UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA

AVALIAÇÃO DA NUTRIÇÃO NA CAPACIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIETA INDUTORA DE OBESIDADE E DIETA À BASE DE AMINOÁCIDOS DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania infantum.*

Vitória - ES

2020

GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA

AVALIAÇÃO DA NUTRIÇÃO NA CAPACIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS C57BL/6 ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIETA INDUTORA DE OBESIDADE E DIETA À BASE DE AMINOÁCIDOS DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania infantum.*

Tese de Doutorado 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 título de doutora em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

Co-orientadoras: Dra. Tatiani Maioli e Dra. Luciana P. Covre

Vitória - ES

2020

Dados bibliográficos

Parecer da banca avaliadora.

Dedico este trabalho à minha avó Ninfa (*in memoriam*).

Acabei os estudos, vó. Estou voltando para casa.

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.

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.

As minhas co-orientadoras Drª. Tatiani Uceli Maioli pela disponibilidade durante este trabalho e Drª. Luciana Polaco Covre, que se dispôs em me acompanhar a cada experimento e cada dúvida. Aprendi muito com você.

Aos professores da banca, por cederem parte do seu tempo a fim de nos prestigirem e certamente acrescentar muito a este trabalho.

Ao Lorenzo e Renan, que me ajudaram muitos nos últimos experimentos e análises.

A Régia, que tornou meus dias mais doces e foi fundamental para este trabalho.

A todos do laboratório, por todos esses anos de convivência, trabalho, risadas e experimentos. Foi maravilhoso aprender com cada um. Em especial Estevão, Juliana, Maria, Caio, Carlinha, Carlos, Naira, Vívian, Bruna, Jéssica, Paola, Priscila, Gabriela, Camila, Pâmela, Anna Clara, Thabata.

Ao pessoal do Nucléo de Doenças Infeciosas pelo carinho comigo e por serem sempre tão agradáveis: Brunelli, Lau, Ary, Rose, Gerson, Canal, Seu Geraldo *(in memoriam),* Leduk, João e Célia.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas pelo conhecimento, em especial Professor Fausto Edmundo Lima Pereira pelo exemplo profissional, pela oportunidade de convivência, por cada técnica ensinada e pelas conversas, que acrescentam

em muito na minha formação científica e pessoal.

Ao Professor Breno pela admiração que nos desperta, pela ajuda com meus animais, pelos diversos conselhos, pela disposição em ajudar e pelo prazer em transmitir o conhecimento. Obrigada professor de todo o meu coração!

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

A Bárbara D'Ávila, por me ouvir e impulsionar sempre .

A Joelma Passos, por me ajudar na formatação e orações.

A CAPES 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.

A vocês o meu muito obrigada e o meu carinho!

"Se pudéssemos dar a cada indivíduo a quantidade certa de nutrição e exercício físico, teríamos encontrado o caminho mais seguro para a saúde"

Hipócrates 460-377 a.C.

RESUMO

Há muito tempo se aceita que a imunidade ou suscetibilidade a doença depende em certa medida da nutrição. Desequilíbrios nutricionais afetam a capacidade de o hospedeiro produzir resposta inflamatória protetora, acarretando prejuízos às defesas imunológicas. Muitos desses mecanismos celulares 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. infantum*. Camundongos fêmeas C57BL / 6, alimentados com dieta controle (CTRL) ou com dieta com alto teor de açúcares e gordura (HSB) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum* após estabelecimento da obesidade e sacrificados no pico de parasitismo. 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. infantum*, porém apresentaram aumento da susceptibilidade à infecção. Diante destes achados, realizamos uma ampla caracterização da expressão de receptores inibitórios nos compartimentos de células T durante a obesidade e infecção, e não pudemos associar a susceptibilidade aumentada nos animais obesos a esses fatores. Estes dados sugerem que um macroambiente hipercalórico pode interferir diretamente na resposta a sinais provenientes de organismos patogênicos e distorcer o desenvolvimento de uma imunidade anti-leishmania. Ainda relacionado ao à nutrição e infecções, avaliamos a influência de uma dieta à base de aminoácidos no mesmo contexto. Camundongos fêmeas C57BL / 6, alimentados com dieta controle (CTRL) ou com dieta com aminoácidos como fonte de proteína (AA) foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum* após o desmame e sacrificados no pico de parasitismo. Camundongos que receberam a dieta AA apresentaram aumento da susceptibilidade à infecção, com alteração do perfil inflamatório, diminuição das células T, macrófagos e proliferação celular nos compartimentos estudados. Estes dados juntos nos mostram que dieta é um importante fator que influencia a função e o desenvolvimento do sistema imunológico diante de infecções.

Palavras-chave:

Dieta, Leishmaniose Visceral, Distúrbio Metabólico, Obesidade, Infecção.

ABSTRACT

It has long been accepted that immunity or susceptibility to disease depends on the measure of nutrition. Nutritional imbalances affect the ability to host the protective inflammatory response, causing damage to immune defenses. Many of these mechanisms remain mobile to be elucidated. Using a model of mice fed an obesity-inducing diet, rich in simple carbohydrates and saturated fat, the influence of eating behavior on the development of visceral leishmaniasis used by *L. infantum* was examined. Female mice C57BL / 6, foods with diet control (CTRL) or with a high sugar and fat diet (HSB) were infected with 10^7 *L. infantum* promastigotes after obesity treatment and sacrificed in parasitism peak. The administration of a diet rich in simple carbohydrates and saturated fat was efficient in inducing experimental obesity in a murine model, causing systemic changes. Obese mice were able to generate a high inflammatory response in response to an infection with *L. infantum* but increased susceptibility to infection. In view of these findings, we carried out a broad characterization of the expression of inhibitory receptors in T cell compartments during obesity and infection, and we were unable to associate the increased susceptibility in obese animals to these factors. These data suggest that a macroenvironmental hypercaloric can directly interfere in the response to signals from pathogenic organisms and distort the development of an anti-leishmania immunity. Still related to nutrition and infections, available on the influence of an amino acid-based diet in the same context. C57BL / 6 mice fed a control diet (CTRL) or a diet with amino acids as a source of protein (AA) were infected with 10^7 *L. infantum* promastigotes after weaning. Mice that received an AA diet showed increased susceptibility to infection, with changes in the inflammatory profile, decreased T cells, macrophages and cell proliferation. These data together show that diet is an important factor that influences the function and development of the immune system in the face of infections.

Key words:
Diet, Leishmaniasis, Metabolic disorders, obesity, infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da leishmaniose visceral nos hospedeiros vertebrados e fêmeas de insetos vetores infectadas.....29

Figura 2. Desenho experimental da dieta indutora de obesidade e leishmaniose visceral murina.....39

Figura 3. Desenho experimental da dieta à base de aminoácidos e leishmaniose visceral murina.....40

Figura 4. Estratégia de gates para análise de receptores inibitórios em linfócitos T.....45

Figura 5. Estratégia de *gates* para análise de receptores em células T.....46

Figura 6. Estratégia de *gates* para análise de receptores em macrófagos.....47

Figura 7. Ganho de massa corporal cumulativo.....56

Figura 8. (A) Massa do tecido adiposo gonadal após administração das dietas CTRL ou HSB em camundongos por 14 semanas. (B) Índice de adiposidade de camundongos alimentados por 14 semanas com dietas CTRL e HSB, calculado a partir da divisão da massa do tecido adiposo gonadal pela massa corporal de cada camundongo ao final do experimento.....57

Figura 9. Fotomicrografias de tecido adiposo gonadal de camundongos alimentados por 14 semanas com dietas CTRL (A) e HSB (B).....57

Figura 10. Área do adipócito.....58

Figura 11. Efeito da obesidade induzida pela dieta no controle da infecção por *L. Infantum*.....*58*

Figura 12. Efeito da obesidade induzida por dieta na produção de citocinas pelo tecido adiposo gonadal.....59

Figura 13. Efeito da obesidade induzida por dieta na produção de citocinas em tecidos infectados com Leishmania.....60

Figura 14. Inflamação tecidual em camundongos obesos infectados. 61

Figura 15. Receptores de células T em axaustão e senescente.....67

Figura 16. Análise ex vivo da frequência de expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L.infantum*.....70

Figura 17. Análise das populações de células T de memória.....72

Figura 18. Análise de receptores inibitórios em células T de memória.....73

Figura 19. Estratégia de gates para análise de apoptose celular.....74

Figura 20. Avaliação de apoptose inicial e tardia em esplenócitos.....75

Figura 21. Susceptibilidade a *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos (AA).....84

Figura 22. Efeito da dieta dieta à base de aminoácidos (AA) e infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ*.....*85*

Figura 23. Análise ex vivo da frequência de linfócitos T e macrófagos durante a infecção por *L.infantum*.....*87*

Figura 24. Efeito da infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos (AA) na resposta linfoproliferativa.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta AIN-93G formulada para roedores adultos e a dieta HSB* com alto teor de açúcar e manteiga.....38

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais que receberam a dieta controle AIN-93G formulada para roedores adultos e a dieta indutora de obesidade HSB com alto teor de açúcar e manteiga.....38

Tabela 3. Distribuição dos grupos experimentais que receberam a dieta controle AIN- 93G formulada para roedores adultos e a dieta com aminoácidos como fonte de proteínas AA.....39

Tabela 4. Painéis de anticorpos – Receptores inibitórios em linfócitos T *ex vivo*..... 44

Tabela 5. Painéis de anticorpos – Células T de memória.....45

Tabela 6. Painéis de anticorpos – Células T e macrófagos.....46

Tabela 7. Painéis de anticorpos – Viabilidade celular.....48

Tabela 8. Parâmetros fisiológicos de camundongos alimentados com dietas CTRL e HSB.....56

Tabela 9. Parâmetros fisiológicos de camundongos alimentados com dietas CTRL e AA.....83

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AA – Dieta à base de aminoácidos

AIN93G - Dieta controle

APC – Células apresentadoras de antígenos

B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CCL2 – Ligante 2 de quimiocina (motivo CC) (chemokine (C-C motif) ligand 2)

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CD - Cluster de diferenciação

CD28 – Receptor co-estimulador de células T

CD44 – Glicoproteína de membrana que liga à ácido hialurônico e medeia a adesão de leucócitos

CD45RB – Proteína tirosina fosfatase receptor tipo C subtipo RB

CD62L – Molécula de adesão celular L-selectina

CD95 – Antígeno de apoptose 1

CDs – Células dendríticas

Células NK – Células natural killers

Células NKT – Células natural killers T

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CM: Memória central

cm2 – Centímetro quadrado

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

CMV – Citomegalovírus

CO_2 - Dióxido de carbono

CR – Receptor de complemento

CTLA4 – Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

CXCL1 – Citocina pertencente à família CXC

DDR: Resposta de dano ao DNA

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM: Memória efetora

EMRA: Memória efetora altamente diferenciada

ERK – Extracellular signal–regulated kinases / Quinases reguladas por sinal

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

FSC-A - Foward Scatter

GP63 – Glicoproteína de 63 kDa

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

H_2O_2- Peróxido de hidrogênio

HBV: Vírus da Hepatite B

HCV: Vírus da Hepatite C

HEPES - Ácido N–2 hidroxietilpiperazina–N'–2 etanosulfônico

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida

HSB – *High sugar and butter* - dieta experimental indutora de obesidade

IFN-γ – Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IMC - Índice de Massa Corporal

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

KLRG-1: Killer-cell Lectin like Receptor G1

L. - Leishmania

LC – Leishmaniose cutânea

LC: Leishmaniose Cutânea

LDA – Analise de diluição limitante

LiAg – Antígenos brutos de Leishmania infantum

LMC - Leishmaniose Mucocutânea;

LPG – Lipofosfoglicanos

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana;

LV – Leishmaniose visceral

LVH - Leishmaniose visceral humana

MAPK p38: Mitogen Ativated Protein Kinase p38

MC – Memória central

MCP-1 – Proteína 1 quimiotática de monócitos (monocyte chemoattractant protein 1)

ME – Memória efetora

mg – Miligrama

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MS - Ministério da Saúde

NK - Células *natural killer*

NKG2D – NKG2-D type II integral membrane protein / Proteína de membrana

integral NKG2-D

NO - Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAI-1- inibidor do ativador de plasminogênio

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC: Célula mononuclear do sangue periférico

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PD1 – Programmed cell death protein 1 / Proteina de morte cellular 1

PPG – Proteofosfoglicanos

PRRs – Receptor de reconhecimento padrão

SFB – Soro fetal bovino

SFM – Sistema mononuclear fagocitário

SSC – Side Scatter

T CD4+ - Linfócito T auxiliar

T CD8+ - Linfócito T citolítico

TGF - Fator de crescimento e transformação

Th - Célula T auxiliar

Th0 – T helper tipo 0

Th1 – T helper tipo 1

Th2 – T helper tipo 2

TLRs - Receptores tipo Toll

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócito T regulador

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde

μg – Microgramas

μL – Microlitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA 26

1.1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE E LEISHMANIOSE VISCERAL 26

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL 27

1.3. ETIOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL 28

1.4. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE 29

2. JUSTIFICATIVA 34

3. OBJETIVOS 35

3.1. OBJETIVO GERAL 35

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35

3.2.1. DIETA INDUTORA DE OBESIDADE 35

3.2.2. DIETA DE AMINOÁCIDOS COMO FONTE PROTÉICA 35

4. MATERIAL E MÉTODOS 37

4.1. ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS 37

4.2. CULTIVO DE *L. INFANTUM* 37

4.3. DIETAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS 37

4.4. DETERMINAÇÃO DO MASSA CORPORAL MÉDIA 39

4.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL 39

4.6. ADIPOSIDADE VISCERAL 40

4.7. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E FÍGADO 41

4.8. ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA 41

4.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS 42

4.10. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO 42

4.11. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA 43

4.12. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO 43

4.13. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS T 47

4.14. DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE 48

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA 48

5. CAPÍTULO 1 50

5.1. OBESIDADE E O IMPACTO NO METABOLISMO E RESPOSTA IMUNE 50
5.2. ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO 51
5.3. RESULTADOS 55
5.3.1 A ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM DIETA HIPERCALÓRICA INDUZ ALTERAÇÕES SISTÊMICAS..... 55
5.3.2. A ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM DIETA HIPERCALÓRICA OS TORNA MAIS MAIS SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO COM Leishmania infantum 58
5.3.3. CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EXIBEM MAIOR INFLAMAÇÃO E DANOS NOS TECIDOS DURANTE A INFECÇÃO POR L. infantum 59
5.3.4. PROCESSO INFLAMATÓRIO EM BAÇO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA APÓS INFECÇÃO 61
5.4. DISCUSSÃO 62
5.5. CONCLUSÃO 64
6. CAPÍTULO 2 65
6.1 OBESIDADE E A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PATÓGENOS 65
6.2. RESULTADOS 70
6.2.1. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL NÃO ALTERAM A FREQUÊNCIA DE RECEPTORES INIBITÓRIOS EM CÉLULAS T 70
6.2.2. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL DIMINUEM A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T CD4$^+$ DE MEMÓRIA EFETORA..... 71
6.2.3. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL DIMINUEM A FREQUÊNCIA DE KLRG1 EM CÉLULAS T CD4$^+$ E PD-1 EM CÉLULAS T CD8$^+$ DE MEMÓRIA CENTRAL 72
6.2.4. OBESIDADE E INFECÇÃO NÃO MODULAM APOPTOSE DE LINFÓCITOS . 74
6.3. DISCUSSÃO 75
6.4. CONCLUSÃO 78
7. CAPÍTULO 3 79
7.1. RESULTADOS 82
7.1.1. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA SÃO SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO POR

L. infantum *82*

7.1.2. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM ALTERAÇÕES NO PERFIL INFLAMATÓRIO APÓS INFECÇÃO POR L. infantum *84*

7.1.3. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM MENOR FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T E MACRÓFAGOS APÓS INFECÇÃO POR L. infantum *86*

7.1.4. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM MENOR RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA APÓS INFECÇÃO POR L. infantum *87*

7.2. DISCUSSÃO 88

7.3. CONCLUSÃO 91

8. REFERÊNCIAS 92

ANEXO 1 103

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE E LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmaniose é um termo utilizado genericamente para definir um complexo de doenças clinicamente diferentes, que tem como agente etiológico da infecção, várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos pertencentes ao reino Protista, à ordem Kinetoplastida, à família *Tripanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. Todas as espécies são parasitas intracelulares obrigatórios, infectando preferencialmente células do sistema fagocitário mononuclerar de hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre eles, roedores, canídeo, marsupiais, primatas e o homem. A doença pode então ser classificada como antroponótico ou zoonótico, se o reservatório natural do parasita é humano ou animal, respectivamente (ALENCAR *et al*., 1991, WHO, 2017).

Parâmetros como a espécie e a genética do parasito em associação com o estado imunológico e nutricional do hospedeiro vão determinar o desenvolvimento das variações clínicas da doença. Dessa forma, a doença pode ser classificada em dois grandes grupos: (1) A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que ainda pode ser subdividida nas formas cutânea simples (LC) e cutânea disseminada, cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LM); e (2) A Leishmaniose Visceral (LV) também conhecido como kala-azar ou calazar (GRIMALDI; TESH, 1993; CARVALHO *et al.*, 1985, CHAPPUIS, F. *et al*., 2007; WHO, 2017).

A Leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença é causada por parasitas que pertencem ao complexo *Leishmania donovani*, sendo as espécies *L. infantum* e *L. donovani* responsáveis pela doença no Velho Mundo e *L. infantum chagasi* no Novo Mundo. Esses protozoários possuem um forte tropismo para invadir as vísceras, onde se localizam de preferência no baço e fígado, além da medula óssea e órgãos linfoides. As manifestações clínicas podem ir de discretas 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 nos pacientes com a forma ativa da doença, que apresentam imunossupressão. Mais de 90% dos casos não tratados evoluem então para óbito, principalmente em países em desenvolvimento (CARNEIRO *et al*., 2013; WHO, 2017).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

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 parasita (LETA *et al*., 2014; CECÍLIO *et al*., 2014). A doença afeta pessoas que vivem nas regiões mais pobres do planeta e por isso os principais fatores responsáveis pela alta incidência dessa doença são o nível socioeconômico da população, a falta de acessibilidade ao tratamento e às medidas de prevenção, a migração de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e a transmissão por vetores devida a condições ambientais favoráveis encontradas nesses locais para a proliferação dos insetos (KHADEM; UZONNA, 2014; WHO, 2017).

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 (LETA *et al*., 2014; WHO, 2017).

Na América Latina, dos 12 países que compõem essa região do continente americano, o Brasil é o país mais afetado pela leishmaniose com 96% dos casos LV. Nos últimos 20 anos observamos a mudança do padrão epidemiológico das leishmanioses. A doença era importante apenas em áreas rurais, porém esta se espalhou para as áreas urbanas acompanhando a migração da população para os subúrbios periféricos das grandes cidades, criando assentamentos densamente povoados (OPAS, 2017; WHO, 2017).

No Brasil, 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 as 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 Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (SILVA *et al.,* 2001; BRASIL, 2014).

A doença é frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. 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 e ao principal reservatório animal

para a infecção, os cães no peridomícilio (SILVA *et al.*, 2001; BRASIL, 2014).

No Estado do Espírito Santo, durante o período de 2007 a 2015, o estado apresentou um total de 46 casos de LV, e cinco destes evoluíram à óbito. Os municípios mais atingidos são Baixo Guandu, Pancas e Cariacica, este último pertencente à região metropolitana de Vitória (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

1.3. ETIOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

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 (FERRO *et al*., 1995).

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. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (FERRO *et al.*, 1995; ROGERS; TITUS, 2003).

As fêmeas de insetos vetores infectadas, ao realizar o repasto sanguíneo, injetam intradermicamente, junto com sua saliva, formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (Figura 1) (ROGERS *et al*., 2002). A transmissão é facilitada através da inoculação de moléculas na saliva dos insetos com efeitos anticoagulantes, vasodilatadores e anti-inflamatórios, como o maxadilan, a hialuronidase e a apirase (LERNER; SHOEMAKER, 1992; RIBEIRO, 1995; BASANOVA *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2000), além de moléculas derivadas do próprio parasita, como filamentos proteofosfoglicanos (fPPG) (ROGERS *et al*., 2004). Como resultado da inoculação dessas moléculas, temos uma diminuição da exposição dos parasitas ao sistema imune recém infectado, um aumento no número de macrófagos para o local da inoculação graças à quimiotaxia, acelerando a fagocitose das promastigotas (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 parasitas 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, como pode ser observado na figura abaixo (ROGERS *et al*., 2002).

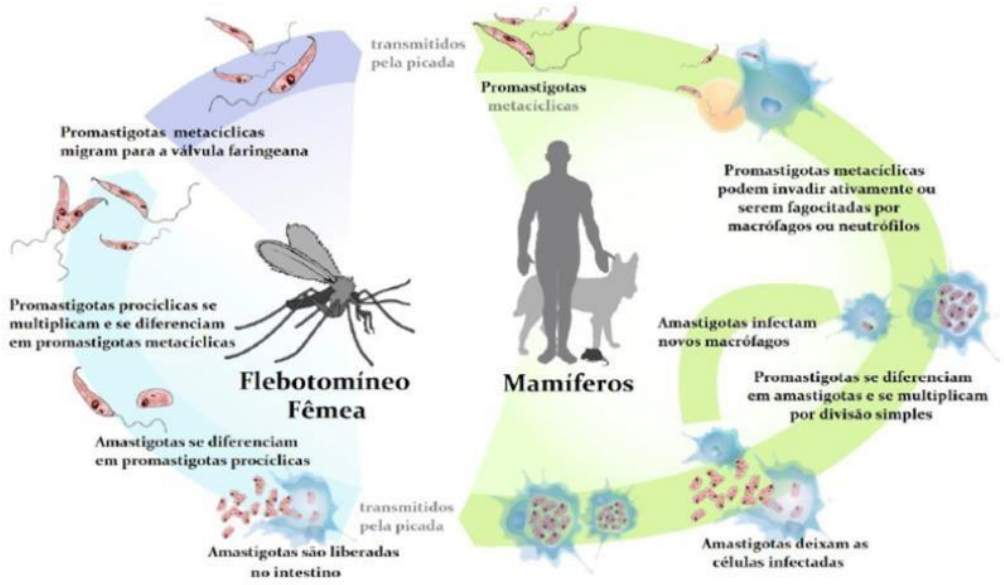

Figura 1. Ciclo de vida da leishmaniose visceral nos hospedeiros vertebrados e fêmeas de insetos vetores infectadas. Adaptado de Harhay e colaboradores, 2011.

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 expelidas juntos com a saliva (ROGERS *et al*., 2002).

1.4. ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE

Para um melhor entendimento de infecções humanas e mecanismos imunológicos e/ou genéticos de resistência frente a parasitas intracelulares como Leishmania, têm sido utilizados modelos de infeções experimentais com diferentes linhagens de camundongos. Dessa forma é possível mimetizar a infeção humana e a partir daí podem ser realizados estudos de novos medicamentos e medidas profiláticas, como vacinas (KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006; NATALE; SEIXAS; ALMEIDA, 2016).

Evidencia-se a importância dos fatores genéticos do hospedeiro como um dos determinantes da leishmaniose, seja em relação à resolução ou piora do quadro

(SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009). Entre os modelos mais utilizados para o estudo da infecção por *Leishmania*, destacam-se aqueles que empregam a infecção por *L. major*. Quando camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c são infectados com *L. major*, estes apresentam doença progressiva e visceralizante. Entretanto, camundongos das linhagens C57BL/6, C3H/HeJ e CBA são capazes de controlar a infecção por *L. major*. O perfil de resistência à infeção por *L. major* está associado ao desenvolvimento de uma resposta tipo Th1 (linfócito T auxiliar tipo I), enquanto o padrão de susceptibilidade é decorrente de uma resposta Th2 (SCHARTON; SCOTT, 1993).

A susceptibilidade observada em camundongos BALB/c infectados *L. major*, se caracteriza por uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-13 e IL-10, características da resposta imunológica celular de perfil Th2. Tais citocinas agem inibindo a produção de IFN-ɣ e de óxido nítrico (NO), além de promover a ativação alternativa de macrófagos, que desviam o metabolismo da L-arginina para produção de poliaminas e ureia, favorecendo crescimento do parasito dentro desta célula. Para a resistência à infecção por *L. major,* camundongos C57BL/6, por exemplo, apresentam uma polarização de resposta celular de perfil Th1 com alta produção de IFN-γ e NO, sendo este último responsável pela morte dos parasitos (GORDON; MARTINEZ, 2010; L SACKS; V. PERKINS, 1984).

O processo de polarização da resposta das células T auxiliares em subtipos Th1 e Th2 descrito acima ocorre no modelo clássico de infecção cutânea em camundongos, causada por *L. major*.

Na LV não se observa diferenças associadas à expansão preferencial de células Th1 ou Th2, havendo então uma resposta mista que não caracteriza um perfil de resistência ou susceptibilidade à infecção (ANTONELLI et al., 2004; KHALIL et al., 2005). 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, as principais células efetoras da resposta à LV, 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) e GP63, uma leishmanolisina metaloprotease, são encontrados na superfície do patógeno e são os principais fatores de virulência envolvidos nas estratégias de evasão imunológica, auxiliando nos mecanismos de escape, internalização e resistência da Leishmania. Estes receptores podem

variar entre espécies de Leishmania, linhagem e estágio do ciclo de vida (KAYE; SCOTT, 2011; YAO *et al*., 2003; NADERER; MCCONVILLE, 2008).

Componentes do patógeno podem ser reconhecidos também por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os vários receptores tipo Toll (TLRs), como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 (FLANDIN *et al*., 2006; MAJUMDER *et al*., 2014; PAUN *et al.*, 2011). Este reconhecimento leva à ativação das vias de sinalização intracelular que são necessárias para o início de respostas inflamatórias e controle da proliferação parasitária pela resposta imunológica inata. São também importantes pois proporcionam a maturação e o tropismo 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 e monócitos 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 dessas células fagocíticas (NOVAIS *et al.*, 2009; RIBEIRO-GOMES *et al*., 2004; SCOTT; NOVAIS, 2016).

