELA DIETA HIPERCALÓRICA PROMOVE UM PERFIL INFLAMATÓRIO INCAPAZ DE CONTROLAR A INFECÇÃO POR *L. chagasi*.

Tendo como base o grande parasitismo hepático e esplênico observado nos animais alimentados com a dieta hipercalórica e objetivando elucidar os mecanismos inflamatórios que poderiam estar associados ao aumento da susceptibilidade a infecção por *L. chagasi*, realizamos uma análise histopatológica dos órgãos em questão.

Não observamos diferenças macroscópicas no baço dos animais tratados com as diferentes dietas (Fig 10 A e B). De forma diferente, animais alimentados com dieta HSF e infectados apresentaram significativamente maiores focos de esteatose hepática, caracterizados pela presença de células vacuolizadas (Fig. 10 C e D) e inflamatórias.

Durante a análise das citocinas, observamos que os animais tratados com a dieta hipercalórica apresentaram um aumento significativo na produção de IFN- γ e IL-10 em ambos os órgãos, bem como da produção de IL-4 pelos esplenócitos dos animais alimentados com a dieta HSF (Fig. 11). De forma interessante estes mesmos animais apresentaram maiores produções de NO, um importante mediador leishmanicida, não correlacionando aos resultados observados na avaliação da carga parasitária (Fig. 13).

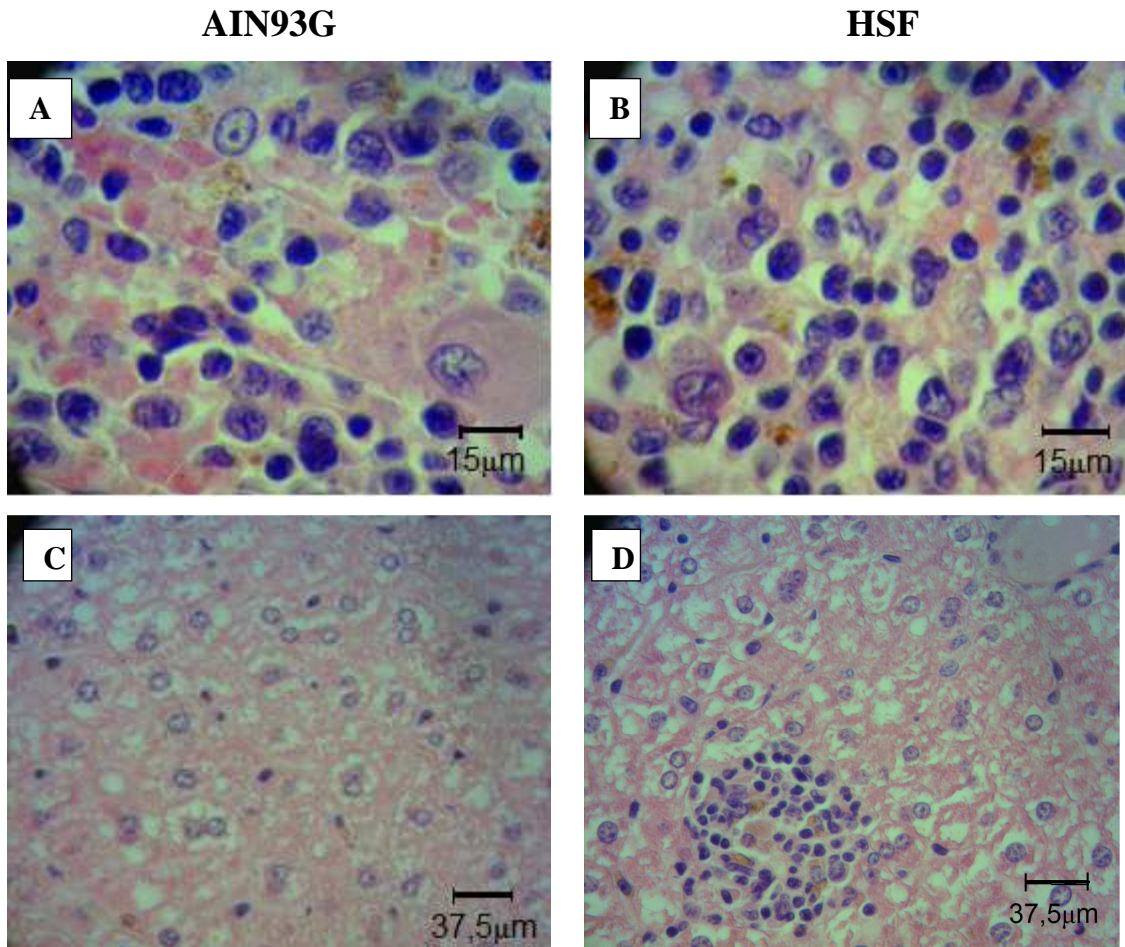


Figura 10. Cortes histológicas de baço e fígado. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. Fragmentos de cada órgão foram removidos, fixados, processados e incluídos em parafina. Seções histológicas de 5µm de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas por microscopia de luz. Imagens com aumento de 100x e 400x. (A) Grupo AIN93G baço; (B) Grupo HSF baço; (C) Grupo AIN93G fígado; (D) Grupo HSF fígado.

