

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sara Malaguti Andrade Soares

**O PAPEL DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA PROTEÇÃO CONTRA A
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA
2022

SARA MALAGUTI ANDRADE SOARES

**O PAPEL DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA PROTEÇÃO CONTRA A
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Jacy Gameiro

JUIZ DE FORA

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soares, Sara Malaguti Andrade.

O PAPEL DA DIETA HIPERLIPIDICA NA PROTECAO CONTRA A MALARIA CEREBRAL EXPERIMENTAL / Sara Malaguti Andrade Soares. -- 2022.

70 p.

Orientadora: Jacy Gameiro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Malaria. 2. Dieta Hiperlipidica. 3. Obesidade. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Título.

Sara Malaguti Andrade Soares

O papel da dieta hiperlipídica na proteção contra a malária cerebral experimental

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e doenças infectoparasitárias.

Aprovada em 05 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Jacy Gameiro - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^ª. Dr^ª. Kézia Katiani Gorza Scopel

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^ª. Dr^ª. Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof^ª. Dr^ª. Tatiani Uceli Maioli

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a memória da minha Madrinha Maria Ângela, falecida em 2020, exemplo de pensamento crítico, empatia e solidariedade e amor. Viva sempre no coração de quem amou.

AGRADECIMENTOS

É completamente impossível sair do clichê nesse momento, onde gostaria de roubar a voz de escritores e poetas, para traduzir melhor a gratidão que sinto. Mas gostaria de agradecer de todo meu coração a todos que participaram desses longos anos de doutorado, esse percurso com tantas curvas e surpresas!

Primeiramente preciso agradecer quem me constrói desde sempre, meus pais, a dupla mais compreensível, a torcida mais fervorosa e o exemplo impecável. Minha mãe gêmea Sãozinha, me ensina o significado da palavra incondicional todos os dias, nunca poupou esforços para me apoiar, minha referência em todos os aspectos da vida, sem você eu sei que não teria conseguido. Meu pai, tão bem-humorado e prestativo, sempre confiou tanto em mim que me ajuda a confiar também. Amo tanto vocês e me sinto uma filha muito sortuda por ser dessa família!

Meu irmão César, que antes tão distantes pela idade, agora me acompanha nessa vida acadêmica! Me orgulho muito de você, obrigada pelo apoio, confiança, amizade e parceria.

Ao meu grande amor, Breno, que não me conhece sem ser doutoranda, espero ser mais leve e presente pra nossa família agora! Meu companheiro, que sempre me surpreende positivamente, o pai mais incrível que eu já conheci, nosso filho também tem muita sorte. Obrigada por ser essa leveza, e acolher todas as minhas versões.

Ao meu filho Francisco, minha razão de viver, que mudou todas as minhas prioridades desde quando pensou em existir! Você nos traz para o presente, e para o que verdadeiramente importa, você transforma qualquer lágrima em sorriso e cansaço em alívio, só por ser você! Obrigada meu querido, por transformar nossas vidas e por nos permitir transformar a sua e por todo amor que você nos trouxe.

A minha orientadora e amiga Jacy Gameiro, a quem devo todo meu crescimento acadêmico, por sua visão de mundo, pelo companheirismo e confiança, por sua empatia, por seu desapego (que sempre nos deixou ir, porque sabe que a gente volta pra ela), quero estar sempre ao seu lado, é um prazer imenso trabalhar com você, porque uma frase que você cita, mas que já é sua: O que importa é se a pessoa é maneira, o resto a gente dá um jeito.

A minha querida amiga Ana Gualberto, que há tantos anos é minha dupla inseparável, tanto que nos sentimos verdadeiras irmãs, compartilhando inclusive a família, o trabalho e a vida inteira! Esse trabalho é nosso, te agradeço pela parceria, por tantos finais de semana, madrugadas no laboratório, por estar do meu lado na alegria e na tristeza, no barzinho e no parto, na cerveja e na fralda! Obrigada pelo prazer de ter você por perto e pelo privilégio de trabalhar e aprender com você.

Aos companheiros de laboratório, por tanta parceria, Diego, Augusto e Leticia, apesar de estar ausente nos últimos anos, vocês sempre contribuíram para um ambiente divertido, discussões científicas enriquecedoras, e finais de semana de muita animação no laboratório.

À minha família, que sempre ofereceu suporte e incentivo, em especial minhas primas Natalia, Kattia e Thattiane, por tantos conselhos em todos os aspectos da vida, orientações, torcida, pelo amor e companheirismo, e agora por viver a maternidade juntas também.

Aos grandes amigos que a vida me permitiu fazer, seja na faculdade, Maira, Diego, Raphinha, Luan, Alyssa pela leveza da vida, meus amigos do colégio militar que permaneceram por tantos anos, que sempre instigaram discussões filosóficas, nada mudou, tudo mudou.

Aos meus amigos que foram minha casa na cidade de Nova York, e aplacaram a solidão, Rosa, Bruna, Helena, Dijna, Tiago, Anelise, Marina, cientistas de áreas completamente diferentes que se encontraram durante um intercâmbio, foi extremamente enriquecedora nossa convivência.

Ao laboratório da professora Dr^a Ana Rodriguez, que me recebeu tão bem durante minha estadia na NYU, oferecendo com generosidade aprendizados que levaram por toda minha carreira.

Aos meus companheiros de trabalho do laboratório de imunologia de transplante da Santa Casa, pelo apoio e oportunidade de trabalhar em um ambiente que coloca a ciência e o estudo da imunologia em prática. Em especial meu grande amigo Carlos pelas longas discussões científicas e pessoais, sempre com profundidade e comprometimento, pela amizade, sinceridade e

parceria. Lívia por todas as trocas sobre maternidade e compreensão mútua, Cellen pela paciência do ensino, pelo exemplo de vida e gosto pelo aprendizado. Thais pela chefia justa, empolgação com a ciência, toda minha admiração. E a todos por todas as risadas compartilhadas mesmo com uma rotina tao atribulada.

Às agências de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Aos componentes da banca pela gentileza de aceitarem o convite!

Muito obrigada.

A boniteza da vida não está na compreensão rígida das coisas nem na lógica bem comportada que exigimos dos fatos, nem tampouco na nossa certeza em termo do que deve ser a própria vida.

A boniteza da vida está na certeza da incerteza e na coragem de começar tudo de novo quando se pensava que já nada podíamos fazer.

PAULO FREIRE

RESUMO

O PAPEL DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA PROTEÇÃO CONTRA A MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

É bem estabelecido que mudanças na dieta podem ter um impacto significativo no sistema imunológico, e que modificações no balanço lipídico podem contribuir para a progressão de diversos tipos de doenças. A malária é uma preocupação global e o desenvolvimento da doença já foi relacionado com o estado nutricional do hospedeiro. Portanto, se torna crucial compreender como fatores ambientais, nesse caso, o consumo alimentar, pode influenciar na infecção por parasitas causadores da malária. Com esse objetivo, camundongos machos da linhagem C57Bl/6 foram alimentados por dieta hiperlipídica, com 60% das calorias advindas de lipídeos, por doze semanas ou cinco dias. Após esse período, os animais foram infectados por *Plasmodium berghei* ANKA ou NK65 e a parasitemia, sobrevivência e sintomas neurológicos foram acompanhados. Considerando que uma das primeiras vias de eliminação do parasita é o estresse oxidativo, foi utilizado um antioxidante, o N-Acetil- Cisteína (NAC) em associação à dieta hiperlipídica, para avaliar se o mesmo efeito na infecção seria observado. Diferente dos animais do grupo controle, que morreram após aproximadamente 8 dias de infecção e 7% de hemácias parasitadas, o grupo alimentado por dieta hiperlipídica, a longo e curto prazo, mesmo tratado com antioxidante, foi resistente a infecção, sem apresentar aumento da parasitemia nem sinais clínicos da doença. Além disso, foi observado aumento das principais citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-6 no baço dos animais infectados, independente da dieta. Concluímos, portanto, que a administração de dieta hiperlipídica a curto e longo prazo é capaz de prevenir completamente a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA e que o tratamento com antioxidante não foi capaz de reverter essa proteção.