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

Estudos experimentais em camundongos sugerem que o controle de LV pode estar associado ao desenvolvimento de respostas imunes parasita-específicas, mediadas por células T $CD4^+$ e $TCD8^+$. Essas células produzem IFN-γ, que ativa os macrófagos infectados, levando à

produção de NO e outros radicais livres que matam os parasitas. O desenvolvimento de um perfil Th1 e Th17, após a apresentação de antígenos à célula T virgem, está correlacionado com a resolução da infecção e uma resposta Th2 contribui para a susceptibilidade e a progressão da doença. É pensada que a supressão da resposta das células T esteja envolvida na patogênese da LV. A supressão imune mediada por células T reguladoras (Treg) é relatada em modelos animais de infecção por *Leishmania*. Os camundongos com bloqueio do receptor de IL-10 foram resistentes à infecção por *L. donovani*, por exemplo. Em seres humanos, as células Treg produzirem altos níveis de IL-10 indicando supressão imune em pacientes com LVH. Este mecanismo parece ser útil para se determinar o prognóstico da doença, principalmente frente ao tratamento (GOTO; PRIANTI, 2009; REINER; LOCKSLEY, 1993; SACRAMENTO *et al.*, 2014; RAI *et al*., 2012).

O IFN-γ é a citocina mais importante para o controle da leishmaniose e é a principal citocina produzida pelos linfócitos T auxiliares 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 subpopulação 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).

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 parasita. 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).

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.*, 2011). 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).

2. JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses são consideradas um importante problema de saúde pública. Anualmente, no Brasil os gastos com diagnóstico, tratamento e campanhas de conscientização e divulgação são superiores a 75 milhões de reais. Só no ano de 2015 foram registrado mais de 19 mil novos casos no Brasil.

É sabido que a obesidade é caracterizada por uma condição inflamatória crônica e sistêmica que afeta diretamente a função imune inata e adaptativa, reduzindo a capacidade das células fagocíticas, diminuindo a frequência de células T regulatórias e desregulando a produção de citocinas. Os indivíduos com excesso de peso parecem apresentar maior dificuldade em controlar certas doenças, e os mecanismos envolvidos nesses processos continuam carecendo de mais estudos. Além disso, não podemos deixar de salientar o importante crescimento da obesidade no contexto atual. Hoje um a cada cinco brasileiros é obeso, e a metade da população possui sobrepeso.

Até o presente momento, pouco se conhece sobre os efeitos da obesidade na evolução das leishmanioses. Estas são consideradas um importante problema de saúde pública. Anualmente, no Brasil os gastos com diagnóstico, tratamento e campanhas de conscientização e divulgação são superiores a 75 milhões de reais. Só no ano de 2015 foram registrado mais de 19 mil novos casos no Brasil.

Nos propusemos ainda avaliar a possível influência de um ambiente altamente inflamado, obtido de nossos experimentos anteriores, como preditor da mudança de fenótipo de celulas T. Para isso, avaliamos características fenotípicas associadas a exaustão celular.

Além disso, condições alimentares diferentes podem impactar na susceptibilidade à leishmaniose visceral, portanto avaliamos o papel de uma dieta contendo aminoácidos como fonte de proteínas na capacidade de resposta a infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os impactos da nutrição na capacidade da resposta imunológica de camundongos C57BL/6 através da administração de dieta indutora de obesidade e dieta à base de aminoácidos durante a infecção por *Leishmania infantum.*

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. DIETA INDUTORA DE OBESIDADE

- Induzir obesidade pela administração de dieta experimental hipercalórica rica em carboidratos simples e gordura saturada (HSB) nos animais tratados.
- Induzir o modelo murino de leishmaniose visceral através da inoculação de *L. infantum.*
- Avaliar os efeitos da obesidade sobre a capacidade de resposta à infecção com *L. infantum chagasi,* pela quantificação da carga parasitária em baço e fígado dos animais tratados.
- Avaliar a produção de citocinas (IFN-ɣ, TNF-α, TGF-β, IL-6, IL-4 e IL-10) e óxido nítrico nos sobrenadantes de baço, fígado e tecido adiposo dos animais tratados.
- Avaliar a produção de leptina no soro dos animais tratados.
- Avaliar os aspectos histopatológicos do tecido adiposo, baço e fígado dos animais.
- Caracterização fenotípica de linfócitos T através da:
  - Imunofenotipagem de receptores inibitórios (KLRG1 e PD-1) em células T do baço;
  - Imunofenotipagem de células T de memória do baço;
  - Quantificação das frequências de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ produtoras de citocinas (IFN-ɣ) no baço dos animais tratados.
  - Avaliação da Apoptose em células T no baço dos animais tratados.

3.2.2. DIETA DE AMINOÁCIDOS COMO FONTE PROTÉICA

- Estabelecer o protocolo da dieta...
- Avaliar os efeitos da dieta de aminoácidos sobre a capacidade de resposta à infecção com *L. infantum,* pela quantificação da carga parasitária em baço e fígado dos animais tratados.
- Avaliar a produção de citocinas (IFN-ɣ, IL-4 e IL-10) e óxido nítrico nos sobrenadantes de baço e fígado dos animais tratados.

- Avaliar as frequências de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ no baço;
- Avaliar as frequências de macrófagos através da imunofenotipagem de células $F4/80^+$ $CD11b^+$ que expressam a molécula co-estimulatória CD86 no baço;
- Avaliar da capacidade proliferativa de células do baço de animais tratados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS E ANIMAIS

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 os registros nº 014/2011 e nº 02/2017.

Os animais, camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com idade entre 6 a 8 semanas foram originalmente adquiridos noJackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Eles foram acondicionados em gaiolas convencionais com maravalha previamente esterilizada, recebendo água filtrada e a dieta determinada peletizada *ad libitum*. Cada experimento foi realizado com 5 a 8 animais por grupo, distribuídos aleatoriamente. Durante todo o experimento as gaiolas dos animais ficaram em estufas sob condições apropriadas de temperatura (28°C), umidade e luz.

4.2. CULTIVO DE *L. infantum*

A cepa de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1975/PP75) usada para realizar a infecção dos animais foi gentilmente cedida pela Professora Elenice M. Lemos (*in memoriam*), do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI-UFES). Os parasitos foram cultivados em *Grace's Insect Medium* – Grace's (Sigma-Aldrich®) com pH 6,8, suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino – SFB – (Cultilab, Campinas, Brasil) inativado a 56ºC por 30 minutos, 2mM L-glutamina (Gibco, USA), 25mM HEPES (Sigma-Aldrich®) e 20µg/mL gentamicina (Sigma-Aldrich®). As culturas eram mantidas até o final da fase logarítmica de crescimento em estufa refrigerada B.O.D. a 24ºC e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Para manter a infectividade, esporadicamente, camundongos BALB/c eram inoculados com a cepa e eutanasiados com administração de solução anestésica por via intraperitoneal (240 mg/kg quetamina e 45 mg/kg cloridrato de xilazina, Cetamin® and Xilazin®, Syntec, Brazil) para isolamento do protozoário em cultura de células do baço e fígado.

4.3. DIETAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

A composição da dieta indutora de obesidade foi desenvolvida e descrita por Maioli e

colaboradores (2016). A distribuição de macro e micronutrientes, assim como a densidade calórica (Kcal/g) provenientes da dieta controle (AIN93G) e experimental (HSB) foram obtidos através da análise bromatológica, realizada no Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Minas Gerais e podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta AIN- 93G formulada para roedores adultos e a dieta HSB* com alto teor de açúcar e manteiga.

Composição centesimal (%)	Dieta Controle (AIN93G)	Dieta Experimental (HSB)
Carboidrato	64	36
Lipídio	16	48
Proteína	20	16
Energia (Kcal/g)	3,9	4,9

*HSB – high sugar and butter.

Os camundongos foram divididos em 2 ou 4 grupos descritos abaixo, compostos por 5 a 8 animais cada.

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais que receberam a dieta controle AIN-93G formulada para roedores adultos e a dieta indutora de obesidade HSB com alto teor de açúcar e manteiga.

GRUPOS	CONDIÇÕES
CTRL	Dieta Controle (AIN93G)
CTRL-I	Dieta Controle (AIN93G) infectado com *L. infantum*
HSB	Dieta Experimental (HSB)
HSB-I	Dieta Experimental (HSB) infectado com *L. infantum*

Os camundongos foram alimentados com dietas experimentais contendo 15% de caseína (CTRL) ou quantidades equivalentes de aminoácidos (AA) desde o desmame (3 semanas de idade) até a idade adulta (8 semanas de idade). As dietas (Rhoster Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) eram isocalóricas e idênticas em termos de todos os outros nutrientes, de acordo com o Instituto Americano de Nutrição - AIN-93G (PHILIP G. REEVES, FORREST H. NIELSEN, GEORGE C. FAHEY, 1993).

Os camundongos foram divididos em 4 grupos, como descrito abaixo, compostos por 5 a 8 animais cada.

Tabela 3. Distribuição dos grupos experimentais que receberam a dieta controle AIN- 93G formulada para roedores adultos e a dieta com aminoácidos como fonte de proteínas AA.

GRUPOS	CONDIÇÕES
CTRL	Dieta Controle (AIN93G)
CTRL-I	Dieta Controle (AIN93G) infectado com *L. Infantum*
AA	Dieta Experimental de Aminoácidos (AA)
AA-I	Dieta Experimental de Aminoácidos (AA) infectado com *L. infantum*

4.4. DETERMINAÇÃO DO MASSA CORPORAL MÉDIA

Os animais foram pesados semanalmente e o consumo das dietas foi monitorado durante todo o experimento. As avaliações eram realizadas a cada 7 dias, num mesmo horário, em balança semi-analítica (Bel Engineering) com capacidade para 200 gramas e variação de 0,001 grama.

4.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Para a dieta indutora de obesidade, oito a dez semanas após o início das dietas, e com a obesidade estabelecida no grupo experimental, os animais foram infectados ou não com *L. infantum* e eutanasiados quatro semanas (28 dias) após a infecção, momento no qual observa-se o pico do parasitismo, conforme estabelecido em nosso laboratório após experimentação.

O desenho experimental pode ser observado na figura abaixo.

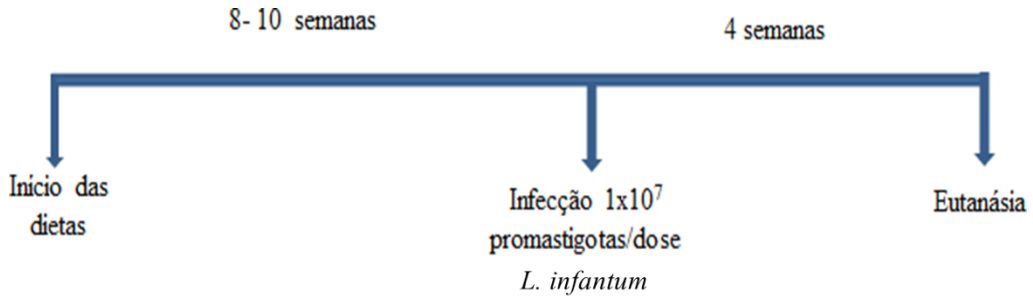

Figura 2. Desenho experimental da dieta indutora de obesidade e leishmaniose visceral murina. Camundongos C57BL / 6 fêmeas (n = 5-8/ grupo/ experiemento) foram alimentados por 12 -14 semanas com dieta controle (CTRL) ou dieta com alto teor de açúcar e gordura (HSB). A infecção com 10^7 promastigotas de *L. infantum* se deu com o estabelecimento da obesidade e a eutanásia ocorreu 28 dias após a infecção.

Os animais incluídos nos experimentos com a dieta de aminoácidos como fonte de proteína receberam as dietas desde o desmame (3 semanas de idade) até a idade adulta (8 semanas de idade), quando os grupos pertinentes foram inoculados por veia caudal com *L. infantum*. Os grupos foram alimentados até o pico do parasitismo, que se deu na quarta semana após a infecção.

O desenho experimental pode ser observado na figura abaixo.

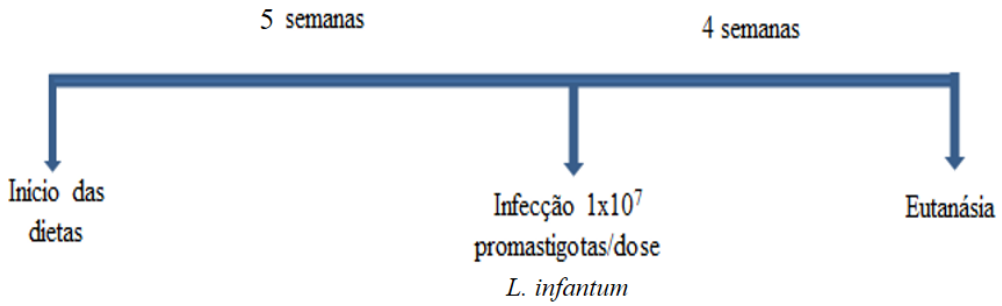

Figura 3. Desenho experimental da dieta à base de aminoácidos e leishmaniose visceral murina. Camundongos C57BL / 6 fêmeas foram alimentados por 9 semanas com dieta controle (AIN93G) ou dieta de aminoácidos (AA). A inoculação por via endovenosa (veia caudal) com 10^7 promastigotas de *L. infantum* se deu após os animais atingirem a idade adulta (8 semanas de vida) e a eutanásia ocorreu após 28 dias após a infecção

Para a infecção *in vivo*, formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em meio Grace's (Sigma-Aldrich®) com pH 6,8, suplementado como descrito no item 4.2. Ao atingir a fase estacionária de crescimento, a cultura foi centrifugada a 1600 G, 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 $1x10^7$ parasitos/dose a ser inoculada em cada animal por via endovenosa (veia caudal).

4.6. ADIPOSIDADE VISCERAL

Todos os animais foram pesados um dia antes do final do experimento. Nos animais submentidos aos experiementos com dieta indutora de obesidade, após a eutanásia, o tecido adiposo visceral foi removido de cada animal e pesado em balança analítica. O índice de adiposidade visceral foi determinado pela fórmula:

Adiposidade = (Massa do tecido adiposo visceral removido) / Massa total do animal

4.7. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO BAÇO E FÍGADO

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

Os órgãos foram removidos em condições assépticas, e individualmente, transferidos para tubos cônicos de polipropileno 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% (v/v) de SFB, 25mM HEPES (Sigma-Aldrich®), 5 mL/L de penicilina/estreptomicina (Sigma- Aldrich® - 10.000 UI penicilina + 10 mg/mL estreptomicina) e 3,7 mg/mL de bicarbonato de sódio -$NaHCO_3$- (Vetec). Isso gerou uma suspensão que foi submetida à centrifugação a 1600 G, 4ºC por 10 minutos em um tubo cônico. O sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior uso na dosagem de citocinas e NO.

4.8. ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA

A carga parasitária dos animais infectados por *L. infantum* foi avaliada através da técnica de diluição limitante (BUFFET *et al*., 1995; DE OLIVEIRA GOMES *et al*., 2012) em fragmentos do fígado e baço extraídos dos animais vinte e oito dias após a inoculação dos parasitos.

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 poro 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 (BRAND plates). Os demais poços foram preenchidos com 160 µL de Grace's e seguiu-se com a diluição seriada 1:5 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 parasitas foi determinado em cada órgão tomando como referência a última diluição em que se verificou o crescimento do parasita.

4.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Ensaios imunoenzimáticos de captura (ELISA) foram utilizados para mensurar a concentração de TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL10, TGF-β e IL-4 presente em sobrenadantes ex *vivo* de esplenócitos, hepatócitos e adipócitos. A dosagem foi realizada utilizando o sistema comercial eBioscience® com pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilado 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% (v/v) 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 biotinilado 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% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% (v/v) e solução tampão citrato fosfato com 0,5% (g/L) ABTS (Sigma-Aldrich®). Interrompeu-se a reação com adição de 1% (g/L) dodecil sulfato de sódio – SDS - (Gibco®) e prosseguiu-se com a leitura da densidade óptica por espectrofotometria (Thermo Scientific Varioskan® Flash) com a absorbância determinada sob o comprimento de onda de 450 nm.

4.10. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada indiretamente através da dosagem de nitrito presente nos sobrenadantes *ex vivo* de esplenócitos e hepatócitos dos camundongos pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

Para esta análise, 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 2,5ml de ácido orto-fosfórico (H_3PO_4), 1ml de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) e 0,1ml de α-Naftiletilenoaminohidrocloro (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. A concentração de nitrito foi determinada por espectrofotometria (Thermo Scientific Varioskan® Flash) com a absorbância determinada sob o comprimento de onda de 540nm, utilizando curva padrão com nitrato de sódio iniciada com a concentração de 50 µM.

4.11. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Amostras com 3–5 mm de tecido adiposo gonadal, baço e fígado, foram individualmente fixadas em paraformaldeído (Sigma-Aldrich) por 24h e posteriormente embebidas em parafina (TBS, USA). Secções histológicas de 5µm de espessura foram obtidas, com auxílio de um micrótomo, colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina, contrastada com eosina (TBS, USA). As secções foram analisadas com aumento de 100X ou 400X, conforme indicado nas figuras. As imagens formam obtidas com câmera digital DV-130 (Hawking Technology, USA). O diâmetro e a área dos adipócitos foram calculados usando o programa de imagem LissView (Hawking Technology, USA).

4.12. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a imunofenotipagem de macrófagos, linfócitos T e avaliação da produção citocinas intracelulares, 200µL de suspensão de esplenócitos ($5x10^6$ células / ml) foram centrifugadas a 400 G por 5 min e o sobrenadante descartado. Para as marcações extracelulares, as células foram ressuspesas em 25 µL de solução tampão FACS (FACS Buffer - 0,5 % v/v BSA - albumina do soro bovino - e 0,05 % g/L azida sódica - NaN3 em PBS) contendo os anticorpos monoclonais de interesse (Conforme descritos nas tabelas X e Xx) na proporção de 1:50 (v/v) e incubados a 4ºC por 30 minutos no escuro, seguidos de fixação com 200 µL de paraformaldeído 1% (v/v em PBS) para os que não necessitavam de marcação intracelular.

Para a análise da produção de citocinas (, era adicionada às células previamente marcadas para receptores extracelulares 100µL de solução de fixação e permeabilização (FIX & PERM® Cell Fixation & Cell Permeabilization Kit - Thermo Fisher Scientific). Essas permaneciam incubadas à 4ºC por 30 minutos no escuro e em seguida foram lavadas com 100µL de solução tampão de permeabilização e lavagem (FIX & PERM™ Cell Permeabilization). Após permeabilização as células foram centrifugadas a 400 G por 5 minutos e ressuspensas em uma mistura de anticorpos de interesse, conforme descrito na tabela x), cuja concentração preconizada foi 1:50 (v/v), sendo então acondicionadas em temperatura ambiente, no escuro por 30 minutos para a marcação. A suspensão de células então foi submetida à lavagem com solução tampão FACS e centrifugada a 400 G por 5 minutos e acondicionadas em tubos de citometria para aquisição em citômetro de fluxo (Attune® Thermo Fisher Scientific).

Foram adquiridas 100.000 ou 200.000 células por painel e a análise foi feita no programa FlowJo® (versão 7.6.5, TreeeStar, Ashland, OR, USA). Para auxiliar a determinação das

populações positivas para os marcadores de interesse foi utilizado o método de *Fluorescence minus one* (F.M.O.), que consiste na omissão de um marcador de interesse no mix de anticorpos. Conforme descrito nas tabelas abaixo). Essa técnica permite a identificação da positividade para os marcadores específicos e auxilia na distinção de células auto-fluorescentes e que expressam baixa frequência do marcador de interesse.

- AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS EM LINFÓCITOS T *EX VIVO*

Para a imunofenotipagem dos receptores extracelulares, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com os seguintes fluorocromos.

Tabela 4. Painéis de anticorpos – Receptores inibitórios em linfócitos T *ex vivo*

PAINEL	**FLUOROCROMO**				
	FITC	**PE**	**PeCy7**	**Alexa Flour 700**	**APC-H7**
Ex vivo					
Amostra	CD4	KLRG1	2B4	CD8	PD-1
F.M.O. KLRG.1	CD4	–	2B4	CD8	PD-1
F.M.O. PD-1	CD4	KLRG1	2B4	CD8	–

A figura 4 ilustra o processo de análise dos receptores inibitórios em linfócitos T totais de acordo com os parâmetros acima citados.

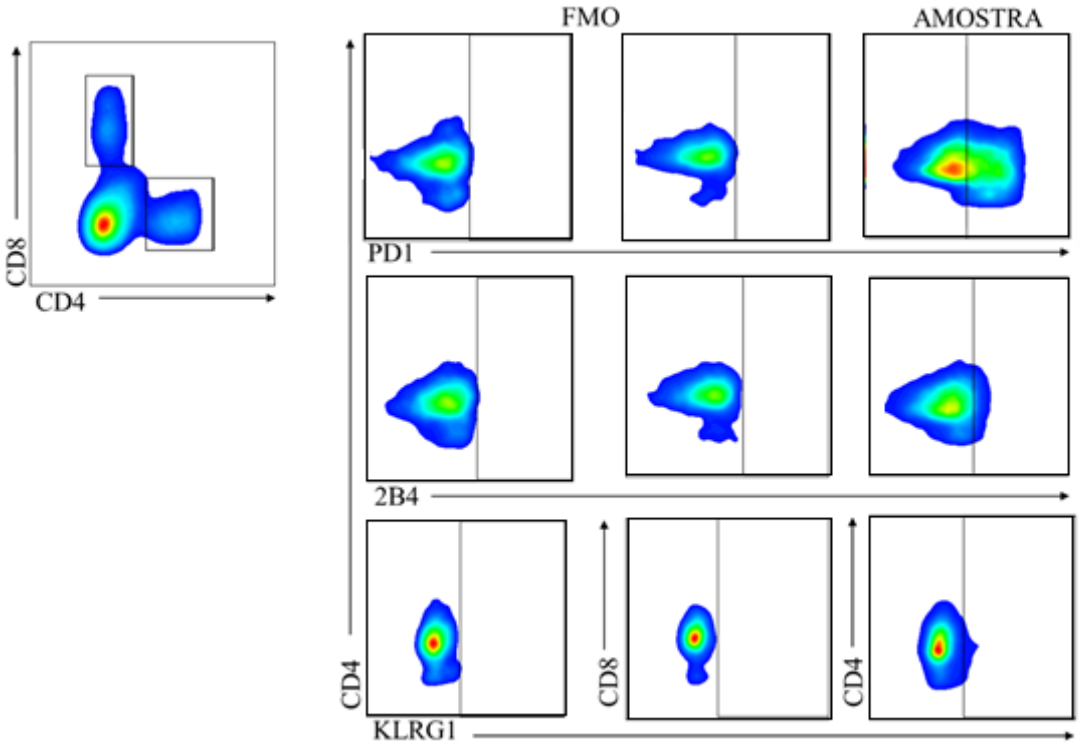

Figura 4. Estratégia de gates para análise de receptores inibitórios em linfócitos T. Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva e CD8 positiva (A) foram selecionadas. Em seguida, foi realizado a análise para a expressão dos receptores KLRG1 e PD1 (B).

- AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA

Para a imunofenotipagem das células T de memória, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com os seguintes fluorocromos.

Tabela 5. Painéis de anticorpos – Células T de memória.

	FLUOROCROMO						
PAINEL	**FITC**	**PE**	**PeCy5**	**PeCy7**	**APC**	**Alexa Flour 700**	**APC-H7**
Memória							
Amostra	CD4	KLRG1	CD8	IFN-y	CD62L	CD44	PD-1
FMO CD62L	CD4	KLRG1	CD8	IFN-y	–	CD44	PD-1
F.M.O. CD44	CD4	KLRG1	CD8	IFN-y	CD62L	–	PD-1
F.M.O. KLRG1	CD4	–	CD8	IFN-y	CD62L	CD44	PD-1
F.M.O. PD-1	CD4	KLRG1	CD8	IFN-y	CD62L	CD44	–
F.M.O. IFN-y	CD4	KLRG1	CD8	–	CD62L	CD44	PD-1

- AVALIAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS T E MACRÓFAGOS

Para a imunofenotipagem das células T e macrófagos, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com os seguintes fluorocromos.

Tabela 6. Painéis de anticorpos – Células T e macrófagos

PAINEL	**FLUOROCROMOS**				
	FITC	**PeCy7**	**APC**	**Alexa Flour 700**	**APC-Cy7**
Células T e macrófagos					
Amostra	F4/80	CD11b	CD86	CD8	CD4
F.M.O. F4/80	–	CD11b	CD86	CD8	CD4
F.M.O. CD11b	F4/80	–	CD86	CD8	CD4
F.M.O. CD86	F4/80	CD11b	–	CD8	CD4

A figura 5 ilustra o processo de análise dos receptores em células T de acordo com os parâmetros acima citados.

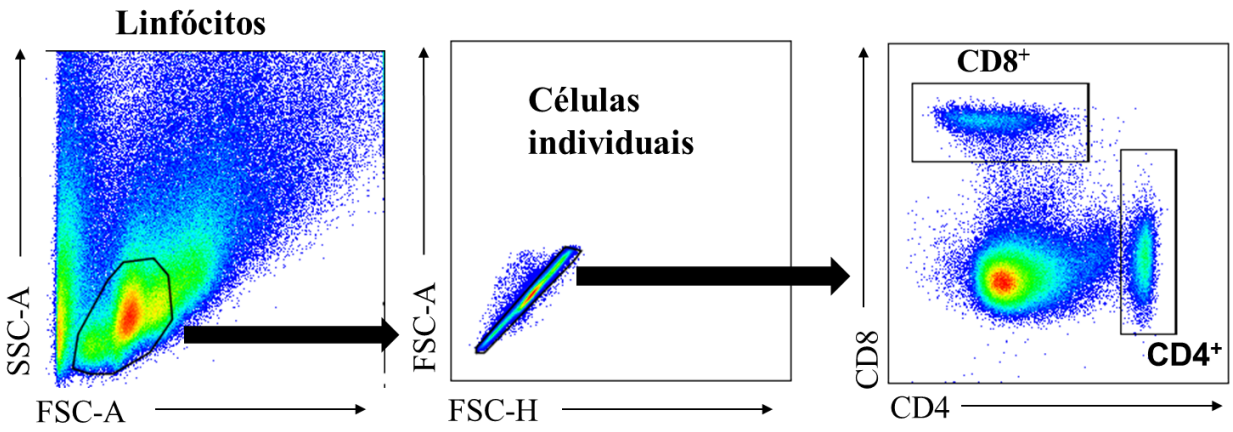

Figura 5. Estratégia de *gates* para análise de receptores em células T. Os linfócitos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. As populações CD4 positiva e CD8 positiva foram selecionadas.

A figura 6 ilustra o processo de análise dos receptores em macrófagos de acordo com os parâmetros acima citados.