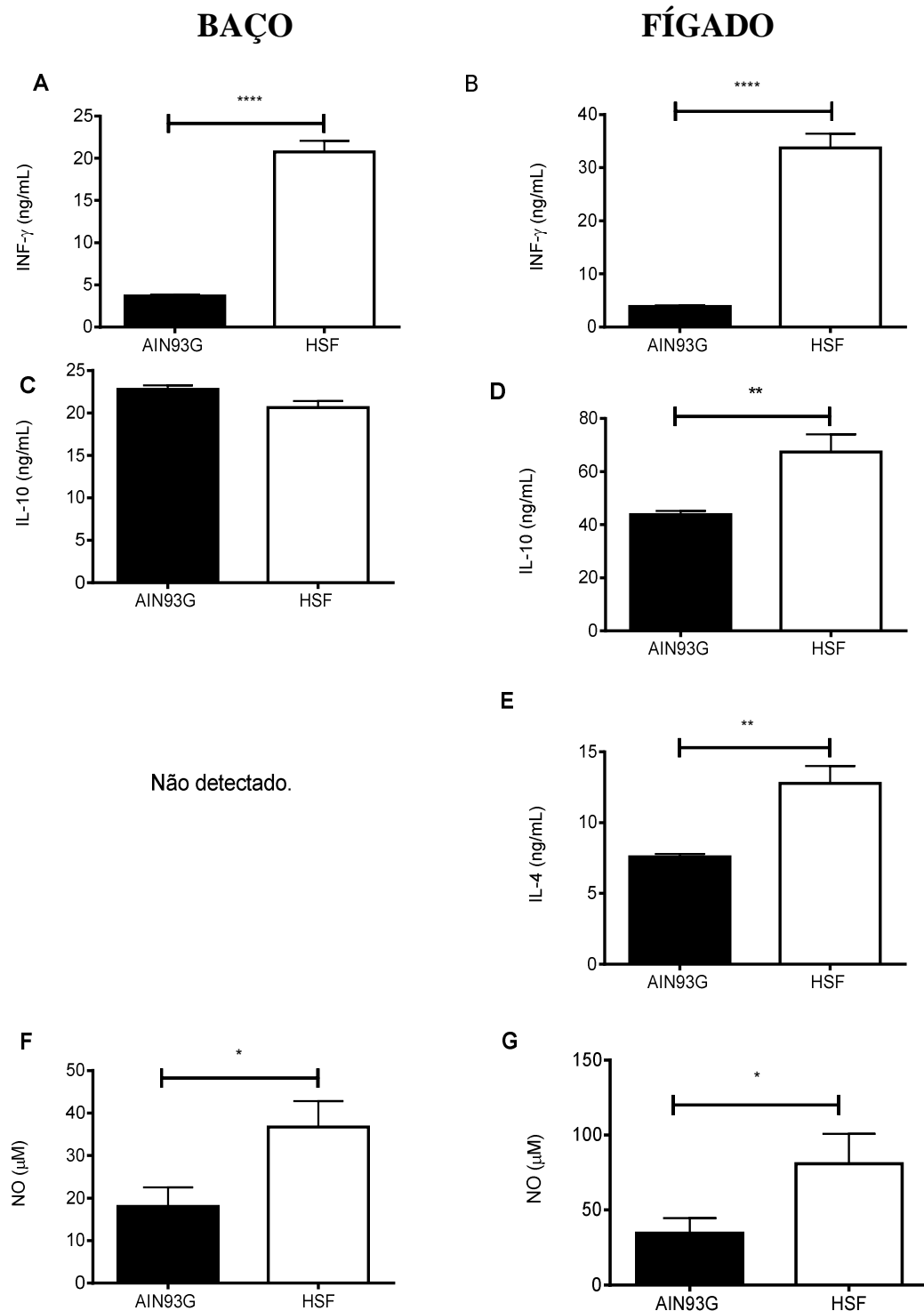


Figura 11: IFN- γ (ng/mL), IL-10 (ng/mL), IL-4 (ng/mL) e NO (μ M) em sobrenadante de células de baço e fígado. de camundongos C57BL/6 fêmeas (6-8 semanas), alimentados com dieta de camundongos C57BL/6 fêmeas (n = 6 / grupo) alimentados por 14 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSF) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. chagasi* na décima semana de alimentação e eutanasiados 28 dias após a infecção. A produção da citocina foi determinada por ELISA sanduíche e o NO pelo método de Griess. Teste t de Student. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética \pm SEM. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****).