Palavras-chave: Obesidade, Malária grave, Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

ROLE OF A HIGH-FAT DIET IN PROTECTION AGAINST EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA

It is well known that dietary changes have a significant impact on the immune system, and modifications in lipid balance may contribute to disease progression in several cases. Malaria is still a major global health concern, and the development of the disease has already been linked to the host's nutritional status, so it's critical to understand how environmental factors, such as dietary variations, can influence the outcome of infection. We therefore investigated the effect of a short-term diet in a murine model of experimental cerebral malaria. For this, male C57Bl/6 mice were fed a high fat diet containing 60% of the calories from lipids for 5 days. Following this period, the animals were infected with *Plasmodium berghei* ANKA, and parasitemia, survival, and neurological scores were compared. Considering that one of the first elimination routes of the intracellular parasite is oxidative stress, the antioxidant N-acetylcysteine was administered to assess whether the protection would be reversed, but the animals fed a hyperlipidic diet reacted the same way to infection even after NAC administration. Unlike the control group, which died after eight days of infection with roughly 7% parasitized red blood cells, the hyperlipidic diet group was resistant to infection, with no clinical signs and no increase in blood parasitemia. Several proinflammatory cytokines such as TNF- α IFN- γ and IL-6 were increased in the spleen of both infected groups, regardless of their diet. The provision of a high-fat diet to mice for as little as 5 days completely prevents *Plasmodium berghei* ANKA infection in C57Bl/6 mice, while the treatment of an antioxidant failed to reverse the parasite protection.

Keywords: Obesity, severe malaria, high fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias moleculares que conectam a obesidade e a inflamação..	24
Figura 2. Desenho esquemático demonstrando o ciclo de vida dos parasitas do gênero Plasmodium.....	28
Figura 3. A adesão de eritrócitos infectados ao CD36 tem efeitos opostos na sobrevida do parasita da malária e na patologia do hospedeiro	30
Figura 4. Proteção contra o desenvolvimento da malária em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	35
Figura 5. Indução da obesidade por dieta hiperlipídica ao longo de 12 semanas	45
Figura 6. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica	46
Figura 7. Desenvolvimento da malária por Plasmodium berghei NK65 em camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica.	Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Desenvolvimento da malária por Plasmodium berghei NK65 em camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica.	47
Figura 9. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos apoE-/-.....	48
Figura 10. Avaliação da permeabilidade vascular cerebral por corante Blue Evans.....	49
Figura 11. Avaliação da parasitemia de camundongos alimentados por 5 dias de dieta hiperlipídica.....	50
Figura 12. Peso do baço de animais infectados por Plasmodium berghei ANKA	51
Figura 13. Efeito da infecção por Plasmodium berghei ANKA na produção de citocinas no baço.....	52
Figura 14. Alterações no tecido adiposo após consumo de dieta hiperlipídica a curto prazo.....	53
Figura 15. Localização dos parasitos no tecido adiposo.....	55
Figura 16. Efeito da infecção por Plasmodium berghei ANKA na produção de citocinas no tecido adiposo perigonadal.....	56
Figura 17. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos com dieta suplementada com Ômega 3	57
Figura 18. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos alimentados com dieta HFD e tratados com NAC.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de indivíduos adultos de acordo com o IMC.....	20
Tabela 2. Componentes para 1Kg da ração hiperlipídica (HFD).....	37
Tabela 3. Escala rápida de comportamento e coma murino.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA Cytometric Bead Array - Ensaio

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima

FOXP3 Forkhead box P3

HFD High Fat Diet – Dieta Hiperlipídica

IFN- γ Interferon gama

IL-4 Interleucina tipo 4

IL-13 Interleucina tipo 13

IL-2 Interleucina tipo 2

IL-12 Interleucina tipo 12

IL-1 Interleucina tipo 1

IL-6 Interleucina tipo 6

iNOS Inducible nitric oxide synthase – Óxido nítrico-sintase induzida

LPS Lipopolissacarídeo

NO Óxido nítrico

Th1 T helper tipo 1 – T auxiliadora tipo 1

Th2 T helper tipo 2 – T auxiliadora tipo 2

TNF- α Tumour necrosis factor- Fator de necrose tumoral

WHO World Health Organization - Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1.1	Obesidade	21
2.1.2	Malária	26
2.1.3	Malária, obesidade e dieta hiperlipídica	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Animais	37
4.2	Delineamento Experimental	37
4.3	Indução da obesidade	37
4.4	Infeção por <i>P. berghei</i> ANKA e eutanásia dos animais	38
4.5	Avaliação da progressão da doença	39
4.6	Eutanásia	40
4.7	Avaliação da permeabilidade vascular cerebral	41
4.8	Imunofluorescência	41
4.9	Níveis de citocinas	41
4.10	Extração de RNA	42
4.11	Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa	43
4.12	Real time PCR	43
4.13	Estatística	44
5	RESULTADOS	44
5.1	Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentam proteção contra <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	44
5.2	Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 12 semanas não apresentam proteção contra <i>Plasmodium berghei</i> NK65.	47
5.3	Modelo animal de camundongo apoE ^{-/-} tem desenvolvimento da infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA alterada.	48
5.4	Consumo de dieta hiperlipídica por curto prazo protege contra infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	50
5.5	Aumento de citocinas no baço independe da parasitemia periférica.	50
5.6	Avaliação do tecido adiposo de animais alimentados por dieta hiperlipídica a curto prazo infectados por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.	53

5.7	Consumo de Ômega 3 não altera o curso da infecção por Plasmodium berghei ANKA.....	56
5.8	O uso do antioxidante NAC (N-Acetilcisteína) não foi capaz de restaurar a susceptibilidade a infecção de camundongos alimentados por dieta hiperlipídica.....	57
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento da obesidade como doença foi estabelecido em 1948 pela OMS (Organização Mundial da Saúde), de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (ICD) (JAMES, 2008). O aumento de peso da população mundial representa uma preocupação relevante para saúde pública, principalmente considerando que a prevalência da obesidade triplicou nos últimos quarenta anos, e que o estado nutricional está relacionado a um pior prognóstico para diferentes doenças (WHO, 2022). No Brasil, houve um aumento expressivo da obesidade e do sobrepeso em todos os estados nos últimos anos, mas especialmente nas regiões norte e nordeste (FELISBINO-MENDES et al., 2020).

O sobrepeso e a obesidade são considerados fatores de risco para diversas doenças crônicas incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (GUH et al., 2009). Anteriormente, relacionada como um problema restrito a países de alto desenvolvimento econômico, a obesidade e o sobrepeso agora aumentam de forma drástica em países em desenvolvimento, que em sua maioria, além de precisar lidar com diversas doenças infecciosas e subnutrição, precisam enfrentar novos desafios como a obesidade e sobrepeso, e inclusive com a coexistência dessas doenças (WHO, 2018).

A OMS utiliza o Índice de Massa Corporal (IMC) como base para definição da obesidade (OMS, 2000). Este parâmetro é calculado pela divisão do peso pelo quadrado da altura e o indivíduo é considerado obeso quando possui o $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Tabela 1). Apesar deste método apresentar algumas limitações, como por exemplo não considerar a massa muscular esquelética do organismo, ele possui grande relevância para avaliações epidemiológicas. Diversos estudos relataram que o IMC está associado com o risco de doenças (FELISBINO-MENDES et al., 2020).

Tabela 1. Classificação de indivíduos adultos de acordo com o índice de massa corporal (IMC)

Categoria	IMC (Kg/m²)
Abaixo	<18,5
Peso normal	18,5- 24,9
Sobrepeso	25-29,9
Obesidade	≥ 30
Obesidade grau I	30 – 34,9
Obesidade grau II	35 – 39,9
Obesidade grau III	≥ 40

IMC: índice de Massa Corporal. Adaptado de: OMS, 2000.

Reconhecidamente uma síndrome de causa multifatorial, que apesar de ser explicada de forma simplificada por uma situação em que há o excesso de ganho de energia (consumo alimentar) em relação ao gasto (perda de energia via metabolismo e atividade física), possui a etiologia altamente complexa e inclui fatores genéticos, fisiológicos, ambientais, psicológicos, sociais, econômicos e até culturais que interagem em graus variados para promover o seu desenvolvimento, tornando-a especialmente desafiadora de ser prevenida e tratada (ARONNE; NELINSON; LILLO, 2009; JAMES, 2008).

Considerando que o perfil alimentar representa uma grande influência no aumento da incidência da obesidade, esse cenário parece não caminhar para uma resolução. Isto porque, analisando a evolução da disponibilidade domiciliar no Brasil, a última pesquisa de orçamentos familiares (POF-2018) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), indicou que alimentos processados e ultra processados vem ganhando cada vez mais espaço na dieta dos brasileiros (POF, 2021).

Alguns estudos já mostraram como a obesidade impacta o desenvolvimento de doenças infecciosas, inclusive integrantes do nosso grupo de pesquisa discutiram a correlação entre a obesidade e a recente pandemia de COVID-19 (GONÇALVES et al., 2021). Considerando que as doenças

infeciosas continuam muito presentes, principalmente em países em desenvolvimento, se torna essencial compreender como a dieta e o estado nutricional dos indivíduos afetam sua resposta imune contra patógenos.