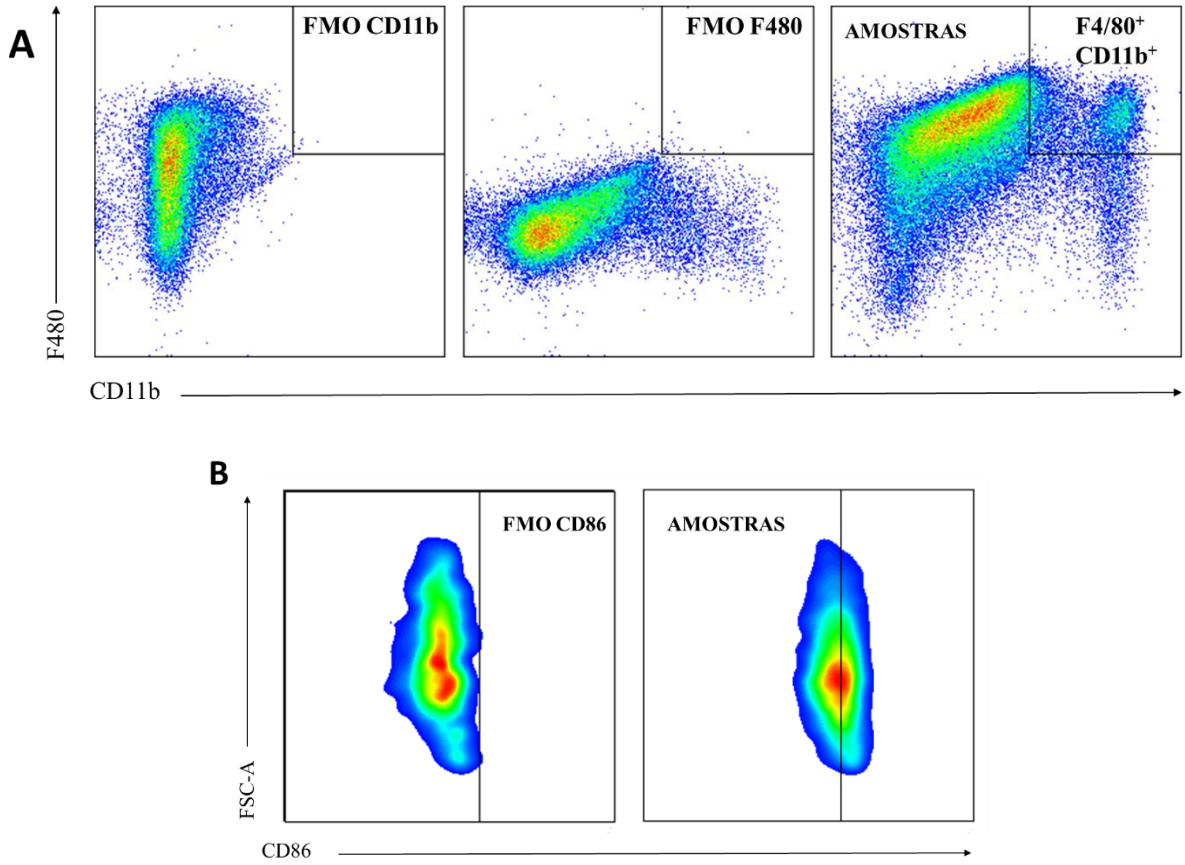

Figura 6. Estratégia de *gates* para análise de receptores em macrófagos. Os macrófagos foram identificados primeiramente pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. As populações F4/80 positiva e CD11b positiva foram selecionadas (A) e em seguida foi realizado a análise para a expressão do receptor co-estimulatório CD86 (B).

4.13. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS T

Para análise da proliferação das populações de esplenócitos, 5 x 10^6 /ml de células dos animais testados foram lavadas com PBS em temperatura ambiente, e suspensas em solução de PBS com CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) (Invitrogen®) na concentração de 1µM. A marcação procedeu-se à 37ºC, por 15 minutos, ao abrigo da luz. Após a marcação foi adicionado às células uma solução de PBS e SFB 5% (v/v), procedendo o resfriamento em gelo por 5 minutos. A suspensão de células foi então lavada com PBS e centrifugada a 400 G por 10 minutos por duas vezes após o resfriamento.

Para plaquear as células, estas foram suspensas em DMEM + SFB 10% (v/v), recebendo ou não estímulo com ConA 10 µg/mL e LcAg 20 µg/mL. A cultura permaneceu em estufa 37^{O}C/5%CO_2 por 48h a 72h. Decorrido o tempo, a suspensão de células foi transferida para uma placa de 96 poços de fundo cônico, onde então foi submetida à lavagem com solução tampão FACS (0,5 % BSA- albumina do soro bovino - e 0,05 % Azida sódica - NaN3 em PBS)

e centrifugada a 400 G por 5 minutos por duas vezes. As células então foram acondicionadas em tubos de citometria e fixadas com paraformaldeído 1% (v/v em PBS) para aquisição em citômetro de fluxo a Attune® Thermo Fisher Scientific. Para análise dos dados foi utilizado o programa FlowJo® (versão 7.6.5, TreeeStar, Ashland, OR, USA).

4.14. DETERMINAÇÃO DE APOPTOSE

Para quantificação da viabilidade celular usaram-se 200µL de suspensão de esplenócitos ($5x10^6$ células / ml) que foram sujeitas a centrifugação 400 G por 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram então ressuspesas em 25 µL de solução tampão FACS (FACS Buffer - 0,5 % v/v BSA - albumina do soro bovino - e 0,05 % g/L azida sódica - NaN3 em PBS) contendo os anticorpos monoclonais de interesse (Conforme descritos na tabelas X) na proporção de 1:50 (v/v) e incubados a 4ºC por 30 minutos no escuro. Posteriormente, para se proceder à marcação com anexina V e PI, as células foram lavadas com solução tampão FACS. Depois, o pellet foi lavado com 100µL de solução tampão de ligação (10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl2) (KIT Immunotech), e ressupenso em 25µL de solução tampão de ligação contendo a anexina V – FITC (KIT Immunotech) e de iodeto de propídeo (KIT Immunotech) na proporção de 1:4 (v/v) a 4ºC durante 15minutos, no escuro. A seguir ao período de incubação as células então foram acondicionadas em tubos de citometria e adicionaram-se 200µL de solução tampão de ligação. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo a Attune® Thermo Fisher Scientific. Para análise dos dados foi utilizado o programa FlowJo® (versão 7.6.5, TreeeStar, Ashland, OR, USA).

Tabela 7. Painéis de anticorpos – Viabilidade celular

PAINEL	**FITC**	**PE**
Apoptose ex vivo		
Amostra	ANEXINA	PI
F.M.O. ANEXINA	–	PI
F.M.O PI	ANEXINA	–

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão

6.0 levando em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de *T* de Student, para amostras não pareadas e a análise de variância (ANOVA) de duas vias, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação das médias. Dados foram considerados significantes quando valores de $P < 0,05$.

5. Capítulo 1

Obesidade induzida por dieta promove inflamação sistêmica e aumento da susceptibilidade à murina leishmaniose visceral

5.1. OBESIDADE E O IMPACTO NO METABOLISMO E RESPOSTA IMUNE

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 de uma pandemia mundial, sendo então alvo de grande preocupação e interesse da comunidade científica. A obesidade mundial quase dobrou desde 1980. Em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos estavam acima do peso e 500 milhões desses eram obesos. Nesse contexto, o Brasil contribui 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 a massa corporal pela altura ao quadrado do indivíduo. Valores de 25 a 29,9kg/m^2 são classificados como excesso de peso e valores acima de 30kg/ m^2 são classificados como obesidade. O IMC fornece a medida à 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 tem como causa a acumulação maciça de tecido adiposo em um organismo, que é devido principalmente a uma combinação de consumo excessivo de calorias além do que é necessário para manutenção das funções metabólicas e falta de atividade física. O aporte calórico de macronutrientes presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, carboidratos, lipídios e álcool) é então positivo em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física). Um número limitado de casos de obesidade deve-se principalmente a anormalidades genéticas, medicamentos, desequilíbrios hormonais ou doenças psiquiátricas. Em contrapartida, o aumento das taxas de obesidade deve-se principalmente ao aumento do consumo de dietas de alto teor de gordura e açúcar facilmente acessíveis e saborosas, diminuiu as taxas de atividade física na vida cotidiana (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003; DE HEREDIA *et al.*, 2012).

Numerosos estudos demonstraram que fatores associados à dieta são importantes na modulação do desenvolvimento de aumento da adiposidade e disfunção metabólica. Além disso, o progresso na compreensão da patogênese da obesidade destaca a delicada integração da nutrição, metabolismo e sistema imunológico (JORDANIA DA SILVA et al., 2017; MAIOLI et al., 2016).

5.2. ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE E DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

A obesidade caracteriza-se por uma condição inflamatória crônica e sistêmica que afeta diretamente a função imune inata e adaptativa, reduzindo a capacidade de fagocitose por leucócitos, diminuindo a frequência de células T reguladoras e desregulando a produção de citocinas e quimiocinas (FUENTES *et al.,* 2010, YANG *et al.,* 2010). Estas funções alteradas aumentam o risco de desenvolvimento de câncer (KRAUS & ARBER, 2009; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.,* 2013) e susceptibilidade a patógenos (BARTH *et al.,* 2013; ONOFRIO *et al.,* 2015), além de diminuirem a eficácia vacinal (FARMAKI *et al.*, 2010, CHEN *et al.,* 2014).

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. A leptina, que se encontra aumentada em indivíduos obesos, está relacionada com o aumento da função de células NK e com o declínio das concentrações de Th2, favorecendo o desenvolvimento de doenças mediadas pelo sistema imune (DE LORENZO *et al*., 2007). Porém, 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 à parasitas intracelulares. No entanto, por algum motivo ainda obscuro, no indivíduo obeso esse mecanismo não leva ao controle de infecção (ZHOU *et al*., 2011).

Uma proteína abundante no tecido adiposo é adiponectina, também conhecida como proteína complementar relacionada com o adipócito. É produzida exclusivamente pelo tecido adiposo de humanos, macacos e roedores, e está envolvida na resposta inflamatória e regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório, podendo ser útil para 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, e em indivíduos muito obesos, os macrófagos constituem até 40% da população celular do tecido. Essas tão importantes células imunes podem apresentar heterogeneidade significativa em sua função, a depender de fatores locais capazes de estimular programas distintos de ativação, com diferentes perfis de mediadores inflamatórios, marcadores de superfície e enzimas metabólicas. (KANNEGANTI; DIXIT, 2012; SICA; MANTOVANI, 2012).

Estudos *in vitro* definiram a existência de dois polos de ativação de macrófagos

denominados M1 e M2. *In vivo,* os macrófagos teciduais provavelmente assumem estados de ativação intermediários entre os polos M1 e M2. Os macrófagos M1 ou macrófagos "classicamente ativados" são induzidos por mediadores pró inflamatórios, como IFN-γ e apresentam produção aumentada de citocinas pró inflamatórias (como o TNF-α) e espécies reativas de oxigênio (como NO). Já os macrófagos M2, ou "ativados por via alternativa", são induzidos por outras citocinas como as IL-4 e IL-13, e apresentam um perfil com expressão significativa de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10. Os macrófagos M2 também apresentam produção aumentada de arginase, que pode competir com a arginina, necessária para a produção de NO. A evidência atual sugere que os macrófagos M2 participam da supressão de respostas inflamatórias e promoção do reparo tecidual. Desse modo, durante a patogênese da síndrome metabólica, o estado inflamatório relacionado com a obesidade também pode interferir na recuperação de lesões nesses pacientes (KANNEGANTI; DIXIT, 2012; SICA; MANTOVANI, 2012; GORDON, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003).

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 verificou-se 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.

Vários modelos experimentais de obesidade, incluindo induzidos por dieta e por fatores genéticos foram utilizados para fornecer uma caracterização das consequências imunológica e metabólica da obesidade (NEVES *et al.*, 2007; KENTISH *et al.*, 2015). As dietas baseadas em altas concentrações de açúcar e gordura, que reproduzem mais de perto um padrão típico da dieta ocidental tem demonstrado promover não apenas o aumento de peso compatível com obesidade, mas também alterações metabólicas e inflamatórias em camundongos (MAIOLI *et al.*, 2015).

A resposta imunológoca a longo prazo que permite a eficácia de protocolos de vacinação, é a responsável há anos pelo controle da 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, com camundongos, com a deficiência de leptina (*ob / ob*) ou do 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). Num trabalho de Shamshiev e colaboradores (2007), 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.

Neste trabalho, usamos um modelo bem descrito de obesidade induzido pelo consumo de grandes quantidades de açúcar e gordura e investigamos sua possível associação com a suscetibilidade à leishmaniose visceral. Nossa hipótese foi de que o ambiente inflamatório promovido pela obesidade induzida pela dieta hipercalórica poderia potencialmente influenciar o desenvolvimento e o resultado da infecção causada por *L. infantum*. Considerando a crescente preocupação mundial com as epidemias de obesidade em associação com o crescimento da emergente leishmaniose visceral nos centros urbanos, consideramos este um tópico clinicamente relevante. Parte dos resultados deste capítulo foram publicados e estão descritos a seguir.

5.3. RESULTADOS

Diet-induced obesity promotes systemic inflammation and increased susceptibility to murine visceral leishmaniasis

GLÊNIA DAROS SARNÁGLIA[1], LUCIANA POLACO COVRE[1], FAUSTO EDMUNDO LIMA PEREIRA[1], HERBERT LEONEL DE MATOS GUEDES[2], ANA MARIA CAETANO FARIA[3], REYNALDO DIETZE[1], RODRIGO RIBEIRO RODRIGUES[1], TATIANI UCELI MAIOLI[4] *and* DANIEL CLÁUDIO OLIVIERA GOMES[1,5]*

[1] *Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, Brazil*
[2] *Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*
[3] *Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*
[4] *Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*
[5] *Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, Brazil*

(*Received 7 April 2016; revised 15 June 2016; accepted 26 June 2016*)

SUMMARY

Obesity is the main causal factor for metabolic syndrome and chronic systemic inflammation, which impacts on immune function and increases susceptibility to pathogens. Here, we investigated the effect of obesity on the outcome of visceral leishmaniasis caused by *Leishmaniasis infantum chagasi*. C57BL/6 mice fed with high-sugar and butter diet (HSB) showed a significant increase in body weight, adiposity index and morphological changes in adipocyte. To investigate the consequences of obesity on the specific immunity against Leishmania, both control and HSB diet groups were infected with 10^7 *L. infantum chagasi* promastigotes in the eighth-week after diet started and euthanized 4 weeks later. HSB-diet fed mice exhibited a significantly higher parasite burden in both liver and spleen compared with control- diet group. Gonadal adipocyte tissue from HSB-diet mice showed increased TNF-α, IL-6 and leptin and diminished IL-10 production compared with control. Cytokines production analysis in the spleen and liver from these animals also demonstrated higher production of IFN-γ, TNF-α, IL-6 and nitric oxide and diminished production of IL-10 and TGF-β, which correlate with inflammatory foci and the cell hyperplasia observed. Taken together, obesity can interfere with responses to pathogen-derived signals and impair the development of protective anti-Leishmania immunity.

Sarnaglia e cols., Parasitology © Cambridge University Press 2016, doi:10.1017/S003118201600127X

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

Os camundongos C57BL/6 alimentados com as dietas controle (CTRL) ou hipercalórica (HSB) e infectados com *L. infantum*, foram monitorados semanalmente com objetivo de avaliar o ganho de massa corporal. Conforme observado na figura 7, camundongos alimentados com a dieta HSB apresentaram um aumento significativo no ganho de massa corporal a partir da oitava semana experimental e se mantendo até o fim do experimento, ocorrido na 14ª semana.

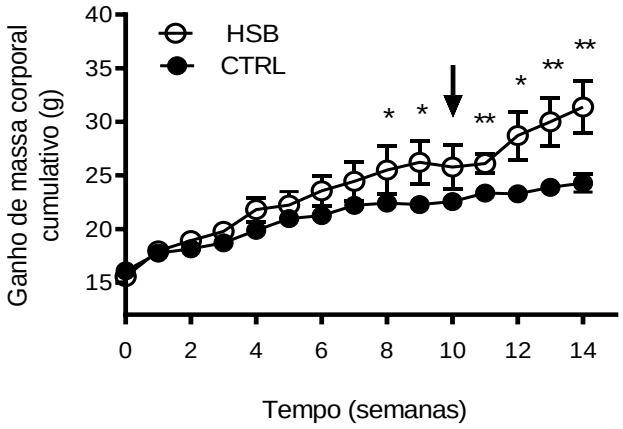

Figura 7. Ganho de massa corporal cumulativo. A avaliação do ganho de massa corporal pela administração das dietas CTRL e HSB em camundongos C57BL/6 fêmeas foi realizado em cada uma das 14 semanas de experimentação. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética ± SD. p <0,05 (*) p <0,01 (**).

As quantidades de ração fornecida aos animais foram acompanhadas durante toda a experimentação, possibilitando-nos obter os valores relativos à ingestão média diária, bem como o consumo calórico médio baseado nas informações energéticas disponíveis sobre as dietas (CTRL = 3,9 kcal/g; HSB = 4,9 kcal/g). Os camundongos alimentados com dieta HSB apresentaram aumento significativo do consumo calórico médio diário quando comparado aos animais alimentados com dieta controle, conforme descrito na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros fisiológicos de camundongos alimentados com dietas CTRL e HSB.

	CTRL	HSB
Massa corporal final (g)	24,2± 2,02	32,9± 3,31**
Consumo de dietas (g/semana/animal)	19,67± 0,43	22,14± 0,51**
Consumo energético (kcal/semana/animal)	58,31± 3,07	103,61± 5,57***
Fígado (g)	1,15± 0,07	1,35± 0,20*
Baço (g)	0,376 ± 0,04	0,505± 0,09*
Tecido adiposo gonadal (g)	0,389± 0,11	0,835± 0,38 *

Os valores são expressos como média ± S.D. com Controle n = 15 e HSB n = 15. Os dados foram comparados pelo teste T. p <0,05 (*) p <0,01 (**) p <0,001 (***). FONTE:

Após o fim do experimento, o tecido adiposo gonadal foi recolhido e mensurado para a comparação entre os grupos. Conforme demostrado na figura 8 e tabela 8, foi observado um aumento significativo na massa do tecido adiposo gonadal de camundongos alimentados com dieta HSB em relação aos animais alimentados com dieta CTRL. Além disso, camundongos alimentados com dieta HSB apresentaram uma relação de adiposidade, determinado pela razão

entre a massa do tecido adiposo gonadal e a massa corporal individual, significativamente maior quando comparados aos controles (Figura 8B).

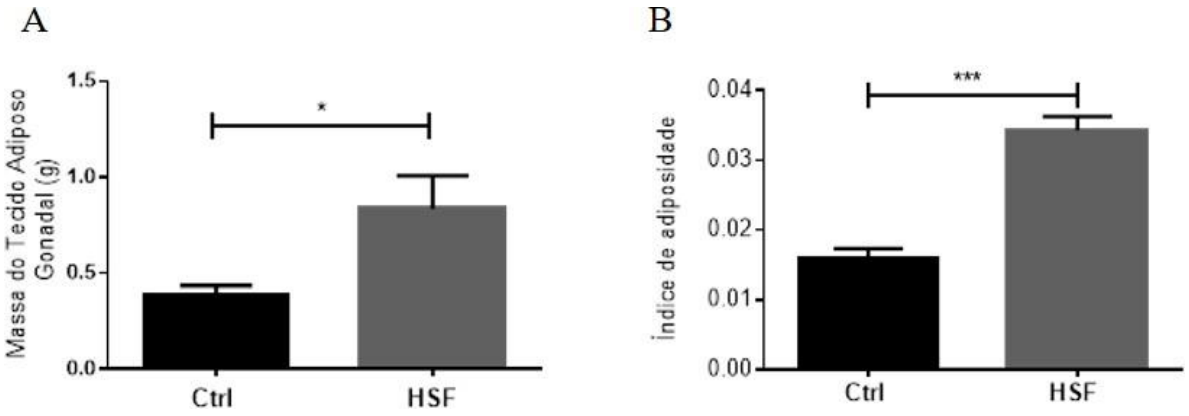

Figura 8. (A) Massa do tecido adiposo gonadal após administração das dietas CTRL ou HSB em camundongos por 14 semanas. (B) Índice de adiposidade de camundongos alimentados por 14 semanas com dietas CTRL e HSB, calculado a partir da divisão da massa do tecido adiposo gonadal pela massa corporal de cada camundongo ao final do experimento. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética ± SD. p <0,05 (*) p <0,001 (***).

Além da massa, também foi avaliado o aspecto histológico do tecido adiposo gonadal de ambos os grupos. Os animais do grupo CTRL apresentaram adipócitos sem alterações histológicas (Figura 9A). De forma contrária, adipócitos obtidos de animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram hipertrofia (Figura 9 B), sendo confirmado com a medida da área do adipócito na figura 10.

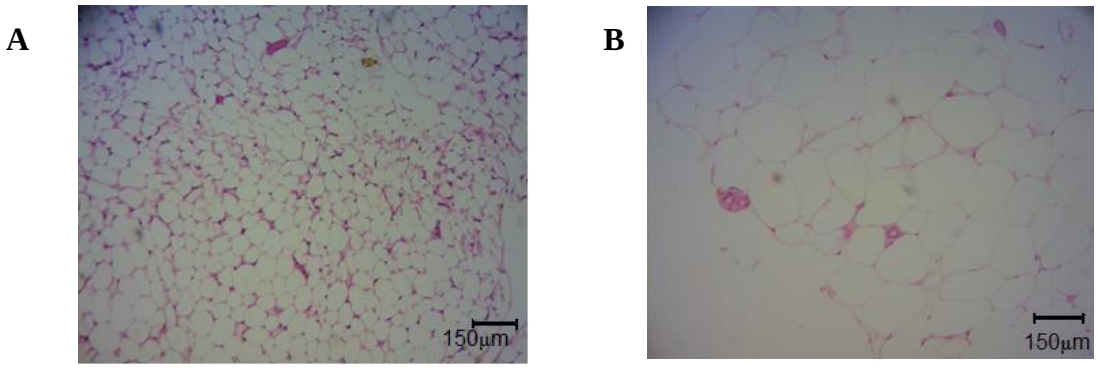

Figura 9. Fotomicrografias de tecido adiposo gonadal de camundongos alimentados por 14 semanas com dietas CTRL (A) e HSB (B). Fragmentos de cada órgão foram removidos, fixados, processados e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5µm de espessura foram coradas com hematoxilina/eosina e avaliadas por microscopia de luz. Imagens com aumento de 100x.

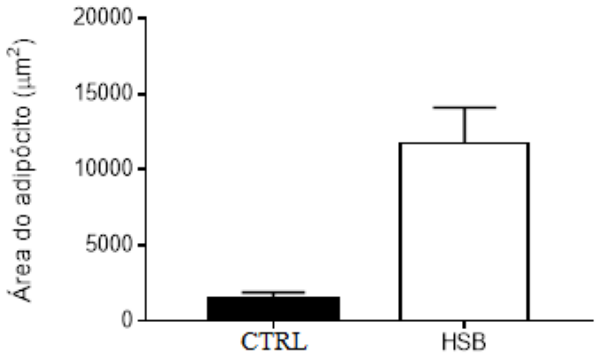

Figura 10. Área do adipócito. A partir de fotomicrografias de tecido adiposo gonadal de camundongos alimentados por 14 semanas com dietas CTRL e HSB, a área do adipócito foi calculada usando o programa de imagem LissView. Dados representativos de três experimentos independentes e representados como média aritmética ± SD. p<0,0001 (****).

5.3.2. A ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM DIETA HIPERCALÓRICA OS TORNA MAIS MAIS SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO COM *Leishmania infantum*

Muitas evidências demonstraram que a obesidade aumenta a gravidade das infecções bacterianas e virais em humanos e modelos experimentais (EASTERBROOK *et al.*, 2011; LOUIE *et al.*, 2011). A fim de investigar as consequências da obesidade na especificidade de infecção contra o parasita Leishmania, ambos os grupos controle e HSB foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum*, 8 semanas após o início da dieta, e foram eutanasiados 4 semanas após a infecção, o que corresponde ao pico do parasitismo do baço e do fígado. Como esperávamos, os camundongos C57BL/6 obesos exibiram uma carga de parasitas significativamente maior tanto no fígado quanto no baço quando comparada com o grupo controle (CTRL) (Figura 11).

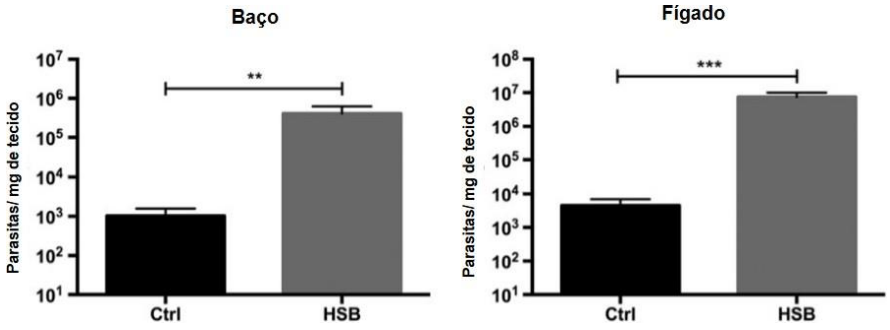

Figura 11. Efeito da obesidade induzida pela dieta no controle da infecção por *L. infantum*. Os camundongos alimentados com dietas Ctrl e HSB, foram infectados 8 semanas após o início da dieta com 10^7 promastigotas de *L. infantum*. A carga de parasitas / mg de tecido foi individualmente medido em baço e fígado quatro semanas após a infecção pelo método de diluição limitante. Os resultados são representados como médias aritméticas ± S.D. de três experimentos independentes. p <0,01 (**) p <0,001 (***).

5.3.3. CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA EXIBEM MAIOR INFLAMAÇÃO E DANOS NOS TECIDOS DURANTE A INFECÇÃO POR *L. infantum*

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos nas discrepâncias da carga parasitária entre os grupos experimentais, avaliamos mediadores pró e antiinflamatórios produzidos pelo tecido adiposo, baço e fígado. Os camundongos com obesidade induzida por dieta exibiram uma produção maciça de citocinas pró inflamatórios e altos níveis séricos de leptina em comparação com a dieta controle . Aumento dos níveis de TNF-α e IL-6 e diminuição dos níveis de IL-10 foram observados no tecido adiposo gonadal desses camundongos (Figura 12).