5. Discussão

Nos países desenvolvidos houve substituição gradual e progressiva das doenças infecciosas e parasitárias por doenças crônico-degenerativas como causas de morbidade e mortalidade a partir da segunda metade do século XIX. Entretanto, em países em desenvolvimento, como o Brasil, esse perfil não foi observado. O que se tem relatado é um aumento da prevalência de distúrbios metabólicos, como diabetes *melito* tipo 2, dislipidemia, obesidade, hipertensão arterial sistêmica e síndrome metabólica, concomitante ou independente a várias doenças infecciosas e parasitárias, que ainda permanecem endêmicas em diversas regiões, como é o caso das leishmanioses (PONTES et al., 2009). A leishmaniose visceral é a forma mais grave dentre o largo espectro de doenças causadas por parasitos do gênero *leishmania*, negligenciada pelas autoridades e responsável por grandes impactos na saúde pública (WHO, 2014). Assim, a coexistência de doenças infecciosas e parasitárias com distúrbios metabólicos fez aumentar o interesse pelas possíveis interações existentes entre esses processos, principalmente com a constatação de uma elevada incidência de complicações tais como o aumento de marcadores inflamatórios e consequente distúrbio do sistema imunológico (MILNER; BECK, 2012; PONTES et al., 2009).

Neste trabalho objetivamos avaliar a influência da obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos C57BL/6, sobre a resposta imune após infecção com *L. chagasi*. A dieta indutora de obesidade foi formulada com alto teor de carboidratos simples e gordura saturada, como ocorre nas dietas consumidas pela maioria dos indivíduos obesos, com grande consumo de macronutrientes. Ademais, o grupo de pesquisa da Prof^a Tatiani Uceli Maioli, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Minas Gerais, já demonstrou que a dieta HSF (High Sugar and Fat) foi capaz de induzir obesidade e de provocar alterações metabólicas correlacionadas ao ganho de peso em modelos experimentais murinos com a linhagem C57BL/6 (em fase de elaboração)¹.

Iniciamos os estudos avaliando o ganho de peso médio dos animais durante cada semana de experimento (fig. 1). Os camundongos alimentados com ambas as dietas apresentaram um aumento progressivo no ganho de peso, já que encontravam em fase de crescimento ao longo do experimento. O aumento do peso, porém, foi mais expressivo no grupo alimentado com a dieta HSF, permanecendo com significância estatística mesmo após a infecção com *L. chagasi*, na décima semana de dieta. No trabalho de Ganz e colaboradores em (2014), camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram ganho de peso significativo em relação ao grupo controle com quatro semanas

¹ Maioli, T. U. Alterações metabólicas relacionadas ao ganho de peso em C57BL/6 alimentados com dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada. A ser editado pela UFMG; 2015.

de alimentação, no entanto, as fêmeas avaliadas nesse estudo, apresentaram esse perfil somente após a nona semana de dieta, o que se aproxima com os resultados encontrado em nosso estudo.

Durante o experimento, camundongos alimentados com a ração HSF consumiram 2,8 gramas/dia enquanto os alimentados com AIN93G consumiram 1,8 gramas/dia. Convertendo esse consumo em quilocalorias, obtivemos a ingestão alimentar média de cada animal do grupo experimental em questão (fig. 2). A dieta HSF contém cerca de 25% de gorduras e 50% de carboidratos simples o que, corrobora com o ganho de peso significativo em relação ao grupo AIN93G, devido o aporte calórico consumido. Em geral, dietas hipercalóricas têm sido utilizadas com composições diversas de carboidratos e gorduras, em média até 60% das calorias são obtidas a partir de lipídeos enquanto as dietas controle fornecem apenas 7% de gordura (BAUMGARNER et al., 2014; GANZ et al., 2014).

Buscamos avaliar o impacto desse alto teor calórico consumido para os adipócitos dos grupos estudados, visto que estes tipos celulares são as principais células constituintes do tecido adiposo, adaptadas para armazenar lipídeos e metabolizá-los sem comprometimento de sua integridade funcional (FONSECA-ALANIZ et al, 2007). De acordo com Bastard e colaboradores (2006), os adipócitos também apresentam propriedades semelhantes àquelas do sistema imune, envolvendo a produção de mediadores pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e ativação do sistema complemento. Além disso, os pré-adipócitos, células que dão origem aos adipócitos, desempenham funções de fagocitose, assim como os macrófagos (MOULIN et al., 2009). A alteração destas células pode ser um importante fator relacionado a manutenção/desequilíbrio da homeostase, implicando diretamente na capacidade imuno funcional. Camundongos alimentados com dieta HSF apresentaram um aumento significativo do tecido adiposo, bem como do volume dos adipócitos (fig. 3, fig. 4). Greenberg e Obin (2006) descrevem que o aumento ou expansão dos adipócitos caracteriza a ocorrência da obesidade. Esta condição favorece o aumento da produção e liberação de fatores pró-inflamatórios, diferentemente do observado por Moulin e colaboradores (2009) que descrevem que a perda de peso resulta em redução do tecido adiposo e conseqüentemente modificações no perfil imunológico, como a diminuição da secreção de mediadores inflamatórios e menor ativação de células inflamatórias.