Apesar dos imensos esforços para eliminação da malária, incluindo a descoberta de medicamentos efetivos, inseticidas potentes, ferramentas de diagnóstico rápido e estratégias de prevenção inovadoras, ela continua uma das doenças parasitárias mais mortais do mundo ano após ano (CASTELLI; TOMASONI, 2022).

Levando em consideração que o consumo de dieta hiperlipídica é capaz de modificar a resposta imunológica (BUCKMAN et al., 2014; BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019), e que a malária cerebral é uma doença em que a resposta imunológica é uma das principais responsáveis pelos danos causados, levando a uma alta mortalidade (HUNT et al., 2006), se torna fundamental compreender como a obesidade, ou apenas o consumo de dieta hiperlipídica a curto prazo pode afetar o curso da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Obesidade

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, 650 milhões de adultos e 40 milhões de crianças foram classificados como obesos. No mesmo ano, 22% da população adulta brasileira se encontrava obesa e esse número vem crescendo a cada ano (WHO, 2018). Portanto, compreender as interações entre a obesidade e o sistema imune, suas influências e potenciais regulações se torna fundamental para a compreensão e visão atualizada dos próximos desafios.

A expansão do tecido adiposo durante a obesidade está associado a alterações de diversos fatores, podendo comprometer a relação neuroendócrina que regula o metabolismo e a imunidade (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). Dentre as várias proteínas secretadas pelo tecido adiposo que podem estar alteradas na obesidade são adipocinas, como a leptina, que atuam na

imunidade, hemostasia, pressão sanguínea, metabolismo de lipídios, regulação do apetite e equilíbrio de energia, angiogênese e sensibilidade à insulina (PROCACCINI et al., 2017; TRAYHURN; WOOD, 2004; ZHAO; KUSMINSKI; SCHERER, 2021).

A obesidade está relacionada com um estado inflamatório crônico de baixo grau, com acúmulo e polarização de macrófagos e células dendríticas para o estado pro inflamatório, principalmente no tecido adiposo, além da presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e quimiocinas como a CCL2, sendo implicado no desenvolvimento de diversas enfermidades como diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e outras (BERG; SCHERER, 2005; BLÜHER, 2019).

O tecido adiposo é heterogêneo e contém uma população residente de células do sistema imune, principalmente macrófagos e linfócitos T, que estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação na obesidade. Estas células são espacialmente e temporalmente dependentes da quantidade de tecido adiposo, e em função disso também podem alterar o perfil de secreção dos adipócitos ao seu redor (IYER et al., 2010).

A maioria das células T residentes no tecido adiposo de indivíduos magros são células T-reguladoras (T regs) e células Th2, que juntamente com os macrófagos residentes, produzem IL-10 constituindo um estado anti-inflamatório (FEUERER et al., 2009). Por outro lado, as células T residentes predominantes no tecido adiposo de obesos são predominantemente células T efetoras Th1 e CD8+. A alteração na população e na função das células T do tecido adiposo ocorre precocemente durante o desenvolvimento da obesidade (NISHIMURA et al., 2009). Essa situação pode perturbar a homeostase dos adipócitos e desencadear uma resposta imune que conduz ao maior recrutamento de macrófagos (LUMENG; MAILLARD; SALTIEL, 2009).

A obesidade também está associada ao aumento de infiltrado de macrófagos (WEISBERG et al., 2003). Além de aumentar a quantidade através do recrutamento dessas células, a obesidade também é responsável pela mudança fenotípica na polarização do macrófago no tecido adiposo. Diferentes estímulos ativam os macrófagos para expressar distintos padrões de marcadores de superfície, de quimiocinas e enzimas metabólicas, o que implica

na sua diversidade de função, podendo atuar como pró ou anti-inflamatórias (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Atualmente, o infiltrado de macrófagos na obesidade é subdividido em M1, M2a, M2b, M2c ou entre três grupos primários baseados em sua função como defesa do hospedeiro, cicatrização de feridas ou regulação imunológica de acordo com os componentes do microambiente (THOMAS; APOVIAN, 2017).

Na obesidade, a infiltração de macrófagos no tecido adiposo é uma etapa importante na inflamação crônica de baixo grau, pois os macrófagos, além de desempenhar um papel pró-inflamatório no tecido adiposo, alteram e potencializam a inflamação sistêmica, especialmente em estados inflamatórios crônicos (IYER et al., 2010). Tem sido relatado que ambos os macrófagos M1 e M2 estão presentes no tecido adiposo, e de acordo com o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo durante a obesidade, ocorre a mudança de fenótipo de macrófagos de M2 para M1 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Outras células do sistema imunológico também estão alteradas em camundongos obesos C57/BL6 por dieta hiperlipídica, incluindo uma menor atividade de células NK, células dendríticas com menor capacidade de processamento e apresentação de antígenos e função de linfócitos T CD8⁺ prejudicada (KARLSSON; SHERIDAN; BECK, 2010; SMITH et al., 2009).

Além da composição celular, a expressão de determinados receptores são alvos de estudos na obesidade. Amplamente expresso nas células supracitadas, CD36, é um receptor scavenger classe B multifuncional, expresso em adipócitos, plaquetas e células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, está envolvido na angiogênese e metabolismo lipídico. Tem como papel principal transportar para dentro das células ácidos graxos livres mas também pode atuar no reconhecimento de padrões de patógenos em células do sistema imune inato (THOMAS; APOVIAN, 2017).

Pesquisadores demonstraram recentemente que a obesidade induz a expressão de CD36 em pré-adipócitos, promovendo seu desenvolvimento para adipócitos maduros e aumentando a inflamação local, em humanos e modelos murinos induzidos por dieta. (LUO et al., 2020)

Além disso, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T do tecido adiposo aumentam a expressão de CD36 especialmente no tecido adiposo e

fígado durante a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (BONEN et al., 2006) (COUTURIER et al., 2019) Sendo uma das diferentes formas da obesidade influenciar no aumento da inflamação como demonstrando na figura 1.