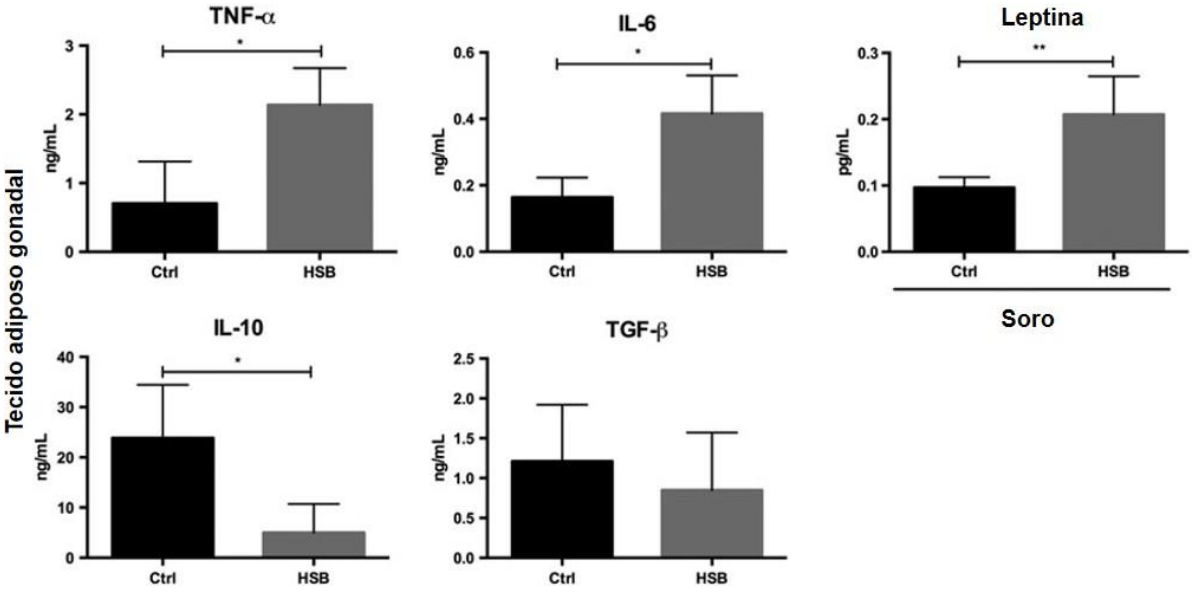

Figura 12. Efeito da obesidade induzida por dieta na produção de citocinas pelo tecido adiposo gonadal. O tecido adiposo gonadal de camundongos infectados foi coletado e processado individualmente após 14 semanas. A produção *in situ* de TNF-α, IL-6, TGF-β e IL-10 e os níveis séricos de leptina foram obtidos por ensaio ELISA e os resultados representados como médias aritméticas ± S.D. de três experimentos independentes. (*) p <0,05 (**) p <0,01.

Do mesmo modo, os animais obesos apresentaram quantidades mais elevadas de IFN-γ, TNF-α, IL-6 e nitrito, e quantidades reduzidas de IL-10 e TGF-β no fígado quando comparadas com camundongos que receberam a dieta controle (Figura 13). Não se conseguiu quantificar IL-10 ou a diferença na produção de TGF-β no baço e tecido adiposo de ambos os grupos (Figuras 12 e 13). A produção de IFN-γ e nitrito não foi detectada no tecido adiposo gonadal (Figura 12).

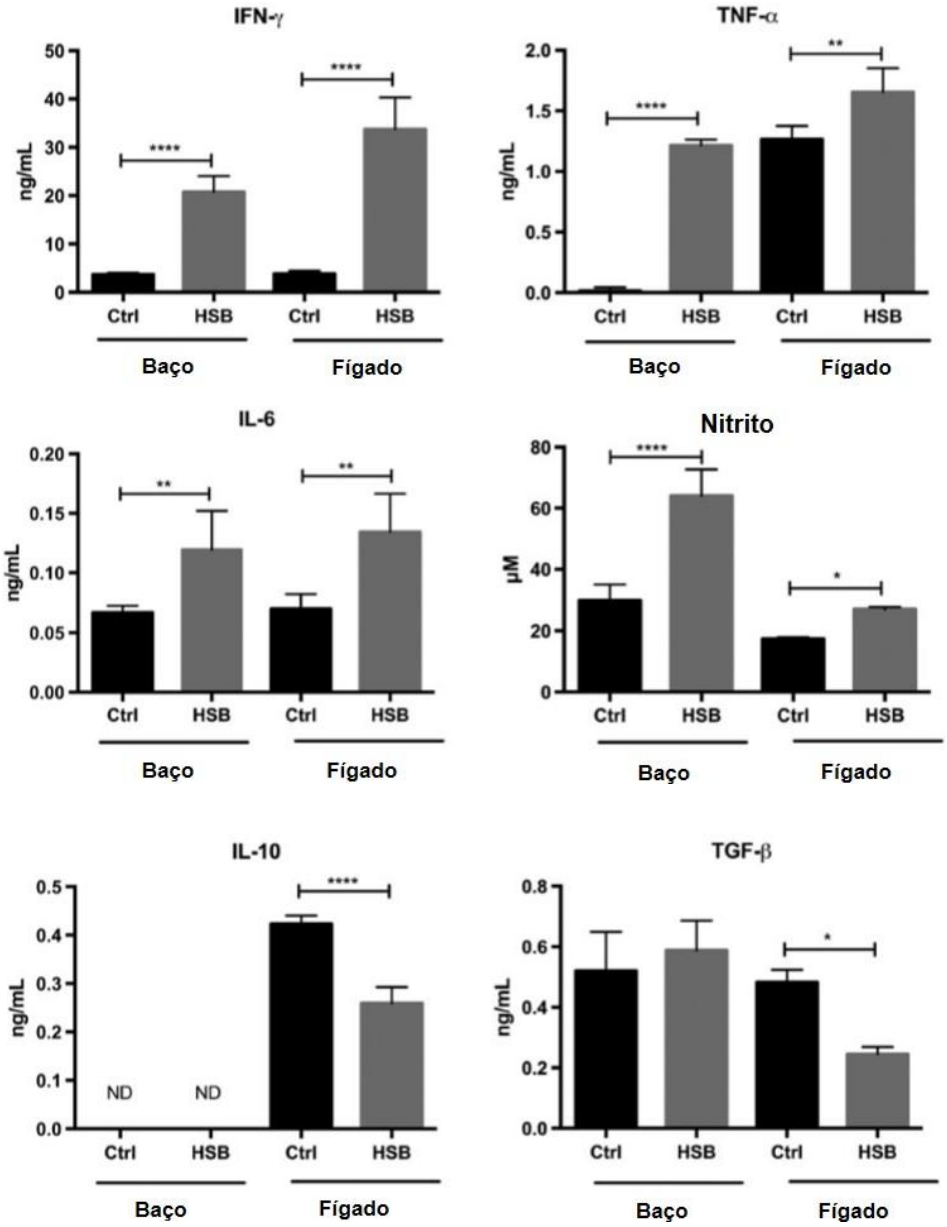

Figura 13. Efeito da obesidade induzida por dieta na produção de citocinas em tecidos infectados com Leishmania. Baço e fígado dos camundongos alimentados por dietas experimentais e infectados foram processados individualmente após a 14ª semana experimental. A produção *in situ* de TNF-α, IFN-γ, IL- 6, IL10, TGF-β e nitrito foram obtidas por ELISA ou Griess. Os resultados são representados como médias aritméticas ± S.D. de três experimentos independentes. (*) p <0,05 (**) p <0,01 (****) p<0,000.

5.3.4. PROCESSO INFLAMATÓRIO EM BAÇO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA APÓS INFECÇÃO

Para verificar as alterações morfológicas em fígado e baço causadas pelo processo inflamatório ou pela infecção por Leishmania, realizamos a coloração de hematoxilina e eosina em secções de tecidos de ambos os grupos experimentais obtidas após 4 semanas de infecção.

Em comparação com o grupo controle, as fotomicrografias hepáticas de camundongos que receberam a dieta HSB apresentaram acumulação de gordura de hepatócitos compatível com esteatohepatites e ocorrência de uma estrutura de granuloma imaturo, com manto de células mononucleares pouco desenvolvidas ao redor de um núcleo sem presença de parasitas (Figura 14A). Além disso, a secção do baço deste grupo mostrou focos inflatórios e hiperplasia celular (Figura 14B). Essas alterações morfológicas não foram observadas no fígado ou no baço do grupo de camundongos alimentados com dieta controle (Figuras 14A e B).

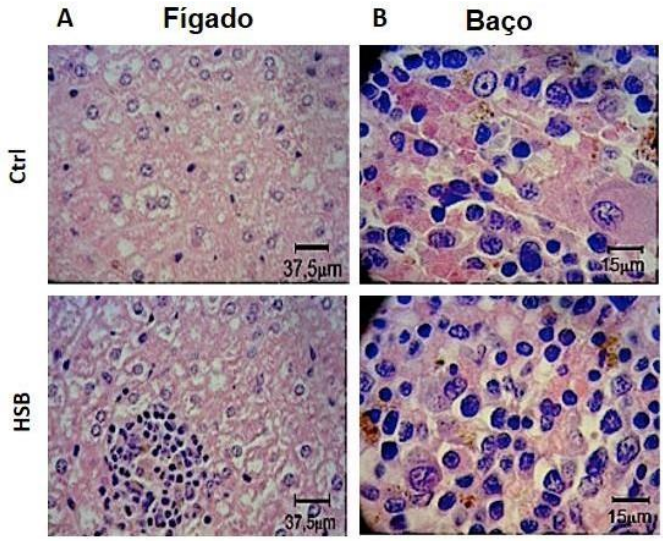

Figura 14. Inflamação tecidual em camundongos obesos infectados. Baço e fígado dos camundongos alimentados por dietas experimentais e infectados foram processados individualmente após a 14ª semana experimental, submetidos a hematoxilina e eosina, e observados num aumento de 100X ou 400X. Inflamação granulomatosa e focos de esteatose em fígado (A) e hiperplasia no baço (B).

5.4. DISCUSSÃO

A obesidade é causada por acumulação excessiva de lipídios em adipócitos que resulta em síndromes metabólicas e inflação crônica sistêmica (WEISBERG *et al.,* 2003). O tecido adiposo é responsável por produzir e liberar uma variedade de adipocinas (leptina, adiponectina, resistina e visfatina) e citocinas pró inflamatórias que estão associados ao aumento da suscetibilidade às infecções pós-cirúrgicas, à doença periodontal e à redução da resposta à vacinação e tratamento antimicrobiano (CHEN *et al.*, 2014, ONOFRIO *et al.*, 2015).

Neste estudo, fornecemos a primeira evidência de que a obesidade induzida por dieta poderia promover uma susceptibilidade aumentada à infecção por *Leishmania infantum* e o desenvolvimento de leishmaniose visceral murina. Neste estudo, nós alimentamos camundongos C57BL / 6 com uma dieta bem descrita, rica em açúcar como fonte de carboidratos e manteiga como fonte de lipídios (dieta HSB), que foi capaz de promover o aumento significativo da massa corporal e a massa do tecido adiposo gonadal, além de mudanças na morfologia dos adipócitos (MAIOLI *et al.,* 2015). As dietas baseadas em concentrações elevadas de açúcares e gordura reproduzem corretamente o padrão dietético típico do ocidente, e também promovem alterações metabólicas e inflamatórias em camundongos relacionadas ao seu consumo (MAIOLI *et al.,* 2015). Em pessoas obesas e modelos experimentais, o consumo regular de dieta rica em açúcar e gordura é responsável pela expansão da massa gorda através de hiperplasia de adipócitos e / ou hipertrofia de adipócitos (SIRIWARDHANA *et al.*, 2013), que também foi confirmada em nossos achados. Além disso, neste estudo, os camundongos alimentados com a mesma dieta HSB apresentaram aumento de peso corporal após 2 semanas de alimentação (YANG *et al.,* 2012; MAIOLI *et al.,* 2015).

Trabalhos anteriores fornecem evidências fortes de que as alterações no metabolismo lipídico e lipoprotéico durante a obesidade são comumente associadas a uma resposta inflamatória exagerada e a uma maior susceptibilidade a infecções (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; OUCHI *et al.,* 2011). O tecido adiposo gonadal atua produzindo quantidades anormais de citocinas pró-inflamatórias resultando em um perfil de inflação crônica (RAMALHO & GUIMARÃES, 2008). Além disso, observam-se diminuição da frequência de células T reguladoras (MAIOLI *et al*., 2015); aumento da atividade de estresse oxidativo de adipócitos / hipóxia e expressão anormal de MHC II, que tem sido implicada com alta produção de IFN-γ durante a obesidade (JOVICIC *et al*., 2015, LIU *et al.,* 2016). Em nosso estudo, os camuandongos obesos apresentaram níveis aumentados de várias citocinas em

comparação com o grupo da dieta controle. O grupo de dieta HSB apresentou uma regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN-γ e nitrito (usado como marcador indireto da produção de óxido nítrico) e desregulação das citocinas inibitórias IL-10 e TGF-β produzidas não apenas pelo tecido adiposo gonadal, mas também no fígado e no baço desse animais.

Alterações inflamatórias na obesidade têm sido associadas também à hiperleptinemia que prejudica a sensibilidade à insulina e promove o acúmulo de lipídios (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; ZHANG *et al.,* 2013). Em consonância com Maioli e colaboradores (2015), descobrimos que a obesidade causa hiperleptinemia concomitante com alterações em diferentes citocinas durante a infecção por *L. infantum*. A hiperleptinemia tem se relacionado com a supressão de IL-10 e ativação de IL-1β, de TNF-α, IL-8 e IL-6, através da produção mediada pela ativação de NF-kB (WOLF *et al*., 2004; OUCHI & WALSH, 2007).

O aumento de fatores inflamatórios em camundongos obesos está associado ao aumento da mortalidade e da gravidade da infecção, como o vírus influenza; *Trypanosoma cruzi*; *Schistosoma mansoni* e *Plasmodium berghei* (BACELLAR *et al.,* 2002; NEVES *et al*. 2007; OUCHI E WALSH, 2007; NAGAJYOTHI *et al*., 2014). Em nosso trabalho, ampliamos esses achados para modelos de leishmaniose visceral, mostrando que camundongos obesos desafiados com *L. infantum* apresentam carga de parasitas significativamente maior em fígado e baço em comparação com camundongos controle. Embora a resposta eficaz do tipo Th1, com os macrófagos ativados por IFN-γ e o aumento da produção de TNF-α e óxido nítrico sejam cruciais contra a infecção por Leishmania (LEAL *et al*. 2015), o controle deficiente da inflamação ou a resposta imune pró-inflamatória exagerada foram associados com danos nos tecidos e falha no controle do parasita durante a leishmaniose visceral e cutânea (PIRMEZ *et al.,* 1993; MELBY *et al.* 2001; MARQUES-DA-SILVA *et al.* 2005; CARVALHO *et al*., 2007).

A produção inadequada de IFN-γ e TNF-α foi observada em respostas *in vitro* e análise i*n situ* de lesões cutâneas de leishmaniose e correlacionadas com destruição tecidual grave em leishmaniose mucocutânea (FARIA *et al*., 2005; CARVALHO *et al*., 2007). Além disso, a fase aguda da Leishmaniose Visceral Humana cursa com alto parasitismo desenvolvido concomitantemente a expressão elevada de IFN-γ no baço e medula óssea, bem como o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN-γ e TNF- α) e quimiocinas circulantes (HAILU *et al.,* 2004; NYLÉN et al 2007, KUMAR et al. 2014). Em concordância com nossos achados, esses resultados demonstram que a falha na eliminação do parasita, mesmo na presença de citocinas, não se deve à incapacidade de montar respostas Th1 protetoras por si, mas sim à indução de supressão, resultando em uma função imunológica ineficaz (VOULDOUKIS *et al*. 1997). Além disso, a produção exagerada de citocinas inflamatórias também foi

correlacionada com hiperplasia tecidual e desenvolvimento de granuloma hepático durante a leishmaniose visceral (GAZE *et al*., 2006; TERRAZAS *et al.*, 2015). Embora a ocorrência de granuloma seja uma maneira importante de controlar parasitas hepáticos, a expressiva presença de granulomas imaturos (como observamos em camundongos alimentados com dieta HSB) não garante necessariamente a função antimicrobiana e o mecanismo microbicida durante a leishmaniose visceral em camundongos C57BL / 6 (MURRAY, 2001, KAYE *et al.*, 2004), que corrobora nossos achados e sua associação com uma carga de parasitas aumentada no fígado.

De modo geral, este estudo aborda a associação entre a inflação crônica na obesidade causada por dieta com alto teor de açúcar e gordura, e seu impacto no desfecho da leishmaniose visceral murina. O estabelecimento de uma relação entre as condições clínicas deve ser importante para fornecer práticas de intervenção eficazes no futuro.

5.5. CONCLUSÃO

Camundongos obesos foram capazes de gerar uma alta resposta inflamatória inespecifica, insuficiente para conter a infecção. Além disso, nossos dados demonstram o papel da inflamação sistêmica no aumento da susceptibilidade

6. Capítulo 2

6.1 OBESIDADE E A MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PATÓGENOS

Além de aumentar o aparecimento de desequilíbrios metabólicos, a obesidade leva a uma vida útil reduzida e processos celulares acelerados semelhantes aos do envelhecimento (AHIMA, 2009), como a deterioração da estrutura e função dos órgãos associados ao estresse oxidativo, instabilidade genética e perturbação das vias homeostáticas (RUSSELL & KAHN, 2007). Aumento do peso e acumulação anormal de tecido adiposo levam a consequências prejudiciais para a saúde, em parte porque a gordura é frequentemente o maior órgão humano, e constitui mais da metade da composição do corpo em um número alarmante de pessoas e, portanto, a extensão das consequências é ampliada (AHIMA, 2009).

A obesidade causa a morte prematura por muitas causas que são comuns em idosos: diabetes, ataques cardíacos, acidentes vasculares cerebrais, câncer e demência (BJORNTORP, 1990; DENKE *et al.*, 1993, 1994; COLDITZ *et al.*, 1995; LEAN, 2000). A obesidade e o envelhecimento estão ambos associados à inflamação crônica e de baixa intensidade e à resistência à insulina, aumento das proteínas pró-inflamatórias, quimiotáticas e pró coagulantes locais e circulantes, e deposição lipídica ectópica com lipotoxicidade (HOTAMISLIGIL & SPIEGELMAN, 1994; SAMAD *et al.*, 1996, 1997; VGONTZAS *et al.*, 1997; FRIED *et al.*, 1998; WEISBERG *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003). É, portanto, similar a uma forma acelerada de envelhecimento do tecido adiposo (AHIMA, 2009; MINAMINO *et al.*, 2009). Isto é especialmente verdadeiro na obesidade maciça ou visceral. Como no envelhecimento, a expressão de fatores de transcrição adipogênicos do tecido adiposo diminuem na obesidade, e os mediadores inflamatórios, incluindo TNF-α e IL-6, são aumentados (XU *et al.*, 2002; WEISBERG et al., 2003; XU *et al.*, 2003).

A análise de processos que causam a disfunção do tecido adiposo na obesidade poderia apontar para mecanismos que contribuem para a disfunção metabólica como o envelhecimento e mesmo o próprio processo de envelhecimento. Os eventos que levaram à inflamação do tecido adiposo na obesidade foram investigados através da análise dos efeitos da alimentação com alto teor de gordura em roedores. Essas dietas induzem a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e proteínas modificadoras de matriz extracelular (MEC) em dias a semanas (XU *et al.*, 2003; SUGANAMI *et al.*, 2005). Isso está associado a alterações em subconjuntos de linfócitos T, ao invés do número absoluto dessas células (FEUERER *et al.*, 2009; NISHIMURA *et al.*, 2009).

Como a obesidade e o envelhecimento compartilham características semelhantes, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias associadas a um sistema imunológico comprometido, a obesidade é considerada uma doença do envelhecimento associada a mecanismos comuns de imunossenescência prematura. A imunossenescência por sua vez é caracterizada por uma alteração funcional da imunidade dependente do tempo, levando à sua deterioração (DE LA FUENTE; M. DE CASTRO, 2012).

A alimentação com alto teor de gordura resulta em uma proporção aumentada de linfócitos T $CD8^+$ efetores, com um progressivo aumento das células liberando citocinas pró-inflamatórias T_H1, em relação às células auxiliares $CD4^+$ e células T reguladoras - Tregs. Isso também ocorre nos seres humanos: o número de células T CD8a é maior e as Tregs são reduzidas no tecido adiposo dos obesos comparados aos humanos magros. O tecido adiposo de camundongos obesos induz a ativação e proliferação de linfócitos T $CD8^+$ em co-cultura, sugerindo que as quimiocinas produzidas pelo tecido adiposo podem estar conduzindo às mudanças nos subconjuntos de linfócitos T (FEUERER *et al.,* 2009; NISHIMURA *et al*., 2009).

O tecido adiposo também é infiltrado por mastócitos à medida que a obesidade se desenvolve em camundongos e humanos. Os mastócitos contribuem para a produção de IL-6, IFN- γ e complicações metabólicas da obesidade, incluindo resistência à insulina e acúmulo de gordura no fígado. Após as mudanças nos subconjuntos de linfócitos T e na acumulação de mastócitos durante o desenvolvimento da obesidade, o tecido adiposo é infiltrado por macrófagos M1 ativados classicamente. Isto é provavelmente devido a sinalização de quimioatraentes, como o IFN- γ secretado por linfócitos T e mastócitos (WEISBERG *et al*., 2003; XU *et al*., 2003; NISHIMURA *et al*., 2009; LIU *et al.,* 2009).

Num ambiente com uma inflamação crônica persistente, como na obesidade, câncer, doenças autoimunes ou em infecções crônicas, nas quais ocorrem uma estimulação antigênica a longo prazo, há um prejuízo da função das células T, denominado exaustão de células T. A exaustão celular pode ser definida pela redução da capacidade efetora das células T, caracterizada pela baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN-γ e citotoxicidade, além da redução da capacidade proliferativa destas células favorecendo a deleção das populações antígeno específicas (RODRIGUES et al., 2016; WHERRY, 2011; SCHIETINGER; GREENBERG, 2014; CRESPO et al., 2013).

Na fase aguda de uma infecção, as células T são capazes de eliminar o patógeno e formar células de memória, que por sua vez são capazes de responder de forma mais rápida e eficiente a uma reinfecção (WHERRY, 2011). O que é percebido numa infecção crônica é a perda desta

eficiência nas células T, que podem sofrer apoptose ou perda progressiva de suas funções efetoras levando à exaustão celular (BLACKBURN et al., 2009).

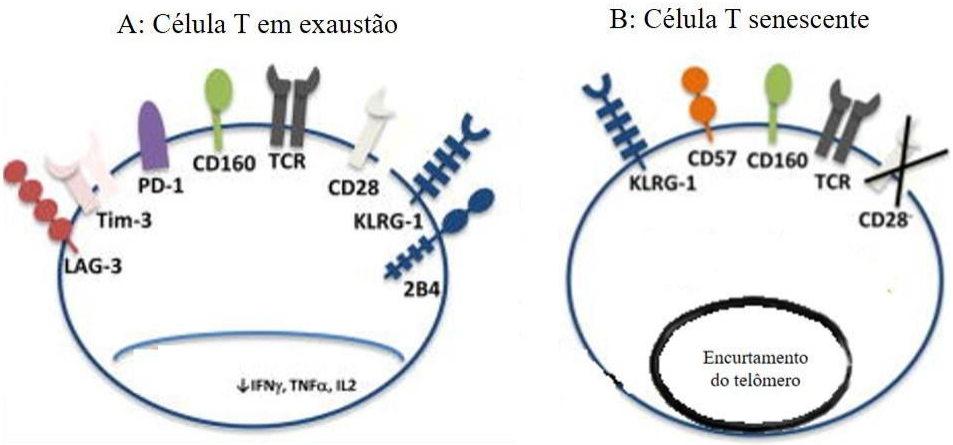

Figura 15. Receptores de células T em axaustão e senescente. (A) Célula T em exaustão – as células T exaustas são células T efetoras que perderam suas funções, incluindo a expressão de citocinas efetoras devido à estimulação repetida. Essas células expressam múltiplos receptores reguladores. (B) Célula T senescente - as células T senescentes são descritas como células T não responsivas / terminalmente diferenciadas. Como características, temos a baixa capacidade proliferativa, graças à redução da atividade da telomerase, juntamente com a expressão limitada de CD28 e / ou altos níveis de expressão de receptores reguladores. Adaptado de Crespo e colaboradores, 2013.

A exaustão de células T foi inicialmente notada há duas décadas em modelos de infecções virais crônicas, especificamente numa infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) em camundongos (GALLIMORE *et al.*, 1998; MOSKOPHIDIS *et al.*, 1993; ZAJAC *et al.*, 1998). Posteriormente observou-se o fenômeno em infecções por HIV (CUBAS *et al.*, 2013), HBV (ZHOU *et al.*, 2013), passando depois a ser observada em infecções por helmintos, como o *Schistosoma mansoni* (SMITH *et al.*, 2004), infecções por bactérias como o *Mycobacterium tuberculosis* (ALVAREZ *et al*, 2010; JURADO *et al*, 2008) e finalmente foi descrita em protozoários, como o *Tripanosoma cruzi* (ARGÜELLO *et al*., 2012; ARGÜELLO *et al*., 2014). Diante desses trabalhos, podemos observar vários fatores que contribuem para a exaustão das células T durante o processo infeccioso, entre eles estão a carga parasitária do hospedeiro, o tempo de infecção, os níveis de células CD4+ e células T reguladoras e o tipo e células apresentadora de antígeno (ANGELOSANTO & WHERRY, 2010).

Evidências têm relacionado a ocorrência de exaustão de células T com expressão progressiva e sustentada de receptores inibidores em células T efetoras. Estes incluem: Receptor de morte celular programada 1 (PD-1), Antígeno 4 de linfócitos T citotóxico (CTLA-4), Gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3), por exemplo (Figura 2A). Estes receptores agem inibindo

a ativação de células T, impedindo assim a função efetora ideal (YI *et al.*; 2010; JIN *et al.*, 2010; JIN *et al.,* 2011; WHERRY, 2011). O mecanismo de exaustão celular pode ser considerado uma estratégia de evasão do sistema imunológico elaborado por micro-organismos, como bactérias, dificultando a ação da resposta imunológica adaptativa durante a infecção crônica (JURADO et al., 2008). Embora a expressão de receptores inibitórios seja benéfica na contenção do progresso de doenças autoimunes, esse princípio não se aplica ao desenvolvimento de câncer e doenças infecciosas crônicas (MCKINNEY; SMITH, 2016).