Nas secções histológicas do grupo HSF (fig. 4B), confirmamos as alterações morfológicas ao observarmos a hipertrofia dos adipócitos do grupo HSF. O adipócito branco maduro armazena os triglicerídeos em forma de uma gota lipídica grande e única, a qual ocupa a porção central da célula, deslocando o citoplasma, o núcleo e as demais organelas

para a região periférica. Estas células apresentam um diâmetro entre 60 e 100 μm e podem alterar o seu tamanho, conforme a quantidade de lipídeos acumulados (FONSECA-ALANIZ et al, 2007).

Um outro parâmetro importante para comprovar o estabelecimento da obesidade realizado foi a relação de adiposidade. Na figura 5 observamos que a relação de adiposidade dos camundongos alimentados com dieta HSF foi significativamente maior do que animais alimentados com dieta AIN93G. O excesso de tecido adiposo acarreta alterações na contagem de leucócitos circulantes em humanos, como foi apresentado nos trabalhos de Nave et al. (2011) e Nave et al. (2012). Nesses estudos, observou-se que indivíduos obesos apresentavam aumento de neutrófilos e monócitos e pouca variabilidade de linfócitos. Diferentemente, ao realizarmos a contagem global e diferencial de células sanguíneas ao final do experimento, não obtivemos diferenças na contagem dessas células entre os grupos avaliados (figura 6). Esse fato pode ser devido a uma maior migração de células para o tecido adiposo dos animais obesos, pois o excesso de tecido adiposo provoca um acúmulo de células, principalmente linfócitos e macrófagos, alterando assim as células circulantes (WELLEN, HOTAMISLIGIL;2003; GREENBERG, OBIN; 2006; KANNEGANTI, DIXIT; 2012).

Após determinarmos que os animais apresentavam um perfil de obesidade e analisarmos o perfil celular sistêmico dos mesmos, buscamos estudar de forma mais específica possíveis alterações nos órgãos alvos da infecção pela LV. Verificamos assim, que o peso e o tamanho do baço do grupo HSF sofreram nítida influência após a infecção com leishmania (fig. 8A, fig. 9). A esplenomegalia observada nesse grupo é característica da infecção com espécie de leishmânia viscerotrópica (AHMED et al., 2003; ENGWERDA et al., 2004), neste caso, a *L. chagasi*. Rousseau et al. (1997), observaram um aumento do baço de camundongos infectados com *L. infantum* de 140mg para 198mg com 18 dias de infecção, e para 442mg com 70 dias de infecção. De acordo com Kaye et al.(2004), a persistência dos parasitos no baço é acompanhada pela falha da formação do granuloma e pela variedade de mudanças patológicas, incluindo esplenomegalia, alteração da microarquitetura do tecido linfóide e aumento da atividade hematopoiética. Na avaliação histopatológica desse órgão (fig. 10 A e B), observamos um aumento do infiltrado celular no grupo HSF quando comparado ao grupo controle.

Sabe-se que camundongos infectados com *L. chagasi*, apresentam rápida multiplicação de formas amastigotas no fígado durante as primeiras quatro semanas de infecção, as quais diminuem espontaneamente antes da oitava semana (ENGWERDA; KAYE, 2000.). Essa particularidade pode ocorrer provavelmente devido a características

intrínsecas deste órgão como o desenvolvimento de granulomas, importante para a resistência hepática na leishmaniose (KAYE et al., 2004; MALLA; MAHAJAN, 2006). Ao final das quatro semanas de infecção, de maneira semelhante ao baço, observamos um aumento significativo no peso do fígado do grupo HSF (figura 8 B). No baço, o aumento do número de parasitos é lento (WILSON; WEINSTOCK, 1996), e o fígado aparentemente serve como local para expansão inicial do parasito, sendo que o baço pode servir para a persistência da infecção (WILSON et al., 2005). Segundo Engwerda et al. (2004), a infecção hepática é usualmente auto-limitante e a resposta imune hepática é um bom exemplo de resposta inflamatória granulomatosa dominada por células mononucleares envolvendo células de kupffer, monócitos, e linfócitos TCD4 e TCD8. Múltiplas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-12, IL-4, níveis moderados de TNF- α produzido no granuloma hepático, e a produção de reativos de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio (KAYE et al., 2004) contribuem para a resistência do hospedeiro, especificamente no fígado. Na figura 10 C e D, observamos as secções histológicas do fígado. No grupo AIN93G (fig. 10C) observamos vacuolização e infiltrado celular. Já no grupo HSF (fig. 10D), observamos o granuloma, infiltrado inflamatório e alta vacuolização. Nossos resultados mostram que a infecção induz uma infiltração inflamatória hepática progressiva em ambos AIN93G e HSF, mas com uma acumulação leucocitária em proporções distintas. Diferentemente da infiltração difusa observada no HSF, os camundongos AIN93G mostraram uma inflamação contida em uma área significativamente menor, apresentando, portanto, uma menor lesão hepática. Contudo, os camundongos HSF foram capazes de formar pequenos granulomas, mas que claramente não foram eficazes em eliminar o parasito, como constatado pela carga parasitária apresentada por esse grupo.