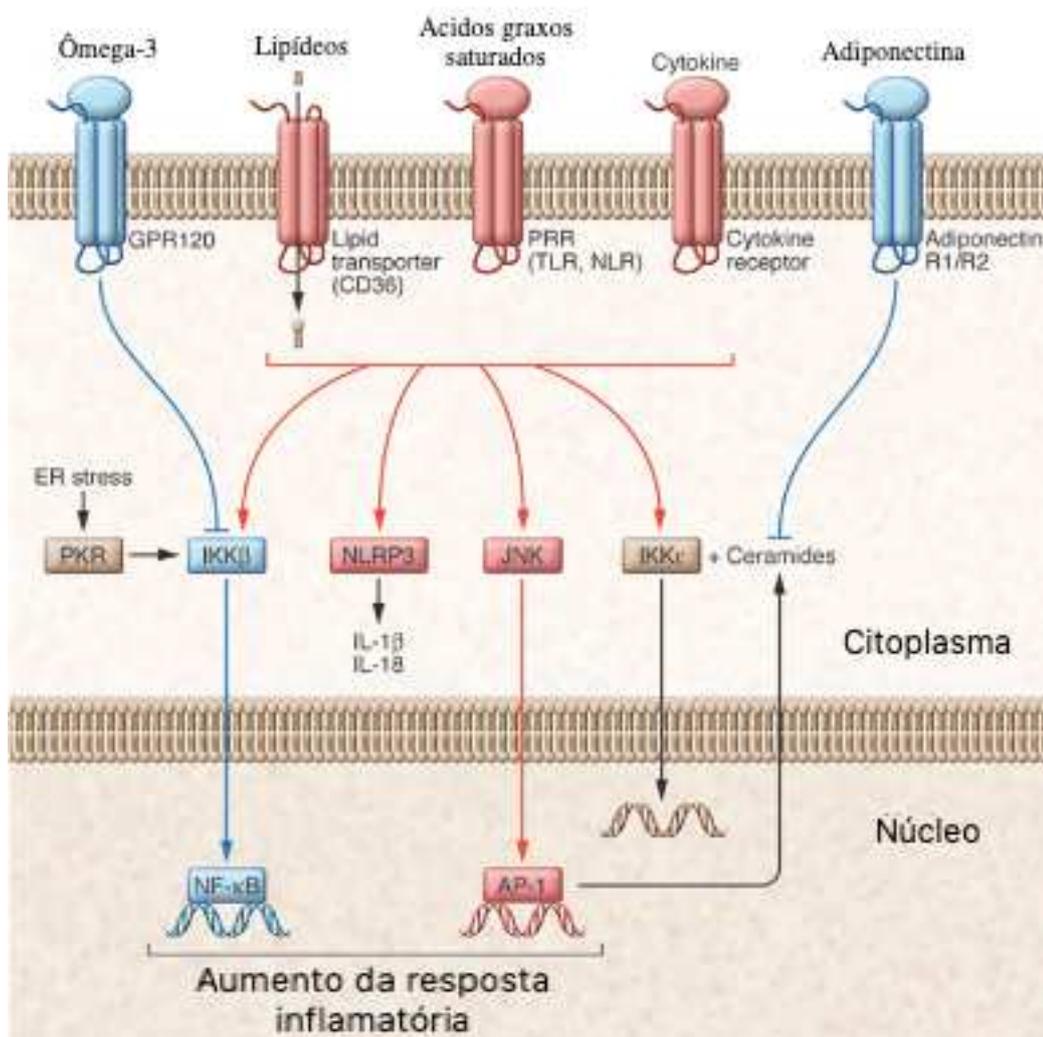


Figura 1. Vias moleculares que conectam a obesidade e a inflamação. Diversas vias participam nos sinais que levam a obesidade induzida por dieta e sinais inflamatórios até chegar a respostas celulares que afetam o indivíduo. Incluindo sinais pro inflamatórios (em vermelho) e anti-inflamatórios (em azul) Adaptado de Lumeng, 2011.

Devido a tantas alterações, já seria esperado uma resposta diferente de indivíduos obesos no caso de infecções. Em geral, animais obesos com deficiência da leptina (*ob/ob*) ou no seu receptor (*db/db*) tem maior susceptibilidade a infecções bacterianas e a pneumonia (MANCUSO, 2010). Outros estudos relataram que camundongos *ob/ob* apresentaram maior carga

pulmonar de *Mycobacterium tuberculosis* (WIELAND et al., 2005) e na depuração retardada dos abscessos de *Mycobacterium* (ORDWAY et al., 2008).

Além disso, evidências sugerem que indivíduos obesos não respondem a vacinação da mesma forma que indivíduos não obesos; por exemplo, a obesidade foi associada com a fraca resposta de anticorpos frente a vacinação para hepatite B, tétano e raiva (FRASCA; BLOMBERG, 2020).

Existem diferentes modelos para estudo da obesidade, utilizando alterações genéticas ou dieta. Entre os modelos transgênicos, os mais usados atualmente são os camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) e os deficientes do receptor da leptina (*db/db*). Estes modelos são muito úteis para o estudo de doenças relacionadas com a obesidade, já que mostram anormalidades metabólicas características da obesidade, como hiperglicemia, dislipidemia, excesso de glicocorticóides e hiperinsulinemia (KENNEDY et al., 2010).

Apesar desses animais modificados geneticamente apresentarem perfil obeso e semelhanças com as doenças metabólicas causadas pela obesidade, eles ainda não são capazes de mimetizar o complexo ambiente obesogênico, e o contexto sistêmico da obesidade, além de apresentarem outras manifestações características da sua modificação e não da obesidade (GUIMARÃES et al., 2020).

Estudos demonstram que a linhagem murina C57BL/6 produz um fenótipo obeso quando ofertadas dietas hiperlipídica e hipercalóricas e quando submetidos a uma dieta pobre em lipídeos e calorias permanecem com o peso normal. Além disso, BUETTNER et al. (2007) demonstraram em um estudo de metanálise que a linhagem C57BL/6 é também o modelo ideal para estudos das desordens metabólicas relativas à obesidade, inclusive estudo do perfil de adipocinas (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; REUTER, 2007). Outro modelo transgênico utilizado no estudo da obesidade são os animais deficientes para apoE (ApoE^{-/-}) que apresentam hiperlipidemia e podem ser um modelo de obesidade induzida por dieta (KENNEDY et al., 2010).

Dentre os modelos de dieta, existem as chamadas dietas de cafeteria, com ingredientes comumente consumidos por seres humanos, ricos em sal e açúcar, como amendoim, misturas com leite condensado, entre outros. Entretanto, esse modelo também afeta o comportamento alimentar dos

camundongos, que podem se tornar obesos por excesso da ingestão alimentar (LALANZA; SNOEREN, 2021).

Um estudo recente comparando diferentes tipos de dietas hiperlipídicas, constatou que uma dieta rica em gordura proveniente de banha de porco enriquecida com açúcar para melhorar o sabor, teve sucesso em modificações do perfil lipídico, aumento de peso e característica da síndrome metabólica causada pela obesidade em humanos (GUIMARÃES et al., 2020).

Os camundongos C57BL/6 se tornam obesos através do consumo de dieta hiperlipídica e desenvolvem as típicas alterações associadas com a obesidade, como elevados níveis de leptina, resistência a insulina e aumento de triglicérides no fígado (MILNER; BECK, 2012). Portanto essa linhagem é considerada susceptível ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta, e tem sido considerado padrão como modelo de estudo por conseguir se aproximar das formas mais comuns da obesidade humana.

2.1.2 Malária

A malária é uma das doenças parasitárias de maior importância para a saúde global sendo responsável por mais de 627 mil mortes no mundo em 2020, no mesmo ano aproximadamente 241 milhões de casos foram registrados. Estima-se que aproximadamente 40% da população mundial está sob risco de transmissão da doença, e embora a incidência de casos de malária tenha caído globalmente desde 2010, a taxa de declínio estagnou e até mesmo inverteu em algumas regiões desde. (OMS., 2021).

No Brasil, a malária é uma doença endêmica na região amazônica, foi registrado no ano de 2020 um total de 145.188 casos de malária, apresentando uma redução de 7,8% em relação ao ano de 2019, porém o número de casos de malária causada por *Plasmodium falciparum* ou malária mista aumentou 38,6 nesse mesmo período. Portanto, é importante observar, que apesar da redução de casos registrados em 2020 a mortalidade aumentou 18,9%, contabilizando 44 óbitos. A razão disso pode ser o aumento de casos de malária por *Plasmodium falciparum* e malária mista, que estão comumente associados aos quadros mais graves da doença (Ministério da Saúde. 2021). Além disso, desde 1992 já são

relatados casos de *Plasmodium vivax* resistentes a cloroquina no Brasil, o principal medicamento para o tratamento da malária usado no país (GARAVELLI; CORTI, 1992).

A malária é causada pelo parasito protozoário unicelular do gênero *Plasmodium*. A transmissão ocorre através da picada do seu vetor, o mosquito *Anopheles*. Cinco espécies causam a doença em humanos, os mais conhecidos *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, as espécies menos prevalentes *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* e o mais recente descoberto a parasitar o homem, *Plasmodium knowlesi* (J. CRAWLEY, C. CHU, G. MTOVE, 2010).

O ciclo de vida é similar entre as espécies, existindo uma fase hepática, uma eritrocítica no hospedeiro vertebrado e uma no interior do vetor. A transmissão natural da malária humana inicia quando uma fêmea do gênero *Anopheles* infectada faz o repasto sanguíneo em um humano e os esporozoítos são injetados junto com a saliva e entram em contato com a derme do hospedeiro vertebrado e conseguem atingir sua corrente sanguínea. Logo eles são levados para o fígado, onde são capazes de invadir e se replicar em células hepáticas, formando esquizontes. Em seguida milhares de merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde infectam as hemácias. Nesse momento os parasitas da espécie *Plasmodium falciparum* podem migrar para locais como o cérebro, pulmões e placenta. Para perpetuar o ciclo, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos, que podem ser ingeridos por um outro mosquito onde eles vão conseguir se reproduzir de forma sexuada. (Figura 2). (ANTINORI et al., 2012; SCHOFIELD; GRAU, 2005).