Em modelos de leishmaniose, camundongos infectados com *L. donovani*, células TCD8 de baço exibiram sinais de exaustão funcional na terceira semana após a infecção e um grave prejuízo funcional foi evidente após a quarta semana, com a produção ineficaz de IFN-γ, TNF, IL-2 e granzima B. A exaustão é relacionada ao aumento da expressão de PD-1 em células T CD8 e seu ligante PD-L1 em CDs esplênicas. O tratamento com um anticorpo que bloqueou a interação PD-1 / PD-L1 resgatou a funcionalidade de células T CD8 parasita-específicas efetoras e de memória, resultando em menor carga de parasitas nos baços desses animais. Interessantemente, a recuperação da função efetora de células T CD8 após o bloqueio de PD-1/ PD-L1 foi apenas parcial, sugerindo que receptores inibitórios adicionais podem contribuir para o desgaste funcional de células T CD8 durante a LV (JOSHI *et al*., 2009).

A relevância desses achados em camundongos foi confirmada em pacientes com LV humana, cujas células TCD8 de baços exibiram de forma semelhante comprometimento funcional e expressão aumentada de PD-1 e CTLA-4. Contrastando com a riqueza de evidências que demonstram a exaustão das células T CD8, nas células T CD4 o fenômeno foi muito menos estudado e menos compreendido. (SHALINI *et al.,* 2014; WHERRY, 2011; WHERRY; KURACHI, 2015).

A senescência celular foi reconhecida como um processo biológico desde a década de 1960, quando fibroblastos sofreram uma parada no crescimento após extensa replicação. Este processo foi atribuído à erosão de telômeros (repetições de sequências hexaméricas de nucleotídeos nas extremidades de cromossomos lineares), que ocorre devido à redução da atividade da enzima telomerase, que adiciona telômeros às extremidades dos cromossomos (AKBAR; FLETCHER, 2005; AKBAR.; VUKMANOVIC-STEJIC, 2007).

Quando nos deparamos com a resposta imune adaptativa e a proliferação de células T (sofrem expansão clonal via divisão celular) após a estimulação antigênica, notamos o prejuízo advindo com a senescência. Células senescentes possuem baixa capacidade proliferativa, graças à redução da atividade da telomerase, e se apresentam numa avançada fase de ativação celular, com alta produção de citocinas e grânulos citotóxicos (BURTON; FARAGHER, 2015;

SIMPSON *et al.*, 2010; AKBAR; FLETCHER, 2005).

Células T de memória, por serem células mais terminalmente diferenciadas, apresentam em sua superfície celular alta expressão dos receptores KLRG1 e/ou CD57. O receptor de morte G1 semelhante à lectina (KLRG1) é expresso em diferentes subtipos celulares, como células NK, células T efetoras, células T de memória e células T reguladoras. A expressão desse receptor como marcador de senescência replicativa, é então dependente do número de divisões celulares seguindo a estimulação antigênica. Células T CD8+ expressando KLRG1 apresentam uma capacidade diminuída para proliferar, mas ainda mantendo capacidades efetoras imediatas, tais como o reconhecimento e morte de células-alvo (SIMPSON *et al.*, 2010). Linfócitos T CD8+ com alta expressão de CD57 tem uma reduzida habilidade de proliferar, citotoxicidade aumentada, produzem menos IL-2 mas mais IFN-γ, e tem características indicativas de senescência replicativa, incluindo telômeros encurtados e aumento da expressão de KLRG1. Essas mesmas populações celulares falham em expressar CD28, uma importante molécula co-estimuladora para a ativação e proliferação de linfócitos T virgens após um encontro antigênico (Figura 2B) (AKBAR; FLETCHER, 2005; AKBAR; VUKMANOVIC-STEJIC, 2007; AKBAR; HENSON, 2009).

Neste contexto, os estudos dos receptores inibitórios vem sendo enfatizado para uma melhor compreensão da sua função (DERMANI et al., 2019; SABINS et al., 2017; YAGHOUBI et al., 2019) e importância no âmbito das doenças infecciosas e doenças crônicas, tanto em modelos animais quanto em humanos (COVRE et al., 2019; TZENG et al., 2012; VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009; KADO et al., 2019). Devido ao caráter crônico da leishmaniose e da obesidade, e ao fato dos receptores inibitórios limitarem a resposta imunológica a diversos patógenos, nos propusemos avaliar se essas moléculas são expressas em esplenócitos, o que nos auxiliaria na compreensão da susceptibilidade encontrada nos nossos dados anteriores.

Deste modo, neste capítulo nos propusemos a dar continuidade nos estudos da obesidade, avaliando o impacto do ambiente altamente inflamatório na modulação da resposta imune contra *L. infantum*. Assim, realizamos uma ampla caracterização da expressão de receptores inibitórios nos compartimentos de células T durante a obesidade e infecção, demonstrado nos gráficos a seguir.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL NÃO ALTERAM A FREQUÊNCIA DE RECEPTORES INIBITÓRIOS EM CÉLULAS T

Tendo em consideração o impacto da obesidade (CHEN et al., 2015) e infecção por Leishmania (CHIKU et al., 2016; STÄGER; RAFATI, 2012) na modulação de receptores de ativação e inibição, avaliamos o perfil celular e frequência dos receptores PD-1 e KLRG1 nas células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ com o propósito de observar possíveis diferenças na modulação da resposta imunológica entre os grupos estudados. A frequência de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ entre os grupos não apresentou diferenças (dados não mostrados). De forma surpreendente não houve diferença nas frequências os receptores PD-1 e KLRG1 nos animais infectados com *L. infatum* (figura 16 D). O mesmo perfil de frequência foi observado nos aminais não infectados (dados não mostrados).

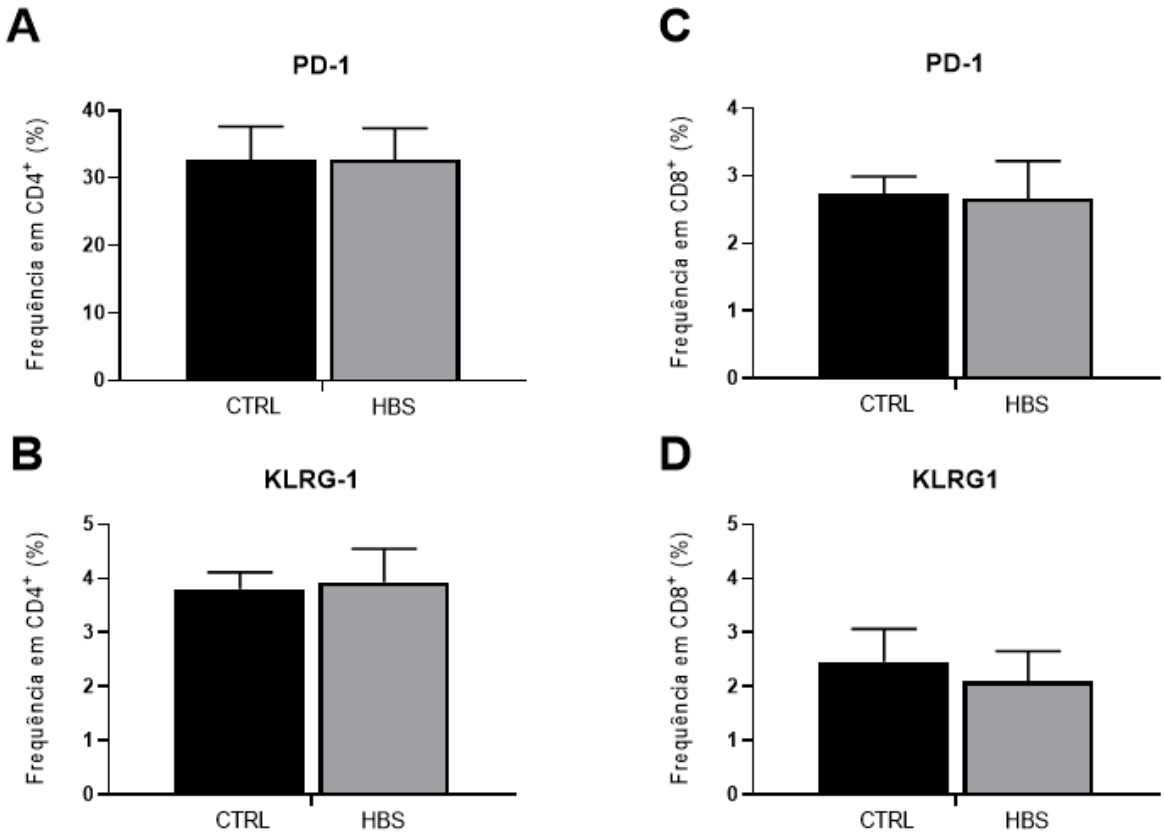

Figura 16. Análise ex vivo da frequência de expressão de receptores inibitórios em Linfócitos T durante a infecção por *L.infantum*. Células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ isoladas de esplenócitos de camundongos C57BL/6 foram marcadas para a avaliação da expressão de PD1 (A e C) e KLRG1 (B e D) e analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes.

6.2.2. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL DIMINUEM A FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T $CD4^+$ DE MEMÓRIA EFETORA

Além de alterações no perfil de receptores inibitórios, é sabido que as populações de linfócitos T de memória são impactadas durante doenças crônicas, como a obesidade, e infecções, o que também foi avaliado em nosso estudo. Conforme observado na figura 17, os camundongos controle e obesos infectados não demonstraram diferenças na frequência de células $CD4^+$ e $CD8^+$ naives ($CD44^-$ $CD62L^+$) e células $CD4^+$ memória central ($CD44^+$ $CD62L^+$). Não houve diferença nos compartimentos de memória dos animais não infectados (dados não mostrados).

Na memória efetora ($CD44^+$ $CD62L^-$), importante compartimento com função efetora e menos proliferativas em comparação às células de memória central, os animais controles infectados apresentaram aumento significativo nas células T $CD4^+$, enquanto nas células T $CD8^+$ não foi observado diferenças. (Figura 17 C e F).

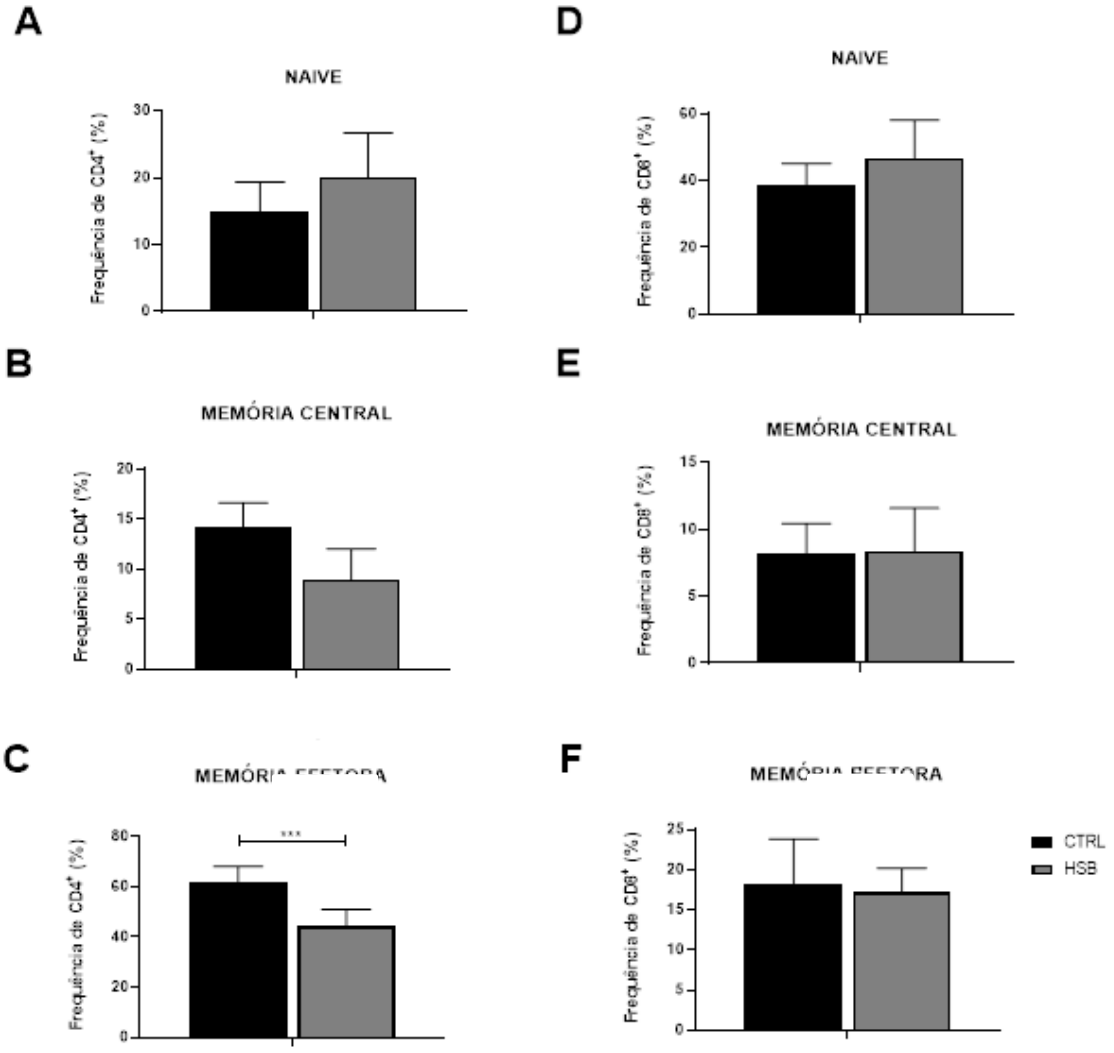

Figura 17. Análise das populações de células T de memória. Dados cumulativos da frequência de células T memória isolados de camundongos C57BL/6 caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (Naive: $CD44^{-}$ $CD62L^{+}$; memória central: $CD44^{+}$ $CD62L^{+}$; e memória efetora: $CD44^{+}$ $CD62L^{-}$ analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001.

6.2.3. OBESIDADE E LEISHMANIOSE VISCERAL DIMINUEM A FREQUÊNCIA DE KLRG1 EM CÉLULAS T $CD4^{+}$ E PD-1 EM CÉLULAS T $CD8^{+}$ DE MEMÓRIA CENTRAL

Avaliamos também a frequência de receptores inibitórios KLRG1 e PD-1 nos subconjuntos de memória. Assim, conforme observado na figura 18, nas populações de memória efetora ($CD44^{+}$ $CD62L^{-}$) das células T $CD4^{+}$ e T $CD8^{+}$. Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle e obesos infectados não apresentaram diferenças nas frequências dos receptores.

Nas populações de memória central (Figura 18 C e D) em T $CD4^{+}$ houve o aumento na frequência de KLRG1 em camundongos controle infectados, comparados aos obesos

infectados, e em T CD8$^+$, camundongos controle infectados apresentaram aumento na frequência de de PD1 quando comparados ao obesos infectados.

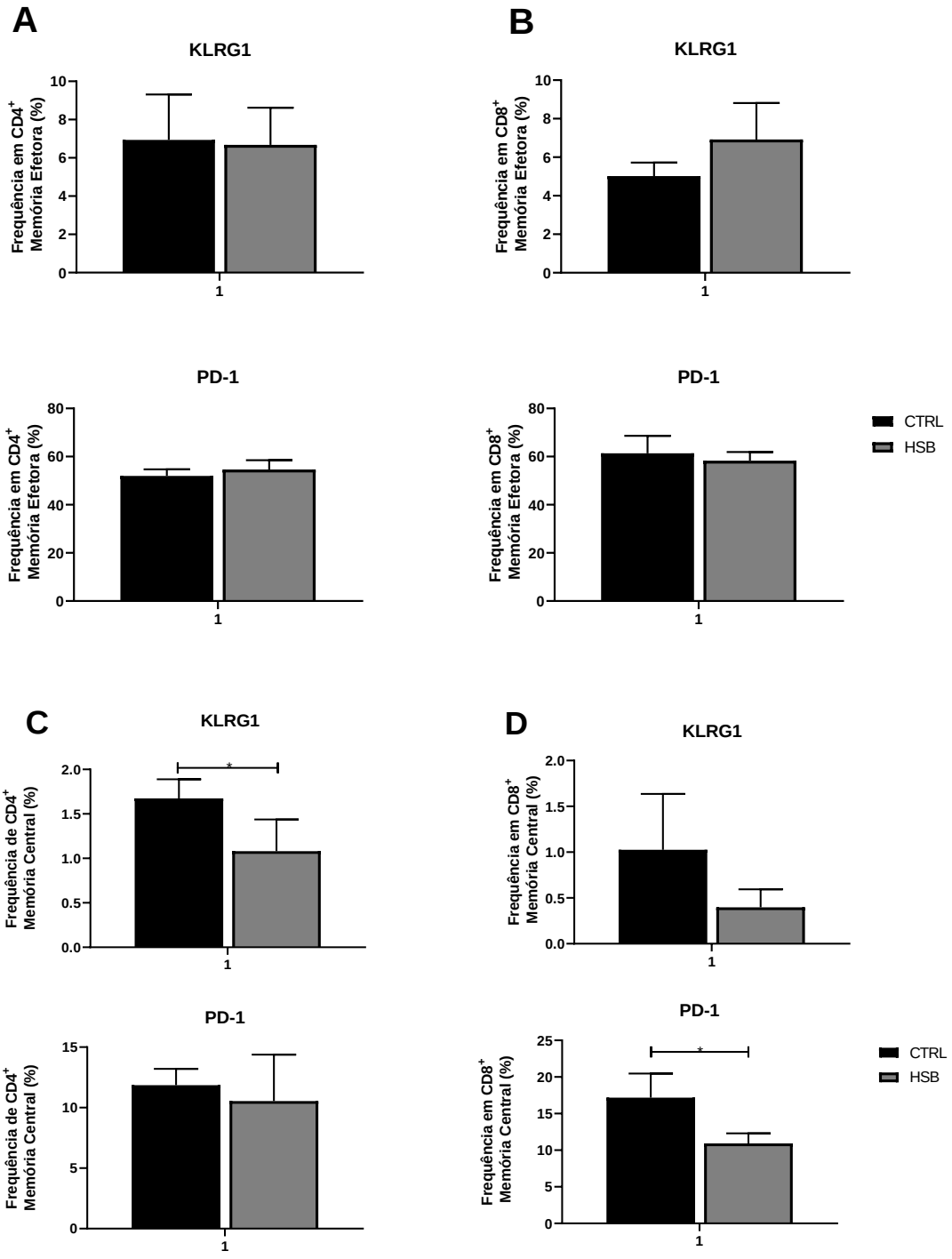

Figura 18. Análise de receptores inibitórios em células T de memória. Dados cumulativos da frequência de células T memória efetora CD4$^+$ (A) CD8$^+$ (B) e de memória central CD4$^+$ (C) CD8$^+$ (D). Células T isolados de camundongos C57BL/6 caracterizados pela expressão de CD44 e CD62L (memória central-CD44$^+$ CD62L$^+$) e memória efetora-CD44$^+$ CD62L$^-$) e estratificados pela expressão de receptores inibitórios (KLRG1, PD1) analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001.

6.2.4. OBESIDADE E INFECÇÃO NÃO MODULAM APOPTOSE DE LINFÓCITOS

É sabido que a persistência da Leishmania no ambiente esplênico provoca a apoptose dos esplenócitos nos animais infectados, assim como quadros de doenças crônicas, como a obesidade. Com o objetivo de avaliarmos se uma dieta indutora de obesidade poderia influenciar na viabilidade celular, efetuamos um ensaio onde se verificou o estado apoptótico de esplenócitos obtidos após o estabelecimento da obesidade e infecção.

A apoptose foi determinada através de citometria de fluxo pela quantificação dos níveis de fosfatidilserina na membrana externa das células apoptóticas. A aplicação da citometria de fluxo, através do uso simultâneo da anexina V conjugada com iodeto de propídio (PI), permite a distinção entre a apoptose e a necrose. A anexina V tem afinidade nanomolar para a fosfatidilserina, e quando conjugada com o FITC permite a quantificação células em apoptose. Por outro lado, a aplicação do iodeto de propídeo permite a marcação das células em que há perda da integridade da membranar, células em necrose, dado que se intercala na dupla cadeia do DNA emitindo fluorescência, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável. Neste sentido, pela exposição simultânea à anexina V e ao IP é possível a discriminação de quatro grupos:

(i) células viáveis, ou seja que não marcadas pela anexina V nem pelo PI;

(ii) células em apoptose inicial, marcadas pela anexina V;

(iii) células em apoptose tardia/necrose, e portanto marcadas pela anexina V, bem como pelo PI;

(iv) e células em necrose, apenas marcadas pelo PI.

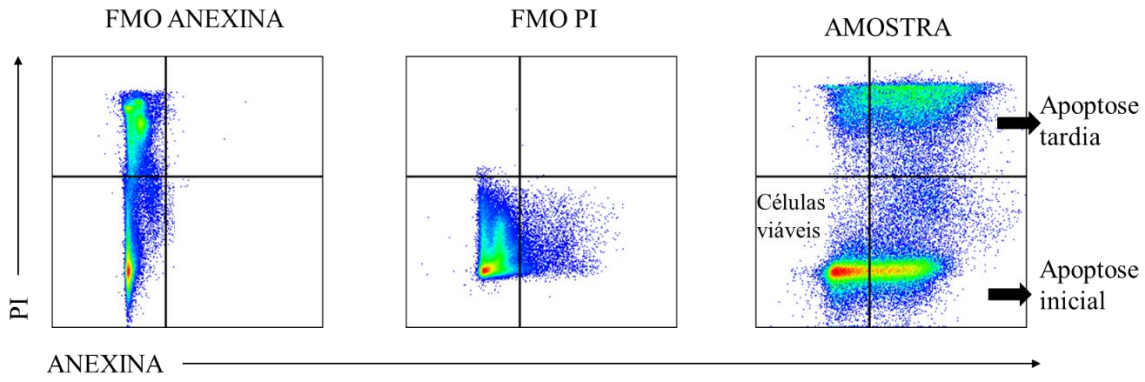

Figura 19. Estratégia de gates para análise de apoptose celular. Esplenócitos (10^6 células) de camundongos C57BL/6 obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI) . As células então foram identificadas pelo tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguido da eliminação de eventos duplos. Com o auxílio do FMO identificou-se o a estratégia adequada para a determinação dos estágios apoptóticos que foram aplicado às amostras.

A dieta indutora de obesidade e a infecção por *L. infantum* não foram capazes de modular a apoptose nos animais estudados (Figura 20). O mesmo padrão de porcentagem foi observado nos grupos controles (dados não mostrados).

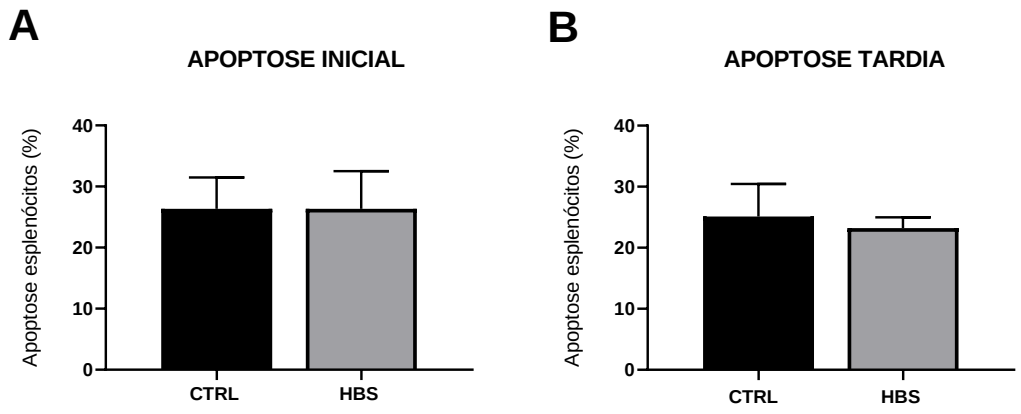

Figura 20. Avaliação de apoptose inicial e tardia em esplenócitos. Esplenócitos (10^6 células) de camundongos C57BL/6 obtidos no dia da eutanásia foram marcados com Anexina V e iodeto de propídio (PI). Em (A) temos a apoptose inicial e em (B) a apoptose tardia. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes.

6.3. DISCUSSÃO

Diversos patógenos usam de estratégias de evasão para escapar da resposta imunológica. Como mecanismos, estes agentes infecciosos podem favorecer uma queda na produção de citocinas pró-inflamtórias como IFN-γ pelas células T $CD4^+$ e $CD8^+$ efetoras e o aumento na produção de citocinas supressoras como TGF-β, IL-10 e IL-4 (ROBERTS *et al.*, 2007). Estas citocinas supressoras são capazes de inibir a resposta pro-inflamatória, levando a um aumento na expressão de receptores inibitórios e regulando de forma negativa a expressão de moléculas coestimuladoras (SIDDIQUI *et al.*, 2014; SEREEJIT *et al.*, 2014) dificultando a ação dos linfócitos T durante o precesso inflamatório (JURADO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2013).

É durante a fase aguda da infecção que as células T são capazes de eliminar o patógeno, levando a formação de células de memória. Estas por sua vez são capazes de responder de forma mais rápida e eficiente a uma reinfecção (WHERRY, 2011). Durante a infecção crônica, por sua vez, a eficiência das células T torna-se menos evidente, e estas células podem sofrer apoptose ou perda progressiva de suas funções efetoras levando a exaustão celular (BLACKBURN *et al.*, 2009). A exaustão celular, por sua vez ocorre em decorrência da

estimulação persistente ou repetidas em ambientes inflamatórios crônicos (CRESPO *et al.*, 2013). No primeiro capítulo do nosso trabalho, notamos o aumento de citocinas pró inflamatórias e óxido nítrico, que seriam suficientes para conter a infecção. Em contrapartida a esses fatores, notamos uma elevada expressão de mediadores que modularam em conjunto esse processo, como citocinas anti-inflamatórias e hiperleptinemia nos órgãos refratários ao patógeno e no tecido adiposo.

Durante o processo infeccioso, vários fatores contribuem para a exaustão das células T, entre eles estão a carga parasitária do hospedeiro, o tempo de infecção, os níveis de células $CD4^+$ e células T reguladoras e o tipo e células apresentadora de antígeno (ANGELOSANTO & WHERRY, 2010). Em infecções virais, a concentração nos níveis do patógeno apresenta uma função importante na exaustão de células T $CD8^+$, e essas células possuem um papel crucial na progressão de doenças crônicas (BETTS *et al*, 2006; WHERRY, 2011). Em infecções parasitárias, a carga parasitária apenas parece não ser capaz de levar ao mecanismo de exaustão celular, sendo, portanto, o somatório dos fatores citados acima, responsáveis por este processo (SNYDER *et al.*, 2008). Tendo estes componentes em vista, fomos avaliar os receptores inibitórios presentes nos animais e sua relação com a susceptibilidade.