Na avaliação dessa carga observamos que o grupo HSF, independente do órgão analisado, apresentou de maneira significativa maiores títulos de parasitos quando comparado ao grupo controle (figura 7 A baço e 7 B fígado). Assim, sugerimos que a obesidade influenciou diretamente na proliferação da cepa de *L. chagasi*, onde, o hospedeiro obeso pode apresentar uma resposta imune ineficiente frente à infecção, devido, possivelmente, ao distúrbio do sistema imune. Quando observamos um estado nutricional oposto, ou seja, a desnutrição, percebemos também altos títulos de parasitos em baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi*, apesar de haver reduções significativas no peso desses órgãos (SERAFIM et al., 2010). No trabalho de Amaral et al. (2009), ao administrar uma dieta contendo aminoácidos em C57BL/6 e infectar com *L. major*, observaram que os animais apresentavam títulos aumentados de parasitos, em comparação com o grupo controle, que

recebeu uma dieta à base de caseína. Esses aspectos, corroboram ainda mais com a conclusão de De Heredia et al. (2012), na qual observou-se diante dos vários estudos publicados, que há um circuito de retroalimentação positiva entre inflamação local no tecido adiposo e resposta imune alterada em obesidade, ambos contribuindo para o desenvolvimento de complicações metabólicas associadas. A obesidade, assim como outros estados de desnutrição, afeta a função imune, alterando as contagens de leucócitos, bem como as respostas imunes mediadas por células. Além disso, tem surgido evidências de que uma função imune alterada contribui para a patogênese da obesidade.

A análise da produção de citocinas revelou alta produção de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no grupo HSF comparado ao grupo controle. O mesmo padrão encontramos no trabalho de Rolão et al. (2007), que caracterizaram o curso da infecção e resposta imunológica desenvolvida pela *L. infantum* em camundongos BALB/c. Durante o experimento, não foi observado padrão distinto de produção de citocinas Th1 e Th2, no qual, os camundongos infectados desenvolveram uma resposta imune mista, com concomitante produção de INF- γ , IL-10 e IL-4, no baço e no fígado.

Nesse estudo, a alta detecção de INF- γ (fig. 11 A e 11 B) não coincidiu com a diminuição da carga parasitária (fig. 97A e 7 B). Ansari et al.(2006) afirmam que apesar da presença de níveis elevados de IFN- γ durante a infecção, o hospedeiro pode falhar no controle da infecção pela leishmania. Por outro lado, Rolão et al. (2007) observaram que altos níveis de INF- γ coincidiram com a redução da carga parasitária.

A IL-10 foi detectada em ambos os grupos e no fígado encontra-se estaticamente mais elevada no grupo HSF (fig. 11 D). É descrito que essa citocina suprime a produção do IFN- γ , inibindo a ativação de macrófagos (BASU et al, 2005). Além disso, a presença dessa citocina pode também diminuir a apresentação de antígenos pelas CDs e a ativação de células T (COUPER et al, 2008). Gomes-Pereira et al.(2004) observaram que os níveis de IL-10 não foram suficientes para inibir a produção de IFN- γ pelos leucócitos hepáticos e subsequente destruição dos parasitos. Isto suporta a hipótese que esta citocina não tem efeito inibitório direto na função do IFN- γ na leishmaniose experimental pela *L. infantum*.

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida especificamente por células TCD4+Th2, mas estudos posteriores mostraram que esta citocina é secretada tanto por células Th1 quanto por Th2 (MOORE et al., 2001). Novos relatos têm mostrado que a produção de IL-10 por células efetoras Th1 ajudam a limitar o dano colateral causado por uma inflamação exagerada. Mas este controle pode também limitar a eficiência da resposta

imune, não sendo efetiva ao tentar eliminar completamente o patógeno (TRINCHIERI G, 2007).

A IL-4 foi detectada no fígado e foi estatisticamente significativa no grupo HSF em relação ao controle, já no baço a citocina não foi detectada. A ausência de um papel significativo da IL-4 na infecção de LV em modelo murino foi observada por vários autores. Melby et al. (2001) analisando sua produção *in situ* no baço, não detectaram IL-4 por imunohistoquímica; Melby et al. (1998) demonstraram a mínima expressão de RNAm de IL-4 em baços de camundongos infectados e, Miralles et al. (1994) ao tratar camundongos com anticorpo anti IL-4 ou receptor solúvel de IL-4, não observaram alteração da carga parasitária. No entanto, no modelo com camundongos e *L. major*, a IL-4 se enquadra como uma citocina que não protege o hospedeiro (BOGDAN, 1996).