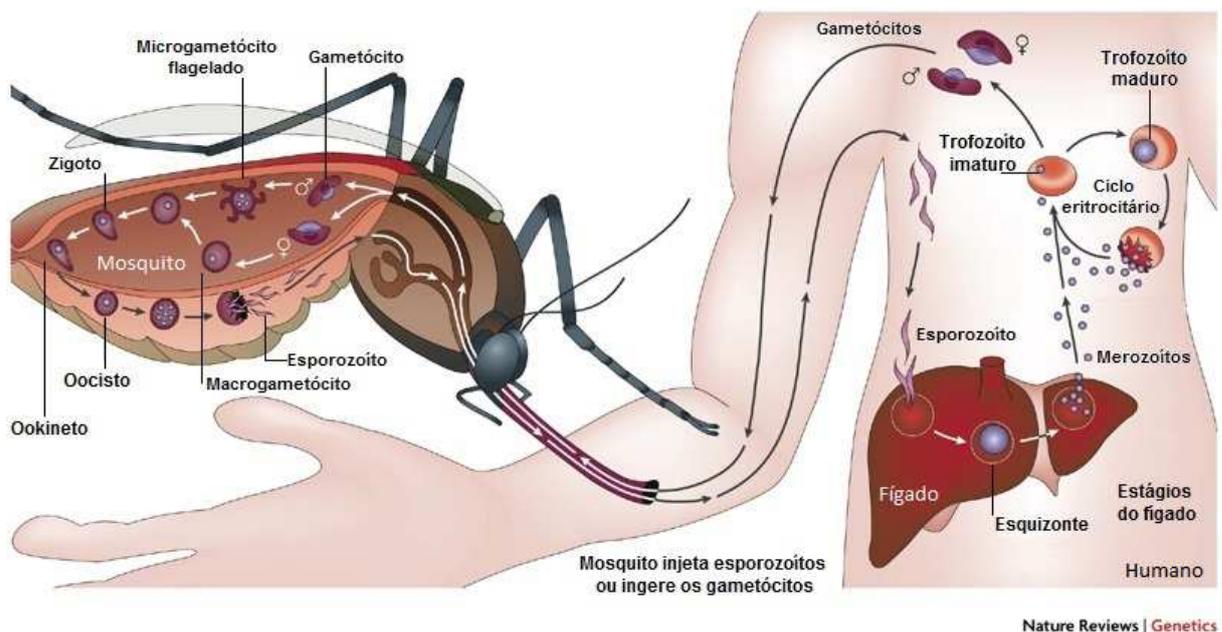


Figura 2. Desenho esquemático demonstrando o ciclo de vida dos parasitas do gênero *Plasmodium*. Adaptado de SU; HAYTON; WELLEMS, 2007.

A enfermidade causada por *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* raramente é motivo de óbito, *Plasmodium vivax* frequentemente é responsável por uma doença com febre aguda, especialmente na Ásia e na América do Sul. O maior número de mortes é associado á infecções por *Plasmodium falciparum*, endêmico na região subsaariana e em muitas outras regiões tropicais (WHO, 2022).

A infecção por esses parasitos pode levar a acessos maláricos, caracterizados por sintomas como: episódios febris, cefaléia, fadiga, mal-estar, dores abdominais, náuseas e vômitos. Os sintomas clínicos da malária são desencadeados a partir da ruptura dos eritrócitos parasitados, que liberam antígenos na corrente sanguínea, ativando a resposta imunológica do hospedeiro (MILNER, 2018).

De acordo com características individuais do hospedeiro como: idade, estado imunológico e fatores genéticos, a infecção por *Plasmodium falciparum* pode evoluir para malária grave, caracterizada pelo sequestro e adesão de eritrócitos infectados em órgãos vitais como pulmões e cérebro, levando a respostas inflamatórias nesses locais que podem ser fatais (FRANKE-FAYARD et al., 2010).

A patogênese da malária cerebral ainda não é completamente compreendida, porém altos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes são associadas a patogênese da malária cerebral em modelos murinos e estudos em humanos, e a maior mortalidade (CLARK et al., 2006; DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017) . Ao mesmo tempo muitos estudos mostram o papel das citocinas pró-inflamatórias na resolução da infecção nos dois tipos de hospedeiros (RILEY et al., 2006). Uma resposta pró-inflamatória deficiente pode levar a persistência e a replicação dos parasitos, enquanto a exacerbação dessa resposta pode levar a respostas imunopatológicas como a malária cerebral.

Os mediadores inflamatórios são repetidamente implicados na gravidade da doença, levando a crer que a malária grave é, pelo menos em parte, uma doença imunomediada, se tornando um alvo interessante de estudos imunológicos (GAZZINELLI et al., 2014; STEVENSON; RILEY, 2004).

Em camundongos a malária cerebral é caracterizada por uma complexa cascata de eventos, incluindo a quebra da barreira hematoencefálica, o sequestro de hemácias parasitadas, o acúmulo de leucócitos no cérebro, e a produção de citocinas pró-inflamatórias (COMBES et al., 2006; NACER et al., 2014).

Uma das etapas mais marcantes para o desenvolvimento da malária cerebral, é o sequestro dos eritrócitos parasitados. Já foi demonstrado o papel fundamental do receptor CD36 na interação com proteínas do *P.berghei* ANKA e seu envolvimento nesse sequestro (CABRERA; NECULAI; KAIN, 2014), além disso, esse receptor também está envolvido na resistência a mortalidade durante a malária não complicada como exemplificado na figura X. Principalmente nos primeiros estágios das fases eritrocíticas, promovendo a fagocitose e a liberação de citocinas pro-inflamatórias. Camundongos infectados por *P. berghei* ANKA expressam maiores níveis de receptores fagocíticos e aumentam seu potencial fagocitário, além de ter maior secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IFN do que animais knockout para CD36 também infectados. (THYLUR et al., 2017)

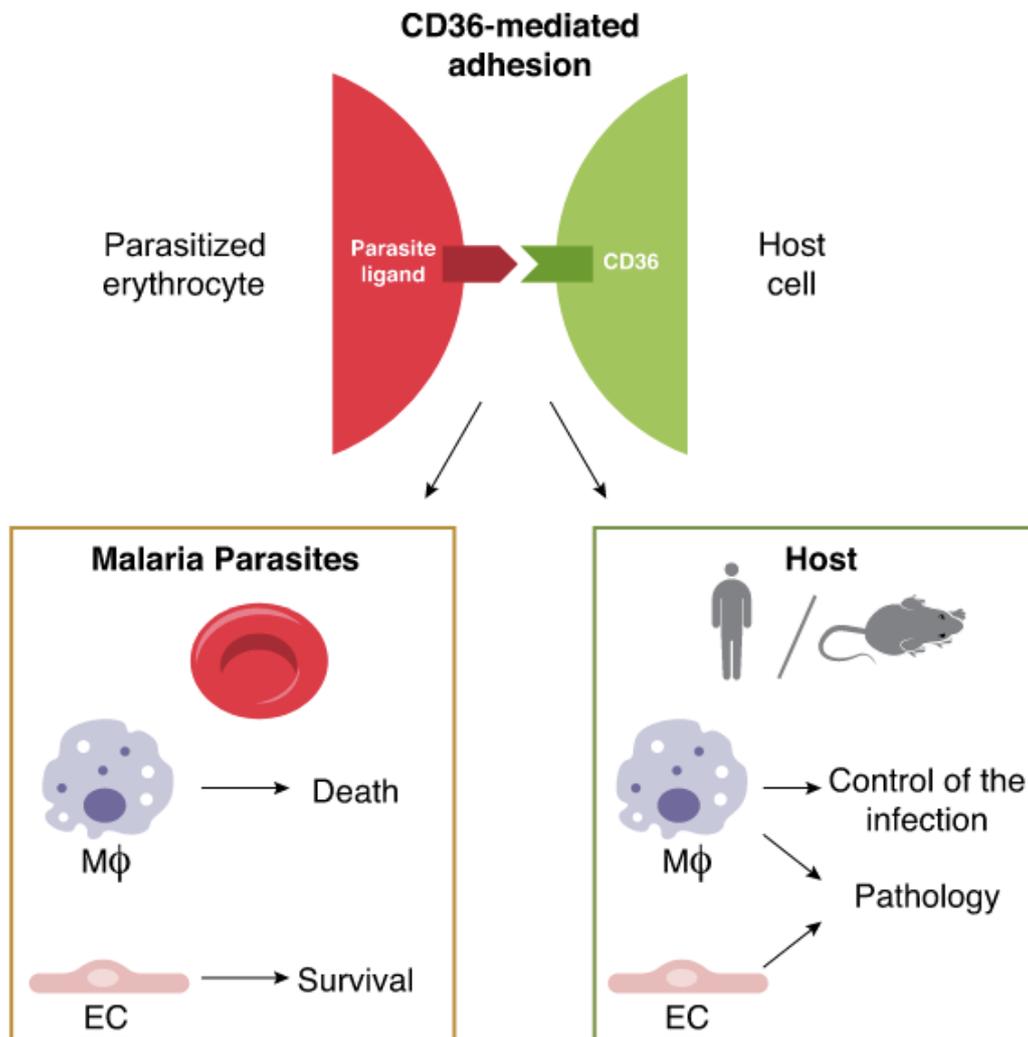


Figura 3. A adesão de eritrócitos infectados ao CD36 tem efeitos opostos na sobrevivência do parasita da malária e na patologia do hospedeiro. O CD36 pode ser expresso na superfície de macrófagos (Mφ) e células endoteliais vasculares (EC). Por um lado, a ligação de hemácias infectadas com *Plasmodium* ao CD36 na superfície dos macrófagos leva à sua ativação, liberação de citocinas pro-inflamatórias e consequentemente a fagocitose e eliminação do parasita. Por outro lado, a ligação de eritrócitos infectados ao CD36 na superfície das células endoteliais é responsável pelo acúmulo de parasitas na microcirculação de órgãos como o tecido adiposo, pulmão e cérebro. Este processo, chamado seqüestro, promove a sobrevivência do parasita, mas também leva a danos no tecido via obstrução vascular, ativação e disfunção das células endoteliais, e resposta inflamatória local. Adaptado de (BRUGAT, 2015).