Os receptores inibitórios como PD-1 e KLRG-1 são expressos durante a exaustão celular. Estudos experimentais em camundongos mostraram haver um aumento na expressão do receptor coinibitório PD-1 em linfócitos derivados do baço e do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção (GUTIERREZ *et al.*, 2011). Além disso, HOME-DEBETS *et al.*, (2013) demonstraram haver um aumento na coexpressão de PD-1 e LAG-3 em células T $CD4^+$ e uma alta expressão de PD-1 em células T $CD8^+$ de memória efetora, em crianças quenianas quenianas que possuíam histórico de longa exposição ao *Plasmodium falciparum.*

A células de memória podem ser caracterizadas pela sua capacidade de auto renovação e por desempenharem importantes funções efetoras, além disso, possuem habilidade para responder rápida e especificamente a reexposição antigência. Mesmo na ausência do patógeno ou antígeno, essas células são capazes de persistirem durante longos períodos no organismo (SATHALIYAWALA *et al.*, 2013; SAULE *et al.*, 2006). As células de memória podem ser divididas acordo com a perfil de receptores que expressam. As células de memória central (MC) expressam $CD44^+$ $CD62L^+$ e células de memória efetora (ME) $CD44^+$ $CD62L^-$. Estes receptores são capazes de determinar as funções efetoras e localização das células no organismo.

As infecções causadas por *Leishmania infantum* levam a um aumento nos níveis de

diferenciação das células T nas diferentes subpopulação de memória (KAYE et al., 2004). De forma semelhante, os resultados deste trabalho mostraram que durante a leshmaniose visceral experimental, camundongos C57BL/6 infectados que receberam a dieta controle apresentaram um aumento nos níveis de células $TCD4^+$ de memória efetora.

Durante a infecção pelo *Toxoplasma gondii*, as células $TCD8^+$ passam a expressar, além de TIM-3, PD-1. Como consequência, estas células sofrem um aumentam no nível de apoptose e diminuição na resposta secundária a antígenos, perdendo gradativamente sua capacidade polifuncional e tornado-se exausta. O tratamento prolongado com anti-PDL-1 foi capaz de evitar a morte de camundongos C56BL/6 antes suscetíveis à toxoplasmose (BHADRA *et al.*, 2011).

Assim como em outras doenças crônicas, durante a Leishmaniose ocorre um aumento na expressão de PD-1 em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ associado à progressão da doença (ESCH *et al.*, 2013). O processo infeccioso persistente cria um microambinte negativo para a geração de células de memória, como demonstrado durante a infecção murina por *Leishamania major* deficiente em arginina (MOU *et al.*, 2013). Além disso, a expressão destes receptores, em células T $CD8^+$, parece estar associada à suscetibilidade da infecção por *Leishmania donovani* (JOSHI *et al.*, 2009) e também por *Leishmania mexicana* em humanos e camundongos (HERNÁDEZ-RUIZ & BECKER, 2006; LIANG *et al.*, 2006).

Nossos estudos mostraram haver um aumento na expressão dos receptores PD-1 e KLRG-1 em células T CD8 e CD4, respectivamente, de memória central nos animais infectados que receberam a dieta controle. O aumento significativo da expressão de KLRG-1 pode ser relacionado com a progressiva diferenciação das células T, sugerindo que infecções repetidas e persistentes estimulam a expressão deste receptor (ITO *et al.*, 2006; OUYANG *et al.*, 2003a; 2003b; THIMME *et al.*, 2005; VOEHRINGER, KOSCHELLA & PIRCHER, 2002).

Estudos já demonstraram que durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* os níveis de KLRG1 encontram-se elevados e que estes níveis sofreram redução após o tratamento, sugerindo uma coorelação positiva entre a expressão de KLRG1 e a progressão/cronificação da tuberculose (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2011). Além disso, Cyktor *et al.* (2013) demonstraram que camundongos C57BL/6 deficientes em KLRG-1 apresentavam maior sobrevida e diminuição da carga bacteriana durante a fase crônica da doença quando comparados a camundongo selvagens.

A apoptose de células é um mecanismo que favore a permanência do parasito em infecções crônicas. Alguns trabalhos mostraram que, após do bloqueio de IL-10 e B7-H1 (PD-

L1), as taxas de apoptose entre as células T, retiradas de cães infectados, foi significativamente menor no grupo de animais sintomáticos do que no grupo daqueles que não apresentavam sintomas. Esses achados corroboram com a ideia de que, PD-1 é capaz de agir de forma direta, por meio da interação com seu ligante, e indireta através da regulação na produção de IL-10 produzida por monócitos durante a leishmaniose visceral (WHERRY, 2011; ESCH *et al.*, 2013). Apesar do aumento dos receptores inibitórios nas células de memória central, não observamos diferenças entre o perfil de apoptose nos nossos animais, provavelmente por termos outros fatores envolvidos com a permanência da Leishmania nesse microambiente pró inflamatório do animal obeso e infectado.

Através deste estudo pudemos observar que o obesidade impacta na resposta imune à leishmaniose visceral, gerando susceptibilidade e está não pode ser relacionada com receptores inibitórios e compatimentos de memória pesquisados. Os mecanismos que modulam essas doenças crônicas ainda precisam ser intensamente pesquisados e esclarescidos.

6.4. CONCLUSÃO

A susceptibilidade aumentadada nos animais obesos não está relacionada ao aumento da expressão de receptores inibitórios nos compartimentos de células de memória.

7. Capítulo 3

Há muito tempo se aceita que a imunidade ou suscetibilidade a doença depende em certa medida da nutrição. Desequilíbrios nutricionais afetam a capacidade de o hospedeiro produzir resposta inflamatória protetora (CAPÍK, 2010), acarretando prejuízos às defesas imunológicas do mesmo, inclusive à função fagocitária, imunidade mediada por células, sistema complemento, secreção de anticorpos, produção e função de citocinas. O esgotamento de nutrientes antioxidantes promove imunossupressão celular, podendo a desnutrição intensificar a gravidade de infecções e acentuar a sua evolução (MOYNIHAN & PETERSEN, 2006)

A interdependência entre as disciplinas de nutrição e imunologia foi formalmente reconhecida na década de 1970, quando medidas imunológicas foram introduzidas como um componente da avaliação do estado nutricional. O entendimento do efeito dos nutrientes na função imune foi aprimorado à medida que o campo da imunologia cresceu de uma ciência descritiva para uma em que diversos fenômenos imunes podem ser ligados de forma coerente e explicada em termos estruturais e bioquímicos bastante precisos. Hoje, a desnutrição proteíco-calórica (DPC) é citada como a principal causa de imunodeficiência em todo o mundo. Isso não é surpreendente, porque as células imunes têm um alto requisito de energia e aminoácidos para a divisão celular e a síntese de proteínas. A influência da DPC na função imunológica foi extensivamente revisada, porém não é a única ligaçao entre nutrição e imunidade (FIELD; JOHNSON; SCHLEY, 2002; MÉNARD; CERF-BENSUSSAN; HEYMAN, 2010).

Nosso conhecimento dos efeitos da nutrição na função imunológica agora se estende além da deficiência clínica de nutrientes. Um corpo crescente de literatura demonstra os benefícios imunes de aumentar a ingestão de nutrientes específicos, para a manutenção da defesa imunológica do hospedeiro. Um status inadequado de alguns desses nutrientes ocorre em muitas populações do mundo (vitamina A, ferro e zinco), onde as doenças infecciosas são uma grande preocupação para a saúde. Outros nutrientes podem modular especificamente a defesa do hospedeiro contra patógenos (ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, vitamina C, vitamina E, vitamina E, selênio e nucleotídeos) (FUNCTION, 2019; MÉNARD; CERF-BENSUSSAN; HEYMAN, 2010).

Macronutrientes e micronutrientes na dieta são essenciais para manter a função das células imunes. Apesar das evidências convincentes de que os nutrientes podem modular muitos parâmetros da função imune, a ingestão e o status dos nutrientes raramente são considerados ou mesmo descritos na maioria dos estudos sobre a função imune em humanos ou animais. Pode-

se prever que variações na ingestão de nutrientes contribuem para as diferenças nas respostas imunes entre indivíduos e entre estudos. À medida que nossa compreensão do papel de nutrientes específicos na resistência do hospedeiro a doenças infecciosas aumenta, pode-se prever que isso será usado para formular recomendações para alcançar a resposta imune necessária para prevenir e tratar doenças infecciosas específicas na população (MÉNARD; CERF-BENSUSSAN; HEYMAN, 2010).

Embora o requisito de proteína para manter a imunidade seja bem definido e faça parte das recomendações atuais, apenas recentemente os pesquisadores começaram a explorar o uso potencial de aminoácidos alimentares individuais para otimizar a função imunológica. Evidências iniciais sugeriram que os aminoácidos são importantes substratos energéticos para as células imunes e para os mecanismos de defesa antioxidante. Também existem estados críticos de saúde, ou seja, queimaduras, trauma, infecção, alimentação parenteral total, ou períodos de desenvolvimento (ou seja, desmame, gravidez) em que agora é aceito que alguns aminoácidos não essenciais da dieta se tornem condicionalmente essenciais. Isso inclui arginina, glutamina, glutamato, glicina, prolina, taurina e cisteína. Essa mudança na necessidade desses aminoácidos na dieta pode ocorrer em parte devido aos seus efeitos na função imunológica (PAKULA; MAIER; VORUP-JENSEN, 2017).

A nutrição ideal para os melhores resultados imunológicos seria a nutrição, que suporta as funções das células imunes, permitindo que elas iniciem respostas efetivas contra patógenos, mas também resolvam a resposta rapidamente quando necessário e evitem qualquer inflamação crônica subjacente. As demandas do sistema imunológico por energia e nutrientes podem ser atendidas a partir de fontes exógenas, isto é, a dieta, ou se as fontes da dieta são inadequadas, de fontes endógenas, como reservas corporais. Alguns micronutrientes e componentes da dieta têm papéis muito específicos no desenvolvimento e manutenção de um sistema imunológico eficaz ao longo da vida ou na redução da inflamação crônica. Por exemplo, o aminoácido arginina é essencial para a geração de óxido nítrico pelos macrófagos, e os micronutrientes vitamina A e zinco regulam a divisão celular e, portanto, são essenciais para uma resposta proliferativa bem-sucedida no sistema imunológico (SILVEIRA, 2015).

Entende-se bem que a subnutrição prejudica a função imunológica, seja como resultado da escassez de alimentos ou da fome nos países em desenvolvimento ou como resultado da desnutrição decorrente de períodos de hospitalização nos países desenvolvidos. A extensão do comprometimento resultante dependerá da gravidade da deficiência, se há interações com nutrientes a serem consideradas, a presença de infecção e a idade do sujeito. Um único nutriente também pode exercer vários efeitos imunológicos diversos, como no caso da vitamina E, onde

atua como antioxidante, inibidor da atividade da proteína quinase C e potencialmente interagindo com enzimas e proteínas de transporte. Para alguns micronutrientes, a ingestão excessiva também pode estar associada a respostas imunes prejudicadas. Por exemplo, a suplementação com ferro pode aumentar a morbimortalidade daqueles nas regiões endêmicas da malária. Assim como a nutrição tem o potencial de tratar efetivamente deficiências imunológicas relacionadas à ingestão deficiente, existe um grande interesse em pesquisas sobre se intervenções específicas de nutrientes podem melhorar ainda mais a função imunológica em situações subclínicas e, assim, evitar o aparecimento de infecções ou doenças crônicas. doenças inflamatórias (CALDER; JACKSON, 2000; LEE; HAN, 2018).

A deficiência ou excesso de aminoácidos (AAs) e metabólitos de AA pode influenciar a função e o desenvolvimento do sistema imunológico. Mesmo um déficit moderado de AA pode levar à imunodeficiência. Por outro lado, vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* indicam que concentrações elevadas de alguns AAs levam a alterações na resposta imune, em muitos casos com resultado imunossupressor. Essas observações sugerem claramente que a biodisponibilidade do AA pode representar um alvo terapêutico para modular as respostas imunes. Tais terapias são amplamente procuradas no combate a doenças inflamatórias graves e prevalentes, incluindo artrite e esclerose múltipla. Além disso, algumas doenças relacionadas ao câncer parecem envolver um componente inflamatório. No entanto, o desenvolvimento de terapias eficazes para essas doenças, particularmente a nova geração de medicamentos biológicos, não tem sido um sucesso absoluto. Muitos pacientes experimentam efeitos colaterais significativos. Como os efeitos dos AA no sistema imunológico são melhor compreendidos, é tentador sugerir que esses agentes onipresentes possam ser usados como ferramentas valiosas para mitigar as respostas inflamatórias causadoras de doenças (CALDER; JACKSON, 2000; PAKULA; MAIER; VORUP-JENSEN, 2017).

Da Silva Menezes e colaboradores (2003) desmontaram que camundongos nos quais as proteínas da dieta foram substituídas por quantidades equivalentes de aminoácidos desde o desmame apresentavam alterações locais e sistêmicas em seus sistemas imunológicos. Os animais possuem um tecido linfoide associado ao intestino mal desenvolvido, semelhante a camundongos lactentes. Também exibem baixo número de células da lâmina própria e linfócitos intraepiteliais, e a produção de Imunoglobulina A secretada (IgAs), assim como IgG e IgA circulantes são prejudicados. Além disso, a secreção de citocinas por células isoladas de diferentes órgãos linfoides apresenta um perfil Th2, com alta concentração de IL-10 e IL-4 e baixa concentração de IFN-ɣ, similar aos camundongos recém desmamados.

Em outro trabalho, foi avaliada a importância dos antígenos alimentares no início da

vida para o desenvolvimento da imunidade contra microrganismos intracelulares, a *L. major*. Camundongos C57BL / 6 alimentados com aminoácidos, que são geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, apresentaram maiores lesões nas patas e alto número de parasitas. Foi encontrado níveis mais baixos de IFN-ɣ e NO, sugerindo que a capacidade desses camundongos para matar o parasita também foi prejudicada. A análise de APCs (células dendríticas e macrófagos) revelou níveis deficientes de moléculas co-estimulatórias (CD40 e CD80), produção reduzida de IL-12p70 por macrófagos e baixa capacidade de APCs para estimular uma resposta de células T. Esse perfil, que é consistente com um fenótipo imaturo de APCs, está associado a uma capacidade deficiente de montar uma resposta imune Th1 a *L. major*. Além disso, o estudo analisou a microbiota do conteúdo intestinal dos animais, demonstrando que não há alteração no número de bactérias intestinais que possa ser responsável pela imaturidade dos camundongos alimentados com aminoácidos (AMARAL et al., 2010b).

Diante dos dados existentes e considerando os componentes da dieta um importante fator para a imunidade do hospedeiro, avaliamos neste capitulo os efeitos de uma dieta à base de aminoácidos em camundongos C57BL/6 durante a infecção por *L. infantum*.

7.1. RESULTADOS

7.1.1. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA SÃO SUSCETÍVEIS À INFECÇÃO POR *L. infantum*

É sabido que a maturação imunológica é necessária para a montagem de uma resposta imunológica eficiente a infecções, portanto, investigamos o papel da proteína na dieta no desenvolvimento da imunidade ao protozoário *L. infantum*. Camundongos C57BL/6, que são suscetíveis à infecção por *L. infantum*, foram alimentados com uma dieta à base de aminoácidos desde o desmame até 8 semanas de idade, quando então foram infectados por veia caudal com 1 x 10^7 promastigotas de leishmania em fase estacionária. O pico de parasitismo já havia sido padronizado por nosso grupo, e se quatro semanas após a infecção. Os animais foram monitorados semanalmente durante todo o experimento com objetivo de avaliar o ganho de massa corporal e os valores relativos à ingestão média semanal das dietas.

Como mostrado na tabela 9, camundongos alimentados com dieta a base de aminoácidos não apresentaram diferenças em relação à massa corporal ao final do experimento, mesmo com a infecção. Os animais também não apresentaram diferenças significativas em relação ao

consumo das dietas fornecidas.

Após o fim do experimento, baço, fígado e timo foram recolhidos e mensurados para a comparação entre os grupos. Em relação ao timo, que é um órgão linfoide primário importante para a maturação funcional dos linfócitos T, observamos uma diferença significativa nos animais controles infectados, em relação aos animais sem infecção. Os animais alimentados com a dieta a base de aminoácidos apresentaram valores similares ao do grupo controle, mesmo naqueles animais que foram infectados.

Baço e fígado são orgãos de predileção para o parasitismo de *L. infantum*. No fígado não observamos alteração da massa entre os grupos, porém o baço dos camundongos que receberam a dieta à base de aminoácidos, notamos um aumento significativo da massa do orgão em relação ao grupo controle.

Tabela 9. Parâmetros fisiológicos de camundongos alimentados com dietas CTRL e AA.

	CTRL	**AA**	**CTRL-I**	**AA-I**
Massa corporal final (g)	22,28 ± 2,03	23,15 ± 0,72	21,63 ± 0,33	23,38 ± 1,41
Consumo de dietas (g/semana/animal)	21,7 ± 0,45	22,4 ± 0,33	21,3 ± 0,53	22,7 ± 0,48
Fígado (g)	1,187 ± 0,18	0,986 ± 0,11	1,211 ± 0,16	1,224 ± 0,19
Baço (g)	0,273 ± 0,03	0,349 ± 0,02	0,342 ± 0,05	0,425 ± 0,06*
Timo (g)	0,066 ± 0,01	0,070 ± 0,00	0,089 ± 0,01*	0,068 ± 0,01

Os valores são expressos como média ± S.D. Os dados foram comparados pelo ANOVA de duas vias, sendo aplicado o teste de Tukey para comparação das média. $p < 0,05$ (*).

Ainda investigando baço e fígado, avaliamos a carga parasitária entre os animais infectados. O número de parasitas encontrado nos camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos apresentou um aumento significativamente em relação aos camundongos que receberam a dieta controle. Esses resultados sugerem que camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta à base de aminoácidos são mais suscetíveis à infecção por *L. infantum* que os camundongos controle.

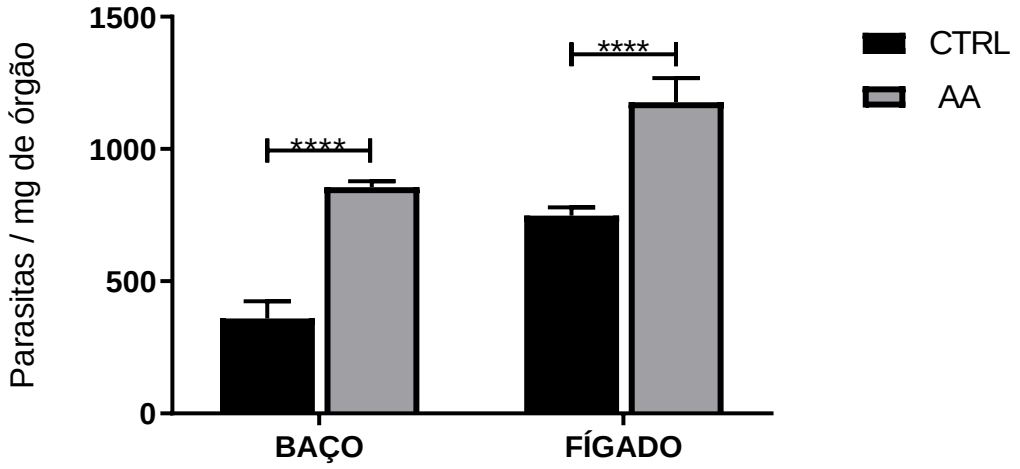

Figura 21. Susceptibilidade a *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos (AA). Os camundongos C57BL / 6 alimentados com dietas controle (CTRL) e AA desde o desmame até 8 semanas de idade, foram inoculados por veia caudal com 1 x 10^7 promastigotas de *L. infantum.* A carga de parasitas / mg de tecido foi individualmente medida em baço e fígado quatro semanas após a infecção pelo método de diluição limitante. Os resultados são representados como médias aritméticas ± S.D. de três experimentos independentes. p <0,0001 (****).

7.1.2. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM ALTERAÇÕES NO PERFIL INFLAMATÓRIO APÓS INFECÇÃO POR *L. infantum*

A fim de avaliar parâmetros imunológicos envolvidos com as possíveis diferenças encontradas no parasitismo do baço e fígado, avaliamos a produção *in situ* das citocinas IFN-γ, IL-10 e IL-4, bem como a produção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes do macerado dos órgãos. Conforme observado na figura x, camundongos C57BL / 6 alimentados com dietas controle infectados apresentaram aumento na produção de IFN-γ quando comparado aos demais grupos. O mesmo padrão de produção de IFN-γ foi observado no fígado dos animais.

Além disso os animais alimentados com dieta à base de aminoácidos infectados produziram significativamente mais IL-4 no fígado, quando comparados aos animais controle infectados (Figura 22). Para IL-4 produzida no baço, não observamos diferenças.

Observando a produção de IL-10 no baço, notamos que camundongos alimentados com dieta à base de aminoácidos infectados produziram significativamente menos do que animais controle infectados (Figura 22).

Ademais, os animais alimentados com dieta à base de aminoácidos infectados produziram significativamente mais óxido nítrico (NO) no baço do que os demais grupos (Figura 22). O mesmo não pode ser observado no fígado.

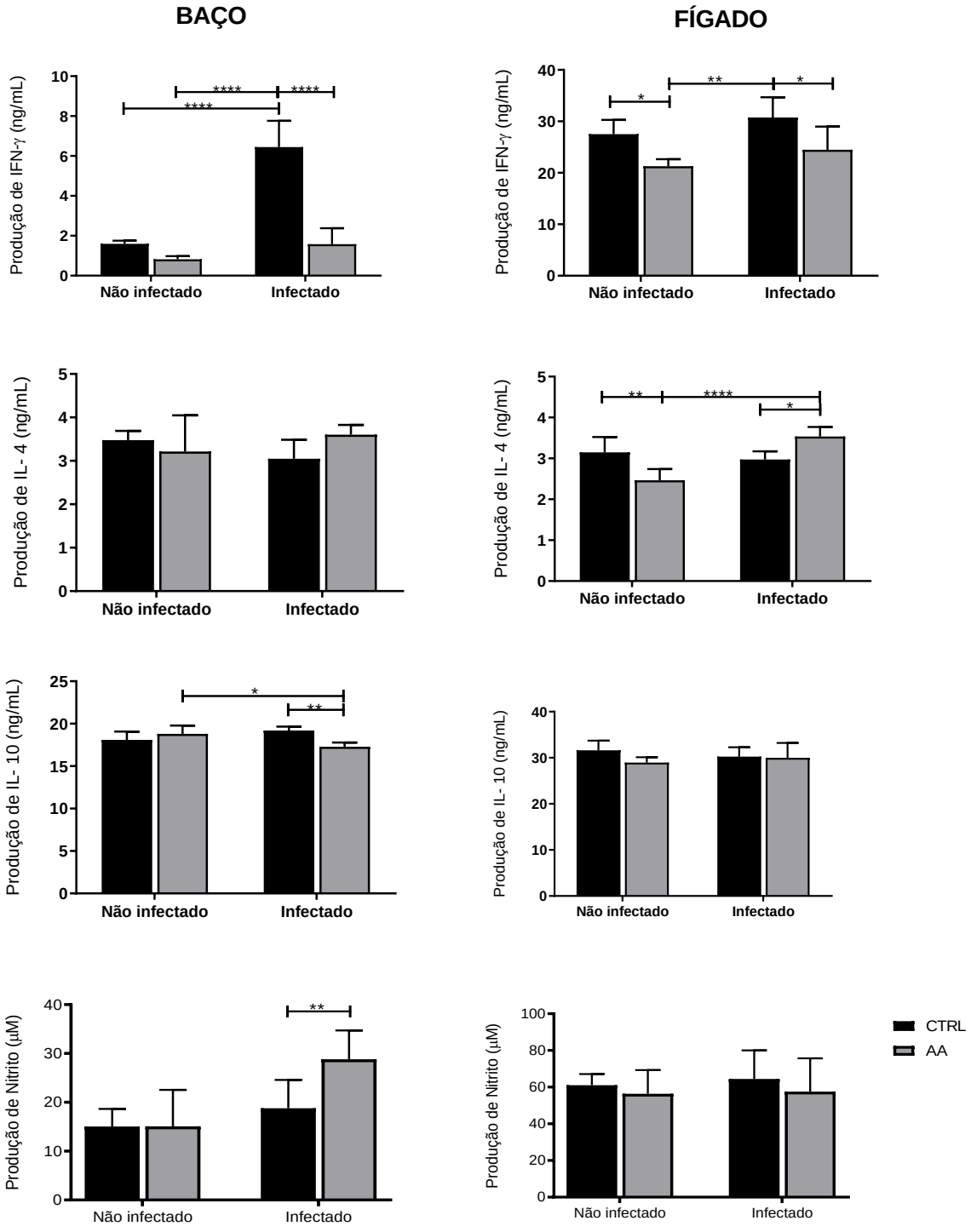

Figura 22. Efeito da dieta dieta à base de aminoácidos (AA) e infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 na produção de citocinas e óxido nítrico *in situ.* Baço e fígado de camundongos C57BL / 6 alimentados com dietas controle (CTRL) ou AA e infectados, processados quatro semanas após a infecção. A avaliação *in situ* de IFN-γ (A e E), IL-10 (B e F) e IL-4 (C e G) foram realizadas por ELISA. A produção de oxido nítrico (D e H) foi avaliada por método de Griess. O resultado representa a média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01; ***p<0.001; ****p < 0.0001.

7.1.3. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM MENOR FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T E MACRÓFAGOS APÓS INFECÇÃO POR *L. infantum*

Durante infecções é de suma importância o papel desempenhado por célular T naive e células apresentadoras de antígenos (APCs) para a montagem da resposta imunológica celular e então o desfecho frente ao patógeno. Diante disso, investigamos o perfil das células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ presente no baço dos animais. Em relação à APCs, avaliamos a presença de macrófagos, que foram caracterizadas pela expressão de $F4/80^+$ $CD11b^+$. As moléculas co-estimulatórias são necessárias nesse procecsso de ativação de células T naive em resposta à patógenos, como *L. infantum,* portanto avaliamos a expressão de CD86 nos macrófagos dos animais.