Os parasitos do gênero leishmania infectam e se replicam no interior dos macrófagos, e são estas células que possuem a capacidade de matar este protozoário intracelular. Uma importante molécula leishmanicida produzida pelos macrófagos é o NO, gerado após a ativação com IFN- γ de macrófagos infectados (CUNHA et al., 1993; GANTT et al., 2001). Na figura 11 F e 11 G podemos observar que os níveis de NO foram elevados no baço e fígado dos animais HSF, porém esse resultado não se correlacionou com o elevado parasitismo nesses órgãos. No trabalho de Amaral, et al. (2009) observou-se uma produção insuficiente de NO, e conseqüente aumento da carga parasitária nos animais com dieta de aminoácidos. Desta forma, o aumento do parasitismo mesmo com a alta produção de NO observado em nossos experimentos nos mostram que somente o NO pode ter sido insuficiente para a eliminação do parasito. Constatamos que há necessidade de outro mecanismo leishmanicida, como a produção de outros metabólitos tóxicos como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, não avaliados em nosso trabalho.

De acordo com os resultados do presente estudo, observa-se um padrão misto Th1/Th2 na produção de citocinas. Ambas as formas de leishmaniose cutânea ou visceral requerem resposta imune Th1 para o controle da infecção nos modelos experimentais. Como há evidências de que a obesidade está associada a respostas inflamatórias crônicas, caracterizadas pela produção anormal de citocinas, aumento dos marcadores pró-inflamatórios de fase aguda e ativação dos sinalizadores inflamatórios (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003), podemos relacionar nossos resultados com a alteração da homeostase imunológica encontrada em indivíduos obesos. O tecido adiposo apresenta uma correlação direta com o sistema imune pela secreção de adipocinas, citocinas e quimiocinas (NAVE et al.; 2011), levando a alterações na quimiotaxia de células e comprometimento da atividade de

macrófagos (HUTTUNEN; SYRJANEN, 2012), provavelmente motivo pelo qual os obesos são mais susceptíveis a infecções.

6. Conclusões

Nossos dados demonstram que:

1. A administração de dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada foi eficiente na indução da obesidade experimental em modelo murino.
2. A administração de dieta rica em carboidratos simples e gordura saturada foi capaz de provocar alterações sistêmicas em decorrência do estabelecimento da obesidade.
3. Camundongos obesos foram capazes de gerar uma alta resposta inflamatória em resposta a infecção com *L. chagasi*.
4. A obesidade induzida pela dieta hipercalórica aumentou a susceptibilidade a infecção por *L. chagasi*.

Conclusão geral:

A obesidade induziu aumento de citocinas pró-inflamatórias, porém estas não foram suficientes para a eliminação do parasito.

7. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Citocinas. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 235-269.

ACTOR, P. Protein and vitamin intake and visceral leishmaniasis in the mouse. **Experimental parasitology**. v. 10, p. 1–20, 1960.

AHMED, S. *et al.* Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 71, p. 401–410, 2003.

ALENCAR, J. E; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: _____. VERONEZI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 706-717, 1991.

ALEXANDER J, BRYSON K. T helper(h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**. v. 99, p. 17-23, 2005.

AMARAL, J. F. *et al.* Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 455–64, 2010.

ANAM, K. *et al.* Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, p. 231–235, 1999.

ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical immunology**, v. 119, p. 339–345, 2006.

ANSTEAD, G. M. *et al.* Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709–4718, 2001.

ANTONELLI, L. R. V *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and experimental immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–348, 2004.

BACELLAR, O. *et al.* IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, San Diego, v. 12, p. 1228-1231, 2000.

BADARÓ, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, p. 639–649, 1986.

BASANOVA, A. V; BASKOVA, I. P.; ZAVALOVA, L. L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. **Biochemistry**, v. 67, p. 143–150, 2002.

BASTARD, J.-P. *et al.* Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v. 17, p. 4–12, 2006.

BASU, R. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 174, n. 11, p. 7160–7171, 2005.

BOGDAN, C. *et al.* Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current opinion in immunology**, v. 8, p. 517-525. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde. **Plano Estadual de Saúde 2012-2015** – Espírito Santo. Vitória, Novembro de 2012.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L- arginine metabolism. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641–54, 2005.

BUFFET, P. A. *et al.* Culture microtitration: A sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, p. 2167–2168, 1995.

CALDAS, A. *et al.* Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005.

CAMUSSI, G; BUSSOLINO, F; SALVIDIO, G; BAGLIONI, C. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet- activating factor. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, p. 1390–1404, 1987.

CARNEIRO, D. D. M. T. Estudo epidemiológico sobre a Leishmaniose Visceral em centro urbano de médio porte com transmissão antiga e persistente de *Leishmania Leishmania infantum*. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2013.

CARVALHO, E. M. *et al.* Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 135, n. 6, p. 4144–4148, 1985.

CECÍLIO, P. *et al.* Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 480, 2014.