Outro estudo mostra que camundongos CD36^{-/-} tiveram maior mortalidade quando infectados por *Plasmodium chabaudi chabaudi*, devido a secreção de citocinas prejudicadas e menor eliminação do parasita nos primeiros momentos da infecção, levando a picos de parasitemias mais cedo e maior densidade de parasitas. Evidenciando o papel do CD36 em modular a secreção de citocinas

pelo hospedeiro e o controle parasitário pela resposta imune inata na fase eritrocítica da infecção por malária.(PATEL et al., 2007)

Enquanto no *P. falciparum*, onde a proteína PfEMP1 (P. falciparum-encoded erythrocyte membrane protein 1) foi identificada como o principal ligante parasita que se liga ao CD36, na infecção por *P. berghei* ANKA a proteína responsável pela aderência mediada pelo CD36 ainda é desconhecida (FONAGER et al., 2012).

A resposta imune inata tem um papel fundamental no desenvolvimento da malária, funcionando como primeira linha de defesa para controle da infecção através da eliminação dos parasitas por fagocitose e regulação da resposta imune adaptativa (GAZZINELLI et al., 2014; POHL; COCKBURN, 2022).

Muitos estudos mostram que citocinas pró-inflamatórias Th1 são determinantes cruciais no desenvolvimento da doença. O fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) estão relacionados com os picos febris característicos da patogênese da malária, e estão elevadas em indivíduos infectados (AMANI et al., 2000; ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; CLARK et al., 2008). Além disso, o TNF- α parece estar envolvido com o sequestro dos eritrócitos infectados por estimular a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e CD36 (YIPP et al., 2007).

O IFN- γ é essencial para o desenvolvimento da malária cerebral, sua neutralização previne essa patologia e a produção excessiva de TNF- α . Camundongos deficientes para o gene do IFN- γ ou do seu receptor também foram protegidos da malária cerebral (AMANI et al., 2000; GRAU et al., 1989). Além disso, essa citocina está envolvida na apresentação cruzada de antígenos do no cérebro e na ativação do endotélio cerebral durante a infecção por *P. berghei* ANKA(HOWLAND; POH; RÉNIA, 2015).

As células T CD8+ também são fundamentais na patogênese da malária cerebral. Em camundongos, o número dessas células citotóxicas que se infiltram no cérebro durante a infecção é elevado, e estas contribuem para alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica através de mecanismos dependentes de perforina (NITCHEU et al., 2003; RÉNIA; GRAU; WASSMER, 2020).

A malária cerebral causada por *P. falciparum* em humanos compartilha muitas características com a causada por *P. berghei* ANKA em camundongos e é utilizada como comparação pela sua capacidade de sequestrar hemácias na microcirculação, e quando infectando camundongos susceptíveis provocam os sintomas e sinais típicos da doença em humanos. (SOUZA; RILEY, 2002).

2.1.3 Malária, obesidade e dieta hiperlipídica

A relação entre a obesidade e doenças características de países de primeiro mundo, como doenças cardíacas, câncer, diabetes tipo 2, asma e hipertensão já está bem descrita (BLÜHER, 2019). Porém, a relação da obesidade com importantes patógenos que acometem países em desenvolvimento ainda é pouco estudada. A malária é uma doença que atinge países com baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) e tem sobre eles um impacto negativo sobre a estabilidade social e econômica. (GAZZINELLI et al., 2014). Assim, considerando-se o progressivo crescimento de quadros de obesidade em todo o mundo, as elevadas taxas de mortalidade e morbidade associadas a esta doença e os impactos que causa no sistema imunológico, estudos que avaliem a relação dessa condição metabólica na resposta imune em doenças infecciosas são extremamente necessários.

Ainda são escassos os estudos relacionando a obesidade e infecções parasitárias, que acometem milhares de pessoas em países em desenvolvimento. Com a globalização, a mudança dos hábitos e ao fácil acesso a alimentos gordurosos, países de baixa renda agora se preocupam não apenas com a subnutrição, mas também com a obesidade e enfrentam infecções nesse contexto. (GORYAKIN et al., 2015; MOKHTAR et al., 2001; PRENTICE, 2006).

Os estudos existentes demonstram que cada infecção, com suas particularidades, pode ser afetada de formas diferentes pela obesidade, ou pela dieta hiperlipídica. No caso do consumo da dieta a curto prazo, os estudos são ainda mais escassos, mas já foi demonstrado que a dieta hiperlipídica aumentou a susceptibilidade de camundongos a *Giardia duodenalis* e a *Listeria monocytogenes*, ressaltou o desequilíbrio da microbiota durante a giardíase e

aumentou a expressão de citocinas pro inflamatórias como TNF-a e IL-6 (ALLAIN et al., 2021; HERAS et al., 2019).

A obesidade tem como característica uma inflamação sistêmica de baixo grau crônica, com alterações imunológicas (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011), recentemente tem-se demonstrado que o consumo da dieta hiperlipídica inicia essas alterações no sistema imune rapidamente, (SCHANUEL, 2020). Sendo considerada uma doença imunomediada, as manifestações mais graves da malária, como a malária cerebral, podem ser resultado de resposta inflamatória exagerada causados pelo sequestro de hemácias infectadas (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009) e, portanto, alterações no sistema imunológico afetam de maneira expressiva o desenvolvimento da malária.

Em um estudo utilizando um modelo genético de obesidade, foi demonstrado que camundongos deficientes para leptina (*ob/ob*) não desenvolveram malária cerebral quando infectados por *P. berghei* ANKA e apresentaram um crescente aumento da parasitemia levando à anemia grave, diferente dos animais selvagens (ROBERT et al., 2008). Indicando que a obesidade e suas alterações podem desempenhar um papel protetor na malária e suas manifestações fisiopatológicas e que diferentes fatores podem interferir no desenvolvimento na doença, em especial a leptina, que influi de maneira decisiva no sistema imunológico.

Já foi demonstrado que o desbalanço do estado nutricional do hospedeiro pode afetar a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. A restrição alimentar levou ao menor acúmulo de parasitas e leucócitos no cérebro, protegendo o animal do desenvolvimento da malária cerebral experimental (MEJIA et al., 2015) e por outro lado a obesidade também é capaz de fornecer proteção contra a mesma infecção (OLIVEIRA-LIMA et al., 2019).

Além disso, animais alimentados por dieta hiperlipídica poucos dias antes da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA tiveram menor carga parasitaria no fígado a partir de 48 horas, e muitos animais não desenvolvem sintomas de malária cerebral, nesse estudo a administração de um antioxidante, NAC (N-Acetil-Cisteína), foi capaz de restaurar a infecção e a expressão de marcadores de stress oxidativo. Para saber se a fonte de ROS seria a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria eles usaram um inibidor (etomoxir), conseguindo restaurar

a infecção no fígado e prevenindo a produção de ROS induzida pela dieta, sugerindo que os ácidos graxos advindos das gotas lipídicas acumuladas nos hepatócitos dos animais alimentados por HFD são oxidados na mitocôndria, para servir como fonte de energia, resultando na produção de ROS e eliminação do parasita (ZUZARTE-LUÍS et al., 2017).

Em humanos uma única refeição hiperlipídica é capaz de induzir lipemia, promover remodelação das hemácias, induzir a produção de ROS intracelular e danos oxidativos as membranas das hemácias, aumentou a mieloperoxidase circulante e ligada às hemácias que é suficiente para promover a modificação oxidativa do HDL (BONEN et al., 2006).