Análises por citometria de fluxo da população de células T nos mostram maior quantidade de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ nos animais que receberam a dieta controle e infecção, em relação aos demais grupos tratados. Quando avaliamos a população de macrófagos ($F4/80^+$ $CD11b^+$) do baço dos camundongos, percebemos que os animais que receberam a dieta controle e infecção apresentavam a maior frequência dessas células em relação aos demais grupos.

Durante a avaliação da molécula co-estimulatória CD86 em células $F4/80^+$ $CD11b^+$, notamos que os animais que receberam a dieta controle e não foram infectados durante o experimento apresentaram maior frequência de CD86 em relação aos demais grupos.

Esses resultados, portanto, sugerem que as proteínas alimentares são importantes para o processo maturação de APCs e de seus co-estímulos.

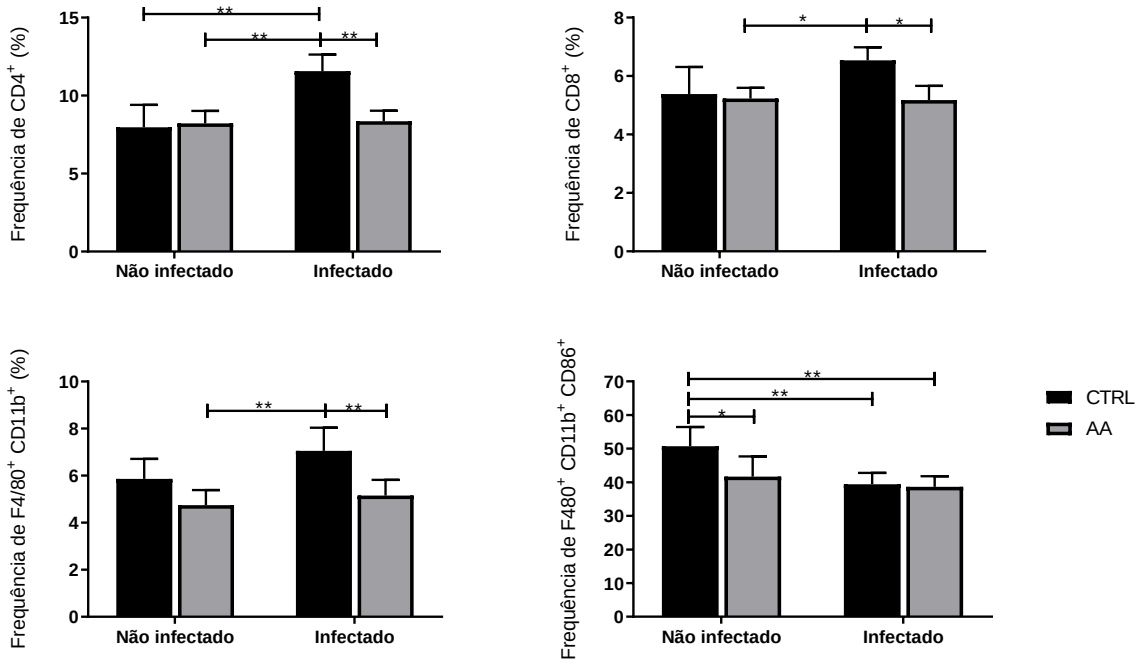

Figura 23. Análise ex vivo da frequência de linfócitos T e macrófagos durante a infecção por *L.infantum*. Efeito da dieta dieta à base de aminoácidos (AA) e infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 na frequência de linfócitos T e macrófagos.. Células T CD4+ e T CD8+ foram isolados de esplenócitos de camundongo C57BL / 6 alimentados com dietas controle (CTRL) e dieta a base de aminoácidos (AA) e infectados foram processados quatro semanas após a infecção por *L.infantum.* A população F4/80$^+$ CD11b$^+$ (macrófagos) foi isolada e a molécula co-estimulatória CD86 pode ser quantificada nessas células. Os dados foram analisados por citometria. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. *p < 0.05, **p < 0.01.

7.1.4. CAMUNDONGOS C57BL/6 ALIMENTADOS COM UMA DIETA COM AMINOÁCIDOS COMO FONTE DE PROTEÍNA APRESENTAM MENOR RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA APÓS INFECÇÃO POR *L. infantum*

Para a avaliação dos efeitos da dieta à base de aminoácidos e a leishmaniose experimental sobre a capacidade linfoproliferativa de esplenócitos, essas células foram estimuladas *in vitro* com antígenos do parasito. Podemos notar na figura 24 que os animais que receberam a dieta à base de aminoácidos e infectados com *L. infantum* apresentaram reduzida porcentagem de proliferação quando comparados ao grupo controle.

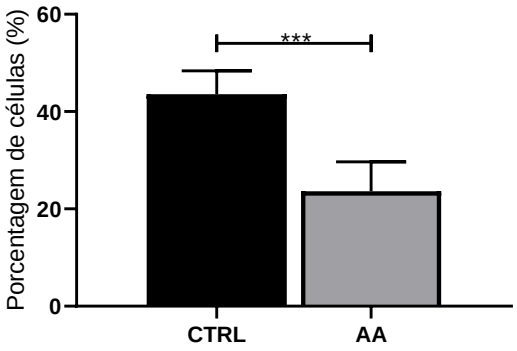

Figura 24. Efeito da infecção por *L. infantum* em camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos (AA) na resposta linfoproliferativa. Esplenócitos de camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta AA ou controle (CTRL) infectados foram coletados após a eutanásia, marcados com CFSE e reestimulados *in vitro* com 20 μg/mL de LiAg por 72 horas. A resposta linfoproliferativa foi determinada por citometria de fluxo e expressando a porcentagem de células proliferadas. Resultados acumulativos representados como média ± S.D de três experimentos independentes. ***p < 0,001.

7.2. DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença geralmente caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em locais onde há migração em larga escala de populações. A alta prevalência nessas populações é resultado não apenas de fatores genéticos, mas também ambientais. Ao longo dos anos o que se observou foi a influência de deficiências nutricionais, gerando quadros de desnutrição, relacionados ao aumento dos casos e agravamento da doença na população atingida. Não menos importante é o fato da população pediátrica ser a maior causa de óbitos por complicações advindas do não tratamento da leishmaniose visceral. Nos dois nichos populacionais citados acima, o sistema imunológico apresenta-se imaturo, e talvez seja esse o motivo da dificuldade em controlar a infecção pelo protozoário (ALVAR et al., 2012).

No presente estudo mostramos que a composição alimentar de dietas é importante no início da vida para o desenvolvimento da imunidade contra *L. infantum.* Sabe-se há muito que uma deficiência de proteínas ou aminoácidos na dieta prejudica a função imunológica e aumenta a suscetibilidade de animais e humanos a doenças infecciosas. Em relação à suscetibilidade aumentada dos neonatos a infecções em geral, tem sido atribuída à imaturidade de seu sistema imunológico e, mais especificamente, às condições particulares de apresentação de antígenos a células T (MALAFAIA et al., 2009).

Demonstramos que camundongos C57BL/ 6 alimentados com dieta à base de aminoácidos apresentaram elevado número de protozoários em baço e fígado, comparados ao grupo controle. No trabalho de Amaral e colaboradores (2010), foi demonstrado que a

administração de uma dieta à base de aminoácidos como fonte de proteínas após o desmame resultou em um controle ineficiente da infecção por *Leishmania major* em camundongos adultos C57BL / 6 (AMARAL et al., 2010a). O modelo de infecção com C57BL / 6 e *L. major*, em dietas normais, é de resistência à infecção. O papel das dietas e seus componentes no desenvolvimento de um sistema imunológico competente e resistência a infecções necessita ser mais esclarecido.

Existem estudos relatando uma diminuição na resposta imune de camundongos BALB / c com desnutrição proteína-calórica à vacinação contra *Leishmania infantum.* Outros grupos confirmam a influência da desnutrição protéica nas respostas imunes efetivas para conter a infecção por *Leishmania* (MALAFAIA et al., 2009; SERAFIM et al., 2010). Esses autores usaram uma dieta com apenas 3% de proteína e os animais apresentaram todos os sinais de desnutrição. Em nosso modelo, assim como a Amaral e colaboradores (2010), as proteínas alimentares não foram simplesmente removidas ou reduzidas; elas foram substituídos por quantidades equivalentes de aminoácidos. O estado nutricional dos animais alimentados com a dieta a base de aminoácidos foi considerado normal quando determinado usando vários parâmetros nutricionais: níveis séricos de proteína e albumina, contagem de células sanguíneas, aparência e comportamento dos pelos (AMARAL et al., 2010). Em nosso trabalho os animais foram acompanhados semanalmente quanto à sua massa corporal, consumo alimentar, aparência e comportamento dos pelos; não apresentando diferenças entre os grupos. Atribuímos, portanto, as mudanças que encontramos ao efeito estimulatório direto da composição da dieta no sistema imunológico, e não ao impacto indireto da desnutrição.

Ao avaliarmos o perfil inflamatório encontramos níveis mais baixos de IFN-ɣ em baço e fígado de animais infectados que foram alimentados com a dieta à base de aminoácidos. Isso nos faz avaliar justamente a capacidade desses camundongos em eliminar o parasito, que se apresenta prejudicada. O IFN-γ secretado por células Th1 e / ou células NK, atua nos macrófagos infectados, levando à sua ativação, à regulação positiva da iNOS e à produção de óxido nítrico e outros radicais livres que são importantes para a morte intracelular de parasitas. Em relação ao óxido nítrico, no baço observamos uma produção de NO significativa nos animais alimentados com dieta à base de aminoácidos e infectados, porém não foi suficiente para conter a proliferação dos parasitos no órgão, como pode ser comprovado na avaliação da carga parasitária.

A IL-10 é uma citocina envolvida no controle de IFN-γ, modulando negativamente sua produção e as reações inflamatórias em infecções por muitos parasitos, incluindo Leishmania. Notamos que esta citocina não foi produzida de forma expressiva pelos animais alimentados

com a dieta a base de aminoácidos. Já a citocina IL-4, importante para a manutenção da infecção e suscetibilidade à Leishmania, foi produzida em maior quantidade no fígado dos animais que receberam a dieta à base de aminoácidos, corroborando a carga parasitária apresentada por esses animais.

Os mecanismos necessários à diferenciação das respostas imunológicas pró inflamatórias são complexos e envolvem células e moléculas acessórias. A contribuição de APCs maduras nesta situação é evidente. APCs imaturos, como os encontrados em neonatos, mostram pouco ou nenhum aumento na expressão de co-estimulação marcadores como CD40, CD80, CD86 e Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Essas células produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias , o que auxilia na manutenção de infecções (MOSER; LEO, 2010).

Analisando as células T presentes no macerado do baço dos animais, notamos que células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ estavam em menor número nesse órgão nos animais que receberam a dieta a base de aminoácidos durante a experimentação. Diante disso, avaliamos também os macrófagos, células $F4/80^+$ $CD11b^+$, e a molécula co-estimulatória CD86 nessas células. Notamos que nos animais alimentados com a dieta a base de aminoácidos a quantidade de células APC - macrófagos era menor em relação ao grupo controle, bem como a expressão de CD86 por essas células, o que demonstra uma baixa capacidade destas células APCs para estimular uma resposta das células T, seja pelo número significantemente menor, seja pela menor expressão de móleculas de co-estímulo, como CD86.

No trabalho de Amaral e colaboradores (2010), ao avaliar os macrófagos de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta à base de aminoácidos notou-se que estes não foram capazes de induzir a polarização Th1 em resposta ao patógeno *L. major*, necessária para sua eliminação. A este fato atribuiu-se provavelmente a deficiência no processo de maturação das APCs, já que houve falta de estimulação externa normalmente fornecida por antígenos protéicos na dieta durante o desenvolvimento. Em outro trabalho com um modelo experimental de leishmaniose visceral, os pesquisadores observaram que após a desnutrição protéico calórica, o aumento da carga parasitária medida no baço desses camundongos coincidiu com o aumento da atividade da arginase e que os macrófagos fornecem um ambiente mais permissivo para o crescimento do parasita e contribuem para o aumento da susceptibilidade (CORWARE et al., 2014).

Depois de avaliarmos a frequência das células T e APC, fomos avaliar a proliferação celular nos esplenócitos dos animais. Observamos uma reduzida proliferação nos animais infectados com *L. infantum* que receberam a dieta à base de aminoácidos quando comparados ao grupo controle. Um quadro similar foi observado num trabalho com hamsters infectados com *L. infantum* alimentados com dieta com pouca proteína, no qual houve comprometimento da

linfoproliferação e aumento significativo da carga parasitária esplênica (CARRILLO et al., 2014).

7.3. CONCLUSÃO

A dieta é um importante fator que influencia a função e o desenvolvimento do sistema imunológico. A dieta à base de aminoácidos propiciou susceptibilidade a *L. infantum* em camundongos C57BL/6.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular.

ADEKAMBI, T. et al. Distinct effector memory $CD4^+$ T cell signatures in latent *Mycobacterium tuberculosis infection*, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. PLoS One, 7: e36046, 2012.

AKBAR, A. N.; FLETCHER, J. M. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. Curr. Opin. Immunol. v. 17 , p. 480–485, 2005.

AKBAR, A. N.; HENSON, S. M. KLRG1- more than a marker for T cell senescence. Age. v. 31, 2009.

AKDIS, M. et al. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) $CD8^+$ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. J Immunol., 163:466-475, 1999.

ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory $CD8^+$ T cells in chronic Chagas' disease patients. Int Immunol., 18 (3): 465-471, 2006.

ALENCAR, J. E; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: . VERONEZI, R.

ALMANZAR, G. S. et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the $CD8^+$ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. J. Virol., 79: 3675-3683, 2005.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS one, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.

ALVAREZ, I. B. *et al*. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases. v. 202, n. 4, p. 524-532, 2010.

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, mar. 2010a.

ANGELOSANTO, J. M.; WHERRY, E. J. Transcription factor regulation of CD8+ – T cell memory and exhaustion. Immunol. Rev., 236: 167–175, 2010**.**

ANTINORI, S., SCHIFANELLA, L., COBERLLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.,3 31 (2): 109-118, 2012.

ANTONELLI, L. R. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. Immunol Lett., 101 (2): 226-230, 2005.

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.

ANTROBUS, R. D. et al. Virus-specific cytotoxic T lymphocytes differentially express cell-surface leukocyte immunoglobulin-like receptor-1, an inhibitory receptor for class I major histocompatibility complex molecules. J Infect Dis., 191: 1842-1853, 2005.

ARAUJO-MELO, M. et al. Risk factors associated with dizziness during treatment of mucosal leishmaniasis with meglumine antimoniate: 16-year retrospective study of cases from Rio de Janeiro, Brazil. J Laryngol Otol, 124: 1056–1060, 2010.

ARGÜELLO, R. J. *et al*. Inhibitory receptors are expressed by *Trypanosoma cruzi*-specific effector T cells and in hearts of subjects with chronic Chagas disease. PLoS ONE. v. 7, n. 5, e35966, 2012.

ARGÜELLO, R. J. *et al*. Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. PLoS Neglected Tropical Diseases. v.8, n. 8, 2014.

ASHUTOSH, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. J Med Microbiol., 2:143-53, 2007.

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.

BACERLLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infect Immun., 70: 6734-6740, 2002.

BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. J Med Chem., 52 (8): 2603-

2612, 2009.
BAITSCH, S. A. et al. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. Trends in Immunology, 33(7): 364-372, 2012.
BANDARU, A. et al. Phosphorylated STAT3 and PD-1 regulate IL-17 production and IL-23 receptor expression in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Eur J Immunol., 44: 2013-2024, 2014.
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.
BASU, M. K.; RAY M. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. Crit Rev Microbiol., 31: 145-154, 2005.
BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol., 37: 1097–1106, 2007
BAVIK, C. et al. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. Cancer Res., 2006, 66: 794-802, 2006.
BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania-host interactions: what has imaging taught Us? Cell Microbiol., 11:1659-1667, 2011.
BELLON, M.; NICOT, C. Telomere Dynamicis in Immune Senescence and exhaustation triggered by chronic viral infection. Viruses, 5: 9-10, 2017.
BEST, J. A. et al. Transcriptional insights into the CD8+ T cell response to infection and memory T cell formation. Nat Immonol., 14 (4): 404-412, 2013
BETTS, M. R. et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific $CD8^+$ T cells. Blood, 107: 4781-4789, 2006.
BHADRA, R. et al. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional $CD8^+$ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. Proceedings of the National Academy of Science, 108: 9196-9201, 2011.
BIN W. et al. Upregulated expression of Tim-3 involved in the process of toxoplasmic encephalitis in mouse model. Parasitol Res., 12:2511–2521, 2003.
BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. FEBS Lett., 579: 859-862, 2005.
BLACKBURN, S. D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat. Immunol., 10: 29-37, 2009.
BLACKBURNS, S.D.; WHERRY, E. J. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence.Trends Microbiol., 15: 143-146, 2007.
BOAVENTURA, V. S. et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg., 75: 267-269, 2006.
BORAM CHOI, C. et al. Differential expression of CD57 in 2 antigen-reactive $CD4^+$ T cells between active 3 and latent tuberculosis infection. Clin Immunol., 159 (1): 37-46, 2015.
BORTHWICK, N. J. et al. Loss of CD28 expression on $CD8^+$ T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation induced apoptosis; Int. Immunol., 12: 1005-1013, 2000.
BOURREAU, E. et al. IL-10 producing $CD8^+$ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. Microbes Infect., 9:1034-1041, 2007.
BOURREAU, E. et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intra lesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. J. Infect. Dis., 199: 576-579, 2009.
BOUSOFFARA, T. et al. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of Leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis., 189 (7): 1265-1273, 2004.
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. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação: Espírito Santo. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
BRENCHLEY, J. M. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of $CD8^+$ T cells. Blood 101(7): 2711–2720, 2003.
BRODSKYN, C. I. et al. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. J Immunol., 159: 4467-4473, 1997.
BROERE, F. et al. A2 Tcell subsets and Tcell-mediate dimmunity. Principles of Immuno pharmacology,

15-27, 2011.
BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L- arginine metabolism. Nature reviews. Immunology, v. 5, n. 8, p. 641–54, 2005.
BROWNW, D. C & GATTE, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology, 17: 489-503, 1990.
BRUNS, H. C. et al. Anti-TNF immunotherapy reduces $CD8^+$ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. J Clin Invest., 119 (5): 1167-77, 2009.
BUFFET, P. A. *et al*. Culture microtitration: A sensitive method for quantifying *Leishmania infantum*
BURNS, E. A.; GOODWIN, J. S. Immunodeficiency of aging. Drugs Aging, 11(5): 374-397, 1997.
BURTON, D. G. A.; FARAGHE, R. G. A. Cellular senescence: from growth arrest to immunogenic conversion. Age. v. 37, n. 27, 2015.
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.
CALDER, P. C.; JACKSON, A. A. Undernutrition , infection and immune function. v. 44, n. 2000, 2000.
CAMPANELLI, A. P. et al. $CD4^+CD25^+$ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. J Infect Dis., 193: 1313-1322, 2006.
CAMPISI, J. et al. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? Semin Cancer Biol., 21: 354-359, 2011.
CAMPISI, J.; D'ADDA di FAGAGNA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8: 729–740, 2007.
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.
CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of $CD8^+$ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. Infect Immun., 83 (3): 898-906, 2015.
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.
CARRILLO, E. et al. Protein Malnutrition Impairs the Immune Response and Influences the Severity of Infection in a Hamster Model of Chronic Visceral Leishmaniasis. v. 9, n. 2, 2014.
CARVALHO, A. M. et al. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. BMC Infect Dis., 13: 529, 2013.
CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop., 56 (4): 315–325, 1994.
CARVALHO, L. P. O et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. Parasite Immunol., 9:251-258, 2007.
CEBRIAN, M. et al. Three different antigen specificities within the leucocyte common antigen or T200 complex: A biochemical, cell distribution and functional comparative study. In McMICHAEL, A. J. et al. (Eds.) typing III, Oxford University Press, p. 823.
CECÍLIO, P. *et al*. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite.
CEYHAN, A. M. et al. A case of erysipeloid cutaneous leishmaniasis: atypical and unusual clinical variant. Am J Trop Med Hyg., 78 (3): 406-408, 2008.
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.
CHEN, S. et al. Diminished immune response to vaccinations in obesity: Role of myeloid-derived suppressor and other myeloid cells. Obesity Research and Clinical Practice, 2015.
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.
CHIDRAWAR, S. et al. Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. Clin. Exp. Immunol., 155: 423-432, 2009.
CHONG, L. K. et al. Proliferation and interleukin 5 production by $CD8^{hi}$ $CD57^+$ T cells. Eur J Immunol.,

38(4): 995–1000, 2008.
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.
COMBADIERE, B. et al. Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN-gamma-producing T cell memory to smallpox in humans. J Exp Med., 199 (11): 1585-1593, 2004.
CONCEIÇÃO-SILVA, F. et al. Quantitative study of *Leishmania (braziliensis) braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol., 79: 221-226, 1990.
COOK, J. M. et al. Alterations in the human immune response to the hepatitis B vaccine among the elderly. Cell Immunol., 109:89-96, 1987.
COPPE, J. P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell non autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol., 6: 2853-2868, 2008.
CORWARE, K. et al. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. p. 1–10, 2014.
COSSARIZZA, A. et al. CD45 isoforms expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. Mech. Ageing Dev., 86: 173-195, 1996.
COSTA, J. M. et al; Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. J Trop Med Hyg., 89(6): 319-323, 1986.
COSTA, P. A. et al. Induction of Inhibitory Receptors on T Cells During Plasmodium vivax Malaria Impairs Cytokine Production. J Infect Dis., 212:1999-2010, 2015.
COSTA, R. P. et al. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of $CD4^+$ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. Immunol Lett., 90:155-159, 2003.
CRESPO, J. et al. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. Current Opinion in Immunology, 25(2): 214–221, 2013.
CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol., 29: 621-663, 2011.
CUBAS, R. A. et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection.
CURIEL, T. J. et al. Blockade of B7-H1improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. Nature Medicine, 9(5): 562-567, 2003.
Current opinion in hematology, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.
CYKTOR, J. C. et al. Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 Deficiency Significantly EnhancesSurvival after Mycobacterium tuberculosis Infection. Infec Immun., 81(4): 1090-1099.
D'OLIVEIRA JR, A. et al. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop., 35(1): 7-10, 2002.
DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol. Therapy, 22(6): 491-502.
DAVIS, M. M. Not-so-negative selection. Immunity, 43 (5): 833-5, 2015.
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 LA FUENTE, M.; M. DE CASTRO, N. Obesity as a Model of Premature Immunosenescence. Current Immunology Reviews, v. 8, n. 1, p. 63–75, 2012.
DE LORENZO, A. *et al*. Normal-weight obese syndrome: Early inflammation? American journal of clinical nutrition, v. 85, p. 40–45, 2007.
DE OLIVEIRA GOMES, D. C. et al. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. Parasitology, v. 139, n. 12, p. 1562–1569, 2012.
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.
DI MITRI, R. I. et al. Reversible senescence in human $CD4^+CD45RA^+CD27^-$ memory T cells. J. Immunol., 187: 2093–2100, 2011.
Diabetes, v. 52, p. 942–947. 2003.
DIMIER-DAVID, L. et al. Epidemiological, clinical and biological features of mucocutaneous

leishmaniasis in Bolivia after a 221 patient sample. Bull Soc Pathol Exot., 6: 106-111, 1993.
DINIZ, D. S., COSTA, A. S., ESCALDA, P. M. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares, State of Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop., 45: 597-600, 2012.
DUNNE, P. J. et al. Epstein-Barr virus-specific $CD8^+$ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. Blood, 100(3): 933-940, 2002.
EFFROS, R. B., CAI, Z., LINTON, P. J. CD8 T cells and aging. Crit. Rev. Immunol., 23: 45-64, 2003.
ENGELI, S. *et al*. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women entry into macrophages. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 173, p. 6521–6525, 2004.
ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. The Journal of Immunology, 191: 5542-5550, 2013.
FALCÃO, S. A. et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. PLoS Negl Trop Dis., 9(3): e0003601, 2015.
FARIA, D. R. et al. Recruitment of $CD8^+$ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol., 31(8): 432-439, 2009.
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.
FIELD, C. J.; JOHNSON, I. R.; SCHLEY, P. D. Nutrients and their role in host resistance to infection. v. 71, n. January, p. 3–18, 2002.
FITZGERALD-BOCARSLY, P. Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. Biotechniques, v. Suppl, p. 16–20, 22, 24–9, 2002.
FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by inter -feron-gamma-primed macrophages. Europe Journal of Immunology, v. 36, n. 2, p. 411–20, 2006.
FLETCHER, J. M. et al, Cytomegalovirus-specific $CD4^+$ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion; J. Immunol., 175: 8218-822, 2005.
FOCOSI, D. et al. $CD57^+$ T lymphocytes and functional immune deficiency. J Leukoc Biol., 87(1):107–116, 2010.
FOLLADOR, I. et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania* infection. Clin Infect Dis., 34: 54-58, 2002.
FREUND, A. et al. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. Trends Mol Med., 16: 238-246, 2010.
FULOP, T. et al. Aging, frailty and age-related diseases. Biogerontology, 11: 547-563, 2010.
FUNCTION, I. Diet and Immune Function. p. 1–9, 2019.
GALLIMORE, A. *et al*. Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Class I – Peptide Complexes. The Journal of experimental medicine, v. 187, n. 9, p. 1383 – 1393, 1998.
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.
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.
GAZE, S. T. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. Scand J Immunol., 63(1): 70-78, 2006.
GEGINAT, J., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. Proliferation and differentiation potential of human $CD8^+$ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. Blood, 101:4260-4266, 2003.
GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferationassociated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol., 238: 867-73, 1991.
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.