CHARMOY, M. *et al.* *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, p. 288–299, 2007.

CHER, D. J.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper cell clone. II Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 138, p. 3688-3694, 1987.

CLEMENTS, M. F. *et al.* Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, p. 801–807, 2010.

COFFMAN, R. L. *et al.* The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunological reviews**, Copenhagen, v.1 02, p. 5-28, 1988.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 5771–7, 2008.

CUNHA, F. Q, *et al.* Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. **European journal of immunology**, v. 23, p. 1385-1388, 1993.

DA MATTA, V. L. R. *et al.* Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 14, p. 5–12, 2000.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **The proceedings of the nutrition society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, 2012.

DE LORENZO, A. *et al.* Normal-weight obese syndrome: Early inflammation? **American journal of clinical nutrition**, v. 85, p. 40–45, 2007.

DEAK, E. *et al.* Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European journal of immunology**, v. 40, p. 1355–1368, 2010.

ENGELI, S. *et al.* Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. **Diabetes**, v. 52, p. 942–947. 2003.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in parasitology**, 2004.

FERRO, C. *et al.* Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of medical entomology**, v. 32, n. 4, p. 527–537, 1995.

FITZGERALD-BOCARSLY, P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. **Biotechniques**, v. Suppl, p. 16–20, 22, 24–9, 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de pediatria**, v. 83, p. S192–S203, 2007.

GÄBELE, E. *et al.* A New Model of Interactive Effects of Alcohol and High-Fat Diet on Hepatic Fibrosis. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 35, p. 1361–1367, 2011.

GALVÃO-CASTRO, B. *et al.* Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 56, p. 58–66, 1984.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, p. 893–901, 2001.

GANZ, M.; CSAK, T.; SZABO, G. High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 26, p. 8525–8534, 2014.

GARIN, Y. J. *et al.* Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7365-7373, 2001.

GHAILU, A. *et al.* T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 117, n. 2, p. 182–191, 2005.

GHALIB, H. W. *et al.* Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324–329, 1993.

GHEDIN, E. *et al.* Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.

GHOSH, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, p. 291–296, 1995.

GIDWANI, K. *et al.* Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: A cluster-randomized trial. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 5, 2011.

GOMES-PEREIRA, S. *et al.* Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: Importance of CD8+ T cells and TGF- β production. **FEMS Immunology and medical microbiology**, v. 41, p. 59–68, 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.

GREEN, S. J., L. F. *et al.* "Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens." **Immunology letters**, v. 43, p. 87-94. 1994.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **American journal of clinical nutrition**. Anais, v. 83, 2006.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 106, p. 6748–6753, 2009.

HANSEN, T. *et al.* Visceral adipose tissue, adiponectin levels and insulin resistance are related to atherosclerosis as assessed by whole-body magnetic resonance angiography in an elderly population. **Atherosclerosis**, v.205, p. 163-167. 2009.

HIROSUMI, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, p. 333–336, 2002.

HONORE, S. *et al.* Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. **FEMS Immunology and medical microbiology**, v. 21, n. 3, p. 231-239, 1998.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders 1. **Nature**, v. 444, p. 860–867, 2006.

HUTTUNEN, R.; SYRJÄNEN, J. Obesity and the risk and outcome of infection. **International journal of obesity**, v. 37, p. 333–340, 2012.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity**, v. 11, p. 11-18, 2010.

ITO, M. *et al.* Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. **Hepatology research: the official journal of the japan society of hepatology**, v. 37, p. 50–57, 2007.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. **Trends in immunology**, v. 22, n. 2, p. 78–83, 2001.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.

KANNEGANTI, T.-D.; DIXIT, V. D. Immunological complications of obesity. **Nature Immunology**, v. 13, p. 707-712, 2012.

KARLSSON, E. A; SHERIDAN, P. A; BECK, M. A. Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 6, p. 3127–3133, 2010.

KAYE, P. M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239- 253, 2004.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901-915, 2014.

KHALIL, E. A. G. *et al.* Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clinical and experimental immunology**, v. 140, n. 2, p. 349–53, 2005.

KHOVIDHUNKIT, W. *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **Journal of lipid research**, v. 45, p. 1169–1196, 2004.

KROPF, P. *et al.* Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **FASEB journal: official publication of the federation of american societies for experimental biology**, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.

KRYSIAK, R. *et al.* Pleiotropic effects of atorvastatin and fenofibrate in metabolic syndrome and different types of pre-diabetes. **Diabetes care**, v. 33, p. 2266-2270, 2010.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. August, p. 251, 2012.