Além disso, considerando a composição das dietas hiperlipídica que podem apresentar diferentes equilíbrios entre os ácidos graxos na composição (DOS SANTOS et al., 2013), estudos mostram a ação de ácidos graxos em parasitas causadores da malária. Moumaris e colaboradores mostraram que a inoculação de ácidos graxos durante os primeiros três dias após a infecção por *P. berghei* ANKA foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 dos sintomas da malária cerebral, mas os animais desenvolveram hiperparasitemia não sobreviveram após 25 dias de infecção (MOUMARIS et al., 1995). In vitro, ácidos graxos exógenos insaturados e não esterificados são tóxicos para os parasitas da malária (FITCH; CAI; SHOEMAKER, 2000) e a oxidação de ácidos graxos já foi apontada como a maior fonte de ROS em modelos com dieta hiperlipídica prolongada (CARDOSO; KAKIMOTO; KOWALTOWSKI, 2013). Utilizando modelo in vitro e in vivo, o tratamento com ácido linolênico (ômega 3) e ácido linoleico (ômega 6) tiveram uma potente ação inibidora da parasitemia de *Plasmodium berghei* (MELARIRI et al., 2012).

Em resultados anteriores no nosso grupo, ainda não publicados, animais alimentados por dieta hiperlipídica foram capazes de controlar a parasitemia desde o início da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA e impedir o desenvolvimento da malária, garantindo assim a sobrevivência de 100% dos indivíduos obesos por dieta infectados. Além disso, diferentes vias de infecção foram testadas para observar se a parasitemia estava sendo controlada por uma barreira física do tecido adiposo dos animais obesos, e mesmo através da

infecção via retro orbital foi demonstrada a proteção dos animais obesos frente a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Figura com resultados

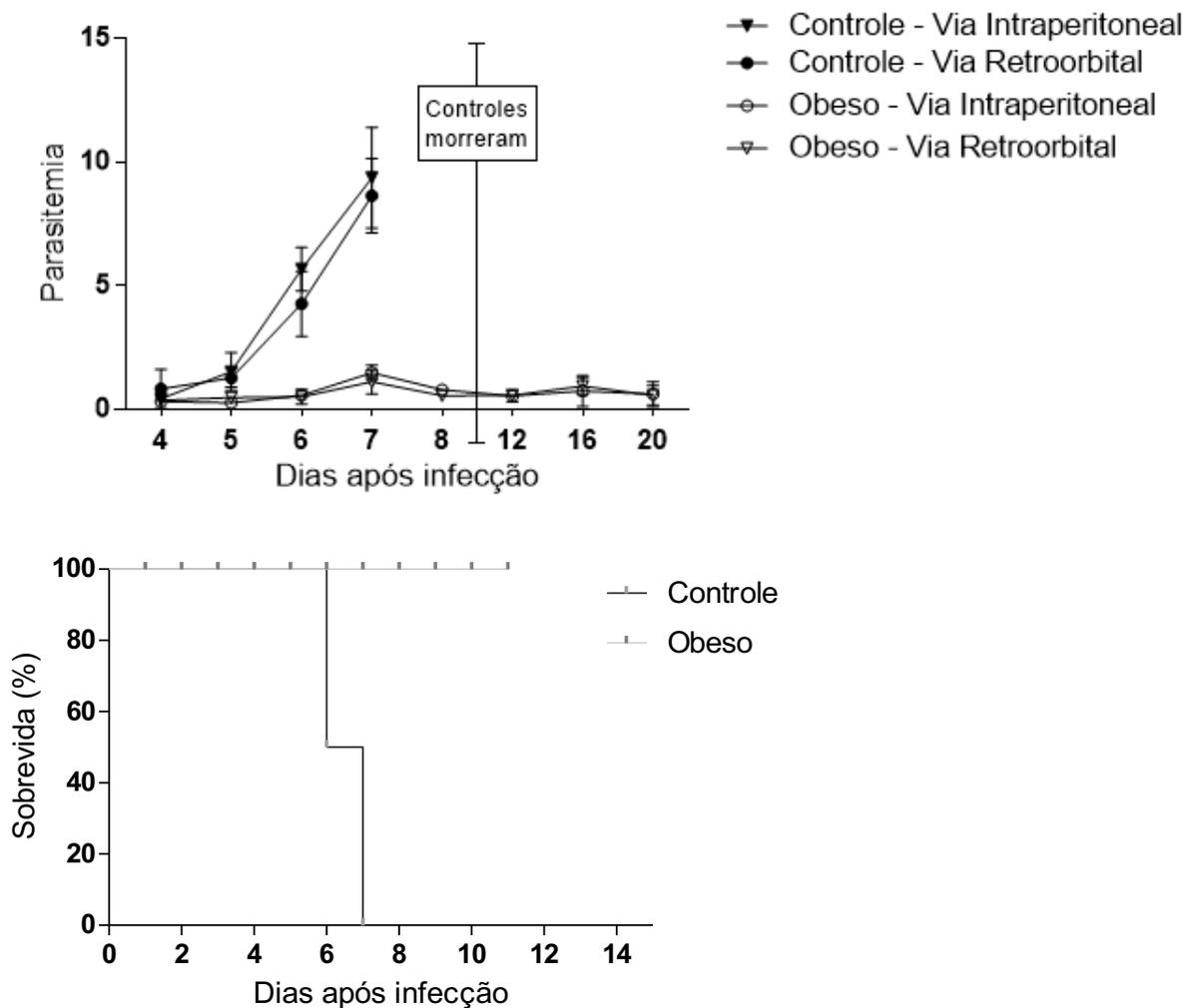


Figura 4. Proteção contra o desenvolvimento da malária em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. (n = 7 controles e 20 obesos).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da dieta hiperlipídica no curso da infecção malárica experimental induzida por *Plasmodium berguei* ANKA.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desenvolvimento da malária induzida por *Plasmodium berghei* NK65 em animais obesos.
- Avaliar o desenvolvimento da malária induzida por *Plasmodium berghei* ANKA em animais apoE^{-/-}.
- Avaliar a permeabilidade vascular do cérebro de camundongos controles, obesos e ApoE^{-/-} infectados por *Plasmodium berguei* ANKA
- Comparar a parasitemia e o desenvolvimento da infecção por *Plasmodium berguei* ANKA de camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica a curto prazo.
- Avaliar a secreção de citocinas no tecido adiposo e no baço de animais alimentados por dieta hiperlipídica após infecção por *Plasmodium berguei* ANKA.
- Avaliar se o consumo de ômega 3 altera o desenvolvimento da malária induzida por *Plasmodium berghei* ANKA.
- Avaliar se a administração de um antioxidante reverte o efeito da dieta hiperlipídica em animais infectados por *Plasmodium berguei* ANKA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em ambiente climatizado, em gaiolas coletivas, luminosidade controlada para um fotoperíodo de 12h/12h, livre acesso a água filtrada e ração controlada para controles e obesos. Os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com as normas propostas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (Protocolo número 019/2018).

4.2 Delineamento Experimental

Para avaliar os efeitos da obesidade na resposta imunológica durante a malária grave, foi utilizado o modelo de camundongos obesos obtidos através de dieta rica em gordura.

O primeiro experimento foi realizado após 12 semanas de dieta, e o objetivo foi a avaliação da parasitemia e mortalidade dos camundongos controles e obesos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA.

Com o intuito de avaliar a influência da ingestão de dieta hiperlipídica a curto prazo em resposta infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, os animais foram divididos em dois grupos e um deles foi alimentado por dieta hiperlipídica por 5 dias e o outro com a dieta padrão, ambos os grupos foram infectado após esse período e a parasitemia foi acompanhada.

4.3 Indução da obesidade

A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica produzida no laboratório de Imunologia da UFJF, com a pesagem e mistura de cada um dos componentes (Tabela 1), a fim de obter uma porcentagem de 60% de gordura mantendo a equival de proteínas, vitaminas, minerais e fibras da ração padrão dos controles.

A quantificação da ingestão alimentar foi obtida pesando-se a dieta ofertada no início e no final de cada semana. A diferença entre a dieta ofertada e o restante não consumido foi considerada o consumo semanal. Os animais foram pesados semanalmente em balança semi-analítica para avaliar a evolução ponderal. No dia que antecedeu ao sacrifício os animais foram pesados em balança de precisão para a aquisição do peso corporal final.

Tabela 2: Componentes para 1Kg da ração hiperlipídica (HFD)

Ingrediente	Peso (g)
Caseína	200,0
Sacarose	100,0
Amido de milho	115,5
Amido Dextrinizado	132,0
Banha	312,0
Óleo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mistura de minerais AIN-93	35,0
Mistura de vitaminas AIN-93	10,0
L- Cistina	3,0
Bitartarato de Colina	2,5

4.4 Infecção por *P. berghei* ANKA e eutanásia dos animais

A linhagem de *Plasmodium berguei* da cepa ANKA foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Kézia K. G. Scopel do Laboratório de Parasitologia da UFJF. Dois camundongos foram previamente infectados por uma amostra da cepa congelada para serem utilizados como repique e quando a parasitemia alcançou 7% esses animais foram sacrificados por anestesia e seu sangue utilizado para infectar os grupos experimentais. Os animais foram infectados por injeção intraperitoneal com 10^6 hemácias parasitadas e os controles receberam uma injeção pelas mesmas vias de solução salina.