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.
GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect. Dis., 12: 75, 2012.
GLENNIE, N. D. et al. Skin-resident memory $CD4^+$ T cells enhance protection against Leishmania major infection. J Exp Med., 212 (9): 1405-1414, 2015.
GLENNIE, N. D.; SCOTT, P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. Cell Immunol. 309: 50-54, 2016.
GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev., 14:1693–711, 2000.
Global leishmaniasis update, 2006-2015: turning point in leishmanisis surveillance. 38 (92): 557-572, 2017.
GONÇALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. J. Exp. Med. 208: 1253–1265, 2011.
GOODWIN, K., VIBOUD, C., SIMONSEN, L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. Vaccine, 24(8):1159-1169, 2006.
GORAK, P. M., ENGWERDA, C. R., KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. Eur J Immunol., 28(2): 687-95, 1998.
GORDON, S. Alternative activation of macrophages. Nature Reviews Immunology. v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.
GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. Immunity, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.
GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Rheumatoid arthritis. Immunol. Rev., 204: 55-73, 2005
GOTO, H.; PRIANTI, M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v. 51, n.5, 2009.
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.
GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. Clinical microbiology reviews, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.
GUERRERO, E. T. et al. Leishmaniasis: a review; F1000 Res., 6:750, 2017.
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.
GUTIERREZ, F. R. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. Infect Immun., 79: 1873-1881, 2011.
HAMANN, D. et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human $CD8^+$ T cells. J. Exp. Med., 186: 1407-1418, 1997.
HAMMARLUND, E. et al; T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. Tuberculosis, 91:308–313, 2011.
HAMMARLUND, E. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. Nat. Med., 9: 1131-1137, 2003.
HANDMAN, E., ELSO, C., FOOTE, S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. Adv Parasitol., 59: 1-75, 2005.
HAQUE, A. et al. Granzyme B expression by $CD8^+$ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. J Immunol., 186: 6148-56, 2011.
HASSAN, S. S. et al. PD-1, PD-L1 and PD-L2 gene expression on T-cells and natural killer cells declines in conjunction with a reduction in PD-1 protein during the intensive phase of tuberculosis treatment. PLoS One, 10: e013764, 2015.
HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37:614-36, 1965.
HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 25: 585-621, 1961.
HEJAZI, S. et al. Interleukin-10 and transforming growth factor-β in early and late lesions of patients with Leishmania major induced cutaneous leishmaniasis. Iran. J.Parasitol., 7:16-23, 2012.

Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar
HENAO-TAMAYO, et al. T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 91(4):308-313, 2011.
HENSON, S. M. et al. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser^{473}) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8^{+} T cells. Blood, 113: 6619-6628, 2009.
HENSON, S. M. et al. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8^{+} T cells. J. Clin. Invest., 124: 1-13, 2014.
HENSON, S. M., RIDDELL, N. E., AKBAR, A. N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression. Curr. Opin. Immunol., 24:476-481, 2012.
HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1- more than a marker for T cell senescence. Age, 31: 285-291, 2009.
HERNÁNDEZ-RUIZ, J. et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. PLoS Negl Trop Dis., 4(11):e871, 2010.
HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. CD8^{+} cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. Salud Publica Mex., 48: 430-439, 2006.
HIROSUMI, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature, v. 420, p. 333–336, 2002.
HIRVE, S. et al. Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent - A Systematic Literature Review. PLoS Negl Trop Dis., 10(8): e0004896, 2016.
HOCHEDEZ, P.; CAUNES, E. Common skin infections in travelers. J. Travel Med., 15, 252-262, 2008.
HODES, R. J., HATHCOCK, K. S., WENG, N. Telomeres in T and B cells. Nat. Rev. Immunol., 2: 699–706, 2002.
HOME-DEBETS, J. M. et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8^{+} T cells drives chronic malaria. Cell, 5:1204-1213, 2013.
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. JIN, H. T. *et al.* Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection.
HOTCHKISS, G. et al. Telomere loss in peripheral blood mononuclear cells may be moderately accelerated during highly active antiretroviral therapy (HAART). J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 22:445–452, 1999.
ILLINGWORTH, J. et al. Chronic exposure to Plasmodium falciparum is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. J Immunol., 190:1038-1047, 2013.
Immunology. v. 129, n. 4, p. 474– 481, 2010.
in tissues of infected mice. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 39, p. 2167–2168, 1995.
INCHÁUSTEGUI, A. De la leishmaniosis americana y de la úlcera de los chicleros en México. Tesis, Universidad Nacional de México. 1918.
ITO, M. et al. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. J Exp. Med., 203:289-295, 2006.
JIMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. Am J Trop Med Hyg., 86: 426- 433, 2012.
JIN, H. T. *et al.* Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. BMB Reports. v. 44, n. 4, p. 217– 231, 2011.
JOHN WHERRY, E. T cell exhaustion. Nature Publishing Group, v. 131, 2011.
JORDAN, K. A.; HUNTER, C. A. Regulation of CD8^{+} T cell responses to infection with parasitic protozoa. Exp Parasitol., 126 (3): 318-25, 2010.
JORDANIA DA SILVA, V. et al. Obesity induction in hamster that mimics the human clinical condition. Experimental Animals, v. 66, n. 3, p. 235–244, 2017.
JOSHI, T. *et al.* B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. PLoS Pathogens. v. 5, n. 5, e1000431, 2009.
JUN, J. I.; LAU, L.F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. Nat. Cell Biol., 12: 676–685, 2010.
JURADO, J. O. et al. Programmed Death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell

Effector Functions during Human Tuberculosis. The Journal of Immunology, v. 181, n. 1, p. 116–125, 2008.
KADO, T. et al. Linkage of CD8+ T cell exhaustion with high-fat diet-induced tumourigenesis. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
KAECH, S. M. et al. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. Cell, 111: 837–51, 2002.
KAHAN, S. M., WHERRY, E. J., ZAJAC, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. Virology, 480: 180–193, 2015;
KAISHO, T.; AKIRA, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice.
KALIA, V. et al. Prolonged interleukin-2R alpha expression on virus-specific $CD8^+$ T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. Immunity, 32 (1): 91–103, 2010.
KANE, M. M.;, MOSSER, D.M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. Curr Opin Hematol., 7(1): 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.; SOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol., 9 (8): 604–15, 2011.
KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: Progress and problems. Parasitology, v. 133, n. SUPPL.2, 2006.
KEE, S. J. et al. Dysfunction of natural killer T cells in patients with active Mycobacterium tuberculosis infection. Infection Immun., 80: 2100-2108.
KESHAVARZ VALIAN, H. et al. $CCR7^+$ central and $CCR7^-$ effector memory $CD4^+$ T cells in human cutaneous leishmaniasis. J Clin Immunol., 33(1):220-34, 2013.
KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy.
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.
KIM, P. S.; AHMED, R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. Current Opinion in Immunology, 22 (2): 223–230, 2010.
KLEIN, L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). Nat. Rev. Immunol. 14: 377–391, 2014.
KLING, J. C.; KORNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. Int J Parasitol., 44: 217–231, 2013.
KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 485-517.
KOVAIOU, R. D.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Age-associated changes within $CD4^+$ T cells. Immunol. Lett., 107: 8-14, 2006.
KROIDL, A. et al. Non-healing old world cutaneous leishmaniasis caused by *L. infantum* in a patient from Spain. BMC Infect Dis., 14:206, 2014.
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.
KUCHROO, V. K. et al. New roles for TIM family members in immune regulation. Nat. Rev. Immunol., 8: 577-580, 2008.
KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. Frontiers in immunology, v. 3, n. August, p. 251, 2012.
L SACKS, D.; V. PERKINS, P. Identification of an Infective Stage of Leishmania Promastigotes. Science, v. 223, n. March, p. 1417–1420, 1984.
LANNA, A. et al. IFN-α inhibits telomerase in human $CD8^+$ T cells by both hTERT downregulation and induction of p38 MAPK signaling; J Immunol., 191(7): 3744-3752, 2013.

LEE, G. Y.; HAN, S. N. The Role of Vitamin E in Immunity. p. 1–18, 2018.
LEE, J. Y. et al. Differential expression of CD57 in antigen-reactive $CD4^+$ T cells between active and latent tuberculosis infection. Clin Immunol., 159(1): 37-46, 2015.
LEE, K. M. et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. Science, 282: 2263-2266, 1998
LEON, B., LOPEZ-BRAVO, M., ARDAVIN, C. Monocyte derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. Immunity, 26: 519-531, 2007.
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.
LIANG, S. C. et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. Eur. J. Immunol., 36: 58-64, 2006.
LIBRI, V. et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional $CD4^+CD45RA^+CD27^+$ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. Immunology, 132: 326-339, 2011.
LIEBERMAN, J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. Immunol Rev., 235:5-9, 2010.
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.
LOPES, M. E. et al. Indigenous microbiota and leishmaniasis. Parasite Immunol., 38: 37-44, 2016.
LORD, S. J. et al. Granzyme B: a natural born killer. Immunol Rev., 193:31-38, 2003.
LOUZIR, H. et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. J Infect Dis., 177: 1687-95, 1998.
LUGLI, E. et al. Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in non human primates. Blood, 116: 3238-3248, 116.
LUKENS, J.R. et al. Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector $CD8^+$ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model. J. Immunol., 180: 4875-4884, 2008.
MACAULAY, R., AKBAR, A. N., HENSON, S. M. The role of the T cell in age-related inflammation. Age (Omaha), 35: 563-572, 2013.
MACHADO, P. R. et al. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. Eur J Dermatol., 12(5): 449-51, 2002.
MAGALHÃES, A. V. et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (braziliensis) braziliensis*. I. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. Rev Inst Med Trop São Paulo, 28:253-62, 1986.
MAIOLI, T. U. et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. Inflammation Research, 2016.
MAJUMDER, S. *et al.* Antigen-pulsed CpG-ODN-activated dendritic cells induce host-protective immune response by regulating the T regulatory cell func -tioning in *Leishmania donovani*-infected mice: critical role of CXCL10. Frontiers in Immunology, v: 261, n.5, 2014.
MALAFAIA, G. et al. Protein-energy malnutrition decreases immune response to Leishmania chagasi vaccine in BALB/c mice. Parasite Immunology, 2009.
MANCUSO, P. Obesity and lung inflammation. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), v. 108, n. 3, p. 722–728, 2010.
MARENGERE, L. E. et al. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. Science, 272: 1170-1173, 1996.
MARTINS, G. A. et al. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan Trypanosoma cruzi. J Immunol., 172: 4893-4901, 2004.
McKINNEY, E. F. et al. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. Nature, 523:612–616, 2015.
MCKINNEY, E. F.; SMITH, K. G. T cell exhaustion and immune-mediated disease — the potential for therapeutic exhaustionCurrent Opinion in Immunology, 2016.
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.
MELBY, P.C. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. Infect. Immun., 62: 837–842, 1994.
MÉNARD, S.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. Mucosal Immunology, v. 3, n. 3, p. 247–259, 2010.
MENDES-AGUIAR, C de O. et al. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is upregulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol, 157:377–84, 2009.
MILLWARD, T. A., ZOLNIEROWICZ, S., HEMMINGS, B. A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A.Trends Biochem. Sci., 24: 186-191, 1999.
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.
MINAMINO, T.; KOMURO, I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis; Circ Res, 100: 15–26, 2007.
MODLIN, R. L. et al. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol., 60: 241-248, 1985.
MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunologyVaccine, 2010.
MOSKOPHIDIS, D. *et al*. Virus persistence in acutely infected immunoc ompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells . Nature, v. 362, n. 6422, p. 758-761, 1993.
MOU, Z. et al. Parasite-derived arginase influences secondary anti-Leishmania immunity by regulating programmedcell death-1-mediated $CD4^+$ T cell exhaustion. J. Immunol. 190: 3380–3389, 2013.
MURRAY, H. W et al. Advances in leishmaniasis. Lancet, 366 (9496): 1561–1577, 2005.
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.
NATALE, C. C.; SEIXAS, P. M.; ALMEIDA, D. M. DE. THE IMPORTANCE MURINE MODELS IN CHARACTERIZATION OF THE IMMUNE RESPONSE AGAINST LEISHMANIASIS: A REVIEW: UMA. v. 4, p. 35–59, 2016.
NATHAN, C.; DING, A. Non resolving inflammation. Cell, 140: 871-882, 2010.
NEBRADA, A. R.; PORRAS, A; p38 MAP kinases: beyond the stress response. Trends Biochem Sci., 25 (6): 257-60, 2000.
NOSSAL, G. J.; PIKE, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. Proc. Natl. Acad. Sci., 77:1602-6, 1980.
NOVAIS, F. O. et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathog., 9 (7): e1003504, 2013
NOVAIS, F. O. et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. J Invest Dermatol., 135(1): 94-101, 2015.
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.
NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. $CD8^+$ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. Semin Immunopathol., 37(3): 251-259, 2015.
NOVOA, R. et al. IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. Parasite Immunol., 33: 132–136, 2011.
O'GARRA, A. et al. IL-10-producing and naturally occurring $CD4^+$ Tregs: limiting collateral damage. J Clin Invest., 114 (10): 1372-8, 2004.
OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. Immunol Res., 56 (1): 163-71, 2013
ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017.
PAKULA, M. M.; MAIER, T. J.; VORUP-JENSEN, T. Insight on the impacts of free amino acids and their metabolites on the immune system from a perspective of inborn errors of amino acid metabolism. Expert Opinion on Therapeutic Targets, v. 0, n. 0, 2017.

PARODIL, C. et al. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms co-infection with Trypanosoma cruzi. Med Microbiol Immunol., 205 (4): 353-369, 2016.
PARRY, H. M. et al. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. Immun Ageing, 13:1, 2016.
PASSOS, J. F. et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. Mol. Syst. Biol., 6: 347, 2010.
PAUN, A. *et al.* Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. PLoS Pathogens. v.7, n. 1, e1001246, 2011.
PAWELEC, G.; DERHOVANESSIAN, E. Role of CMV in immune senescence. Virus Res., 157 (2): 175-179, 2011.
PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin. Infect. Dis., 1: 1-13, 1996.
PENNOCK, N. D. et al. T cell responses: Naive to memory and everything in between. Adv. Physiol. Educ, 37:273–283, 2013.
PEREIRA, L. O. et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? Int J Infect Dis., 57: 132-137, 2017.
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.
PETERS, W. et al. The leishmaniases in biology and medicine. Clinical aspects and control, vol 2. Academic Press, 1987.
PHILIP G. REEVES, FORREST H. NIELSEN, GEORGE C. FAHEY, J. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. The Journal of Nutrition, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
PICKER, L. et al. Control of lymphocyte recirculation in man; I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor Lselectin on T cells during the virgin to memory cell transition. J. Immunol, 150: 1105–112, 1993.
PICKER, L. J. et al. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. Am. J. Pathol, 136 (5): 1053-1068, 1990.
PICKER, L. J. et al. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. J. Immunol, 145(10): 3247-3255, 1990.
PIPKINS, M. E. et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. Immunity, 32 (1): 79–90, 2010.
PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest, 91(4): 1390-1395, 1993.
PIRMEZ, C. et al. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. J Immunol, 145: 3100-3104, 1990.
PISCOPO, T. V.; MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. Postgrad Med J, 83(976): 649-57, 2007.
PLUNKETT, F. J. et al. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific $CD8^+$ T cells during acute Epstein-Barr virus infection. Blood, 97 (3): 700-707, 2001.
POMPEU, M. M. et al. Differences in γ interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. Infect. Immun, 69: 7453–7460, 2001.
RAI, A. *et al*. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis. PLoS ONE. v. 7, n. 2, e31551, 2012.
RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. Proc. Natl. Acad. Sci., 109 (50): 20596-20601, 2012.
REINER, S.; LOCKSLEY, R. Cytokines in the Differentiation of Thl /Th2 CD4+ Subsets in Leishmaniasis. Journal of Cellular Biochemistry. v. 53, p. 323-328, 1993.
REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis., 7(9): 581-596, 2007.
RIBAS-SILVA, R.C. et al. Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of southern Brazil. BMC Infect. Dis, 14 (4): 14929-35, 2013.
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.
RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits $CD8^+$ T -cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. Cell Death Dis, 6: e2018, 2015.
RIBERIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti leishmania response. PLoS Pathog, 8: e1002536, 2012.
RIDDEL, N. E. et al. Multifunctional cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+T cells are not restricted by telomere-related senescence in young or old adults. Immunology, 144: 549-560, 2015
ROBERTS, T. et al. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta, and interleukin-4 mRNA levels; J Infect Dis, 195 (6): 870-878, 2007.
ROCHA, P. N. et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis, 180: 1731–1734, 1999.
RODIER, F. et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat Cell Biol, 11: 973-979, 2009.
RODRIGUES, V. *et al*. Regulation of immunity during visceral leishmania infection.
RODRIGUES, V. et al. Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. PLoS Negl Trop Dis, 8(2): e2567, 2014.
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.
ROMERO, P. et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory $CD8^+$ T lymphocytes. J. Immunol., 178 (7): 4112-4112-4119, 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.
ROSS, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med, 340: 115–126, 1999.
ROSSAHART, S. et al. Interaction of KLRG1 with Ecadherin: new functional and structural insights. Eur. J. Immunol, 38: 3354-3364, 2008.
RUFER, N. et al. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. Blood, 102: 1779-1787, 2003.
SABIO, G. *et al.* A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance.
SACRAMENTO, L. *et al.* Protective role of 5-lipoxigenase during *Leishmania infantum* infection is associated with Th17 subset. BioMed Research International. v. 2014, 2014.
SADA-OVALLE, I. et al. Tim-3 blocking rescue macrophage and T cell function against Mycobacterium tuberculosis infection in HIV^+ patients. J Int AIDS Soc, 2015; 18: 20078, 2015;
SAHA, S. et al. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of Leishmania donovani infection in India; J Immunol, 179 (8):5592–603, 2007.
SAID, E. A. et al; Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs $CD4^+$ T cell activation during HIV infection. Nat. Med, 16: 452-459, 2010.
SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. Trends in Parasitology, v. 25, n. July, p. 383–391, 2009.
SALDANHA, M. G. et al. Characterization of the histopathologic features in patients in the early and

late phases of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 96 (3): 645-52, 2017.
SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature, 401: 708-712, 1999.
SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. Ann Rev Immunol, 22:745–63, 2004.
SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses. Immunol. Today, 19: 568– 74, 1998.
SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. Curr Opin Immunol, 16: 724–31, 2004.
SALMAN, S. M.; Rubeiz, N. G, Kibbi, A. G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. Clin Dermatol, 17(3): 291-296, 1999.
SAMARANAYAKE, N. et al. Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: A case control study from Sri Lanka and a systematic review. BMC Infect. Dis, 16: 292, 2016.
SANTAMARIA-BABÍ, L. F. CLA^+ T cells in cutaneous disease. Eur J Dermatol, 14:13–18, 2004.
SANTOS, C da S. et al. $CD8^+$ granzyme B^+ mediated tissue injury vs. $CD4^+$ IFNgamma$^+$ mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis; J Invest Dermatol, 133 (6): 1533-40, 2003.
SAULE, P. et al. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in $CD4^+$ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in $CD8^+$ compartment. Mech. Ageing Dev, 127, 274–281, 2006.
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.
SCHIETINGER, A.; GREENBERG, P.D. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. Trends Immunology. v. 35, 2014.
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.
SCHLOTMANN, T. et al. CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. J Infect Dis, 182 (1): 367-370, 2000.
SCHNORR, D. et al. IFN-γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. Braziliensis* infection. PLoS Negl. Trop. Dis, 6 (12): e1947, 2012.
SCHON, M. P., ZOLLNER, T. M., BOEHNCKE, W. H. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. J Invest Dermatol, 121:951–62, 2003.
SCHUBACH, A. et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: A site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. Am. J. Trop. Med. Hyg, 58: 824–827, 1998.
SCHUBACH, A. et al. Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. J.Infect. Dis. 178: 911-914, 1998.
SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. Lancet Infect. Dis, 6: 342–349, 2006.
Science (New York, N.Y.), v. 322, p. 1539–1543, 2008.
SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. Nature Reviews Immunology, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.
SEIDELIN, H. Leishmaniasis and Babesiasis in Yucatan. Ann Trop Med Parasit, 6(2): 295–300, 2016.
SERAFIM, T. D. et al. Immune response to Leishmania (Leishmania) chagasi infection is reduced in malnourished BALB/c mice. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2010.
SHALINI, G. *et al*. CD8 T Cell Exhaustion in Human Visceral Leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases. v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014.
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.
SHARQUIE, K. E.; NAJIM, R. A. Disseminated cutaneous leishmaniasis. Saudi Med J. 25(7): 951-954, 2004.
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.
SICA, A; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. Journal of Clinical Investigation. v. 122, n. 3, p.787-795, 2012.
SIDDIQUI, K. F. et al; Latency associated protein Acr1 impairs dendritic cell maturation and functionality: a possible mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis; J Infect Dis, 209: 1436–45, 2014.
SIELING, P. A. et al. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. Immunology, 120:518–25, 2007.
SIGMUNDSDÓTTIR, H. et al. The frequency of CLA^+ $CD8^+$ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. Clin Exp Immunol, 126: 365–9, 2001.
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.
SILVEIRA, K. Factors associated with the nutritional status of children less than 5 years of age. 2015..
SIMONSEN, L. et al; Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: an ongoing controversy. Lancet Infect Dis, 7 (10): 658–66, 2007.
SIMPSON, R. J., *et al*. Senescent phenotypes and telomere lengths of peripheral blood T-cells mobilized by acute exercise in humans. Exercise Immunology Review, v. 16, p. 40–55, 2010.
SINGH, A. et al. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues Mycobacterium tuberculosis-specific interferon gamma- producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis; J Infect Dis, 208: 603–15, 2013.
SINGH, A. et al. Programmed death-1 receptor suppresses gamma-IFN producing NKT cells in human tuberculosis. Tuberculosis, 94: 197–206, 2014.
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.
SMITH, P. et al. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. Journal of Immunology. v. 173, n. 2, p. 1240-1248, 2004.
SNYDER, C. M. et al. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. Immunity, 29: 650–659, 2008.
SREEJIT, G. et al. The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin (beta2M) affecting antigen presentation function of macrophage. PLoS Pathogens 10:e1004446, 2014
Staphylococcus aureus. Infection and immunity, v. 77, n. 3, p. 1008–1014, 2009.
STENGER, S. Anti-TNF immunotherapy reduces $CD8^+$ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans; *J. Clin. Invest*, 119*:* 1167–1177, 2009.
STORER, M. et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. Cell, 155: 1119–1130, 2013.
STOWE, R. P. et al. Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. Exp Gerontol, 42 (6): 563–70, 2007.
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.
TAIT, E.D.; HUNTER, C. Advances in under standing immunity to Toxoplasma gondii. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104: 201-210, 2009.
TALAT, H., ATTARWALA, S., SALEEM, M. Cutaneous leishmaniasis with HIV. J. Coll. Physicians Surg. Pak. 24 (Suppl 2), S93–95, 2014.
TARAZONA, R. et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells; Mech Ageing Dev, 121(1):77–88, 2000.
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.

TERRY L. A., BROWN M. H., BEVERLY P. C. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte common antigen, CD45. Immunology, 64: 331–336, 1988.
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.
THIMME, R. et al. Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific $CD8^+$ T cells during persistent antigen stimulation. J Virol, 79: 12112-12116, 2005.
THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania; Annales de parasitologie humaine et compare, 68 (2):104-6, 1993.
TOKOYODA, K. et al. Professional memory $CD4^+$ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. Immunity, 30: 721–730, 2009.
Trends in immunology, v. 22, n. 2, p. 78–83, 2001.
UNGER, A. et al. Association of treatment of american cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. Am. J. Trop. Med, 80: 574-579, 2009.
VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania*
VERA-IZAGUIRRE, D. et al.: Leishmaniasis revisión. DCMQ, 4(4): 252-260, 2006.
VIRGIN W., WHERRRY, E. J., AHMED, R. Redefining chronic viral infection. Cell. 138 (1): 30-50, 2010.
VITA, G. F. et al. Status of the american tegumentary leishmaniasis in the state of Rio De Janeiro, Brazil, from 2004 To 2013. Rev. Inst. Med. Trop, 58:712, 2016.
VOEHRINGER, D., KOSCHELLA, M., PIRCHER, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin like receptor G1 (KLRG1). Blood, 100: 3698-3702, 2002.
VON PIRQUET, C E. Das Verhalten der kautanen Tuberculinreaktion wahrend der Masern. D. Med. Wochenschr., 34, 1297 - 1298, 1908. (TURK, J.L. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. Journal of the Royal Society of Medicine, 90: 31-33, 1987).
VON STEBUT, E. et al. Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. J. Exp. Med, 188: 1547–1552, 1998.
VON ZGLINICKI, T. et al. Human cell senescence as a DNA damage response; Ageing Dev. 126: 111–117, 2005.
WALLACE, D. L. et al; Human cytomegalovirus-specific $CD8^+$ T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. Immunology, 132: 27–38, 2011.
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.
WELLS, A. D. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. J Immunol, 182: 7331-7341, 2009.
WENG, N. P., AKBAR A.N., GORONZY J. $CD28^-$ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. Trends Immunol, 30: 306-312, 2009.
WEYAND C. M. FULBRIGHT J. W., GORONZY J. J. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. Exp. Gerontol, 38: 833–841, 2003.
WHERRY, E. J. et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. Nat Immunol, 4; 225, 2003.
WHERRY, E. J. et al. Molecular signature of $CD8^+$ T cell exhaustion during chronic viral infection. Immunity, 27 (4): 670-684, 2007.
WHERRY, E. J. T cell exhaustion. Nature Immunology. v. 12, n. 6, p. 492– 499, 2011.
WHERRY, J.; KURACHI , M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nature Reviews Immunology. v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015.
WHO. Control of Leishmaniases. Technical report series 949. Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization.
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.
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, 2017.
WYKES, M. N. et al. Malaria drives T cells to exhaustion. Front Microbiol, 5:249, 2014.
YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 29: 464–67, 2004.
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.
YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion.
YOLANDA, D. M. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets; Eur. J. Immunol, 43: 2797–2809, 2013.
YOSHIMURA, A. WAKABAYASHI Y., MORI T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta; J Biochem, 147(6):781-92, 2010.
ZAJAC, A. J. *et al* . Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. The Journal of experimental medicine, v. 188, n. 12, p. 2205–2213, 1998.
ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to Leishmania major in the absence of persistent parasites. Nat Med, 10 (10): 1104-10, 2010.
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.
ZHOU, J. Y.; ZHOU, D. F.; LI, J. Q. PD-1 expression in HBcAg-specific CD8+ T cells of adolescents with chronic HBV infection. Chinese Journal of Hepatology. v. 21, n. 1, p.27-32, 2013.
ZHOU, Q.; LEEMAN, S. E.; AMAR, S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. PNAS, v. 108, p. 2867–2872, 2011.
ZOU, W.; CHEN, L (2008). “Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment;” Nature Reviews Immunology, 8 (6): 467-477.

ANEXO 1

DIET-INDUCED OBESITY PROMOTES SYSTEMIC INFLAMMATION AND INCREASED SUSCEPTIBILITY TO MURINE VISCERAL LEISHMANIASIS