- LERNER, E. A.; SHOEMAKER, C. B. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 2, p. 1062–1066, 1992.
- LETA, S.; DAO, T. H. T.; MESELE, F.; ALEMAYEHU, G. Visceral leishmaniasis in Ethiopia: an evolving disease. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, e3131, 2014.
- LIEW, F. Y. *et al.* Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 1990.
- MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - Some recent concepts. **Indian journal of medical research**, v. 123, p. 267-274. 2006.
- MANCUSO, P. Obesity and lung inflammation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 108, n. 3, p. 722–728, 2010.
- MELBY, P. C. *et al.* Leishmania donovani: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental parasitology**, v. 99, p. 17–25, 2001.
- MELBY, P. C. *et al.* Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 66, p. 18–27, 1998.
- MELBY, P. C. *et al.* The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, p. 1912–1920, 2001.
- MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **The proceedings of the nutrition society**, v. 71, p. 298–306, 2012.
- MIRALLES, G. D. *et al.* Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 62, p. 1058–1063, 1994.
- MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.
- MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles the lymphokines activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MOULIN, C. M. *et al.* Impact of adiposity on immunological parameters. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, p. 183–189, 2009.

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J.; COFFMAN, R. L. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (Th2) - associated response model. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, p. 867–874, 1997.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **Journal of clinical investigation**, v. 72, p. 1506–1510, 1983.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.

NAVE, H.; BEUTEL, G.; KIELSTEIN, J. T. Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. **The lancet infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 14–15, 2011.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, p. 8088–8098, 2009.

OLIVA, G. *et al.* Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318–1322, 2006

PARK, S. *et al.* Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-*Lepr^{db}/Lepr^{db}* mice to infection by *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1008–1014, 2009.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, p. 970–974, 2008.

PONTES R. J, RAMOS-JÚNIOR A. N, KERR L. R. S, BOSI M. L. M. Transição demográfica e epidemiológica. In:____.Medronho R. A, BLOCH K. V, LUIZ R. R, WERNECK G. L. **Epidemiologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu; p. 123-152, 2009

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143–152, 1995.

RIBEIRO, J. M. *et al.* *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 5, p. 743–7, 2000.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, p. 143–148, 1998.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, p. 4454–4462, 2004.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, p. 3988–3994, 2007.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite immunology**, v. 25, n. 3, p. 127–134, 2003.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 5, p. 495–507, 2002.

ROLÃO, N. *et al.* *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental parasitology**, v. 115, p. 270–276, 2007.

RONET, C., *et al.* *Leishmania major*-specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, p. 4825–4835, 2008.

ROUSSEAU D, *et al.* Progression of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in BALB/c mice is markedly slowed by prior infection with *Trichinella spiralis*. **Infection and immunity**, v. 65, p. 4978-4983. 1997.

RYAN, J. R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, p. 1037–1043, 2002.

SABIO, G. *et al.* A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, p. 1539–1543, 2008.

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 8, n.10, p. e3208, 2014.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1993.

SCHLEICHER, U. *et al.* NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 893–906, 2007.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE – ESPÍRITO SANTO. Plano Estadual de Saúde 2012/2015. Vitória - ES: [s.n.], 2012.

SERAFIM, T. D. *et al.* Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 811–817, 2010.

SHAMSHIEV, A. T. *et al.* Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 441–452, 2007.

SHERIDAN, P. A. *et al.* Obesity is associated with impaired immune response to *influenza* vaccination in humans. **International journal of obesity (2005)**, v. 36, n. 8, p. 1072–1077, 2012.

SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SINGH, S.; KUMARI, V.; SINGH, N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, p. 568–572, 2002.

SMELT, S. C. *et al.* B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, p. 3681–3688, 2000.

SUNDAR, S, *et al.* Immunochromatographic strip-test detection of anti-K39 antibody in Indian visceral leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**. v. 96, p. 19–23. 2002.

SUNDAR, S, RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. v. 9, p. 951–958. 2002.

SUNDAR, S. *et al.* Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 176, n. 4, p. 1117–1119, 1997.

- TEIXEIRA, C. R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2005.
- THALHOFER, C. J. *et al.* Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. **Infection and immunity**, v. 79, p. 108–117, 2011.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, p. 239–243, 2007.
- VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, p. 6521–6525, 2004.
- WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of clinical investigation**, v. 112, p. 1796–1808, 2003.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1785–1788, 2003.
- WIELAND, C. W. *et al.* Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. **International immunology**, v. 17, n. 11, p. 1399–408, 2005.
- WILSON ME, WEINSTOCK JV. Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. **Methods**, v. 9, p. 248–54, 1996.
- WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial pathogenesis**, v. 38, p. 147–160, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics. Obesity and overweight**. Geneva, Ficha informativa N°311, 2015a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics. Obesity**. Geneva, 2015b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva, 2014.
- XU, Z. J. *et al.* Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, p. 931–940, 2010.
- YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003.

ZER, R. *et al.* Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 8, p. 810–814, 2001.

ZHANG Y, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. v. 372, p. 425-431, 1994.

ZHANG, W. W. *et al.* Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35508-35515, 2003

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 4, p. 935-948, 2001.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 94, n. 16, p. 8807-8811, 1997.

ZHOU, Q.; LEEMAN, S. E.; AMAR, S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 108, p. 2867–2872, 2011.