4.5 Avaliação da progressão da doença

O acompanhamento do estado do animal durante a progressão da malária cerebral foi feito utilizando a escala rápida de comportamento e coma murino (Rapid murine coma and behavior scale - RMCBS), que permite a avaliação objetiva e quantitativa do curso natural da malária cerebral.

O protocolo RMCBS foi feito como descrito por Carroll et al., (Carroll et al., 2010) é composto por 10 parâmetros (marcha, equilíbrio, capacidade motora, posição corporal, força, escape ao toque, reflexo pineal, beliscada das patas, agressão e grooming). A pontuação de cada habilidade varia de 0 a 2, sendo 20 a pontuação máxima e que indica a ausência de dano neurológico e sintomas característicos da malária cerebral (Carroll et al., 2010). No presente estudo o protocolo foi utilizado para comparação da progressão da doença em camundongos obesos e controles, além de indicar o momento apropriado para eutanásia.

Tabela 3: Escala rápida de comportamento e coma murino

Parâmetro	Pontuação	Descrição
Coordenação		
Marcha	(0-2)	Nenhum - ataxico- normal
Balanço/Equilíbrio	(0-2)	Sem alongamento do corpo - alongamento patas dianteiras - alongamento o corpo inteiro
Comp. Exploratório		
Desempenho Motor	(0-2)	Nenhum- 2 a 3 cantos explorados em 90 seg.- 4 cantos explorados em 20 seg.
Força e Tônus		
Posição do corpo	(0-2)	De lado- curvado- normal
Força dos membros	(0-2)	Sem força- força só patas dianteiras- normal
Ref. Autopreservação		
Nenhum		
Fuga ao toque	(0-2)	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Ref. Pavilhão auricular	(0-2)	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Beliscão dedo do pé	(0-2)	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Agressão	(0-2)	Nenhum – tentativa de mordida e normal
Higiene		
Grooming	(0-2)	Com faixas de pelo fora do lugar - piloereção - Normal / com brilho

Adaptado de Carroll RW et al.

4.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por Quetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal em aproximadamente 300µl por animal, seguidas de exsanguinação pelo plexo axilar.

4.7 Avaliação da permeabilidade vascular cerebral

Para comparar a permeabilidade vascular cerebral entre os animais do grupo controle e do grupo obeso foi realizado a avaliação da integridade do endotélio vascular do cérebro dos animais infectados pelo método de coloração de azul de Evans quando os animais do grupo controle apresentaram score da escala rápida de comportamento e coma murino menor que 5.

Para esse fim os camundongos foram anestesiados com 150uL de solução de 60 mg/kg de cetamina, 8mg/kg de xilazina em solução salina a 0,9% por via intraperitoneal. O corante azul de Evans a 2% foi diluído em solução salina a 0,9% e injetado pela via retro orbital. Após 50 minutos os camundongos foram eutanasiados por excesso de anestésico, perfundidos e os cérebros coletados e fotografados. O corante quando injetado na corrente sanguínea se liga a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. Se ocorre uma alteração na integridade da parede endotelial vascular o corante extravasa do lúmen vascular e se fixa no tecido intersticial.

4.8 Imunofluorescência

Para a análise dos adipócitos por imunofluorescência, o tecido adiposo perigonadal coletado foi emblocado em blister contendo Tissue-Tek OCT (Sakura) e posteriormente levados ao criostato (Leica CM 1850) para o preparo das lâminas. Para a visualização dos núcleos foi feita marcação com DAPI (Invitrogen) na concentração de 1ng/mL por 40 minutos. As lâminas foram encaminhadas ao Microscópio Olympus BX41 para análise da imunomarcação.

4.9 Níveis de citocinas

As dosagens dos níveis séricos de citocinas foram realizadas por citometria de fluxo utilizando alíquotas de cérebro e baço murinos macerados

com solução de extração de citocinas após o período experimental. O Kit CBA (Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD®) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17^a em uma mesma amostra segundo as instruções do fabricante. Sete populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD). As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois, incubadas com as amostras para formar o “ensaio sanduíche”. Os tubos para aquisição foram preparados com 25 μ l de amostra, 25 μ l da mistura de *beads* e 25 μ l do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE (Mouse Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por duas horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software FlowJo.

4.10 Extração de RNA

A extração de RNA total do tecido adiposo foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 1mL do reagente TRIzol® foi colocado com 100mg de tecido adiposo em microtubo RNase free. Um homogenizador foi utilizado para a maceração dos tecidos. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. A camada de gordura sobrenadante foi descartada. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e os microtubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos e deixados em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 12000 rpm, por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo que já continha 0,5mL de isopropanol. Os microtubos foram agitados manualmente por inversão por 1 minuto. Após esse tempo, os microtubos foram centrifugados novamente a 12000 rpm, por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado.

Foi adicionado à amostra 1 mL de álcool 75% seguida de mais uma centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi emborcado em papel filtro e cerca de 5 a 10 minutos após, foram adicionados 30µL de água milli Q. As amostras foram mantidas a -80°C até posterior utilização.

4.11 Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa

A síntese de cDNA foi realizada pela técnica de transcrição reversa (RT), a partir das fitas de mRNA. A enzima usada para essa reação foi a Transcriptase Reversa (Applied Biosystems) e, além disso, foram adicionados os seguintes reagentes ao microtubo: dNTP, random primers, RT buffer e H₂O RNase free. Os tubos foram incubados a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos seguindo as orientações do fabricante. Os microtubos contendo cDNA foram armazenados a -20°C para posterior utilização.

4.12 Real time PCR

O cDNA foi amplificado pela técnica de *Real Time* PCR. Para tal, foi utilizada microplaca de 96 poços específica para RT-PCR. Um mix contendo 10 µL Sybr Green; 0,4 µL de cada iniciador (concentração de 10 µM) e 4,2 µL de água para PCR foram misturados para cada amostra adicionados a 5µL de cDNA puro. Após a pipetagem, a microplaca foi selada com filme plástico próprio. A placa foi então colocada na máquina de RT-PCR (StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA) e programada da seguinte maneira: um passo inicial de 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Por fim, na curva de dissociação, usou-se 95°C por 15 segundos, seguidos de 60°C por 1 minutos e 95°C por 15 segundos.

O nível relativo de expressão gênica foi determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e foi normalizado pela expressão de β -actina.

As seguintes sequências de primers foram utilizadas:

	Forward	Reverse
5' - 3'		
β -actina	CCACCATGTACCCAGGCATT	ACGCAGCTCTCAGTAA CAGTCC
18s	AAGCATTAAATAAAGCGAATACA TCCTTAC	GGAGATTGGTTTTGAC GTTTATGTG
CD36	ATTCCCTTGGCAACCAACCA	CGTGGCCCGGTTCTAA TTCA

4.13 Estatística

Para análise estatística dos resultados e comparação dos grupos infectados, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS, considerando como significativo $p < 0.05$. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentam proteção contra *Plasmodium berghei* ANKA.

Com o objetivo de avaliar a progressão da malária cerebral experimental em camundongos obesos, camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos em dois grupos, um deles foi submetido à dieta hiperlipídica (HFD) por 12 semanas enquanto o segundo grupo consumiu a dieta comercial padrão. A evolução ponderal dos grupos foi acompanhada semanalmente a partir do primeiro dia de oferta da dieta hiperlipídica. Foi possível observar uma significativa diferença no ganho de peso dos animais do grupo de indução de obesidade a partir da 5ª semana, levando a um distanciamento de valores cada vez maior entre os dois grupos. Portanto, partindo de um peso inicial similar, podemos verificar que os animais alimentados por dieta hiperlipídica tiveram maior aumento de peso ao serem comparados aos animais alimentados com a

dieta padrão, e que entre a 9ª e a 12ª semana a diferença estatística entre os dois grupos se estabeleceu (Figura 1a).

Ao avaliar o consumo alimentar ao longo de 12 semanas, podemos observar que os animais do grupo obeso, consumiram uma quantidade menor de ração em comparação com os animais do grupo controle, revelando que o aumento de peso se deve a composição da dieta e não a sua quantidade (Figura 1b).

Além do aumento da massa corporal dos animais, o aumento do peso do tecido adiposo perigonadal também pode ser utilizado como um marcador da obesidade. Como observado na figura 1c, ao final de doze semanas com a alimentação hiperlipídica, podemos observar um aumento significativo no peso do tecido adiposo perigonadal desses animais em relação aos camundongos do grupo controle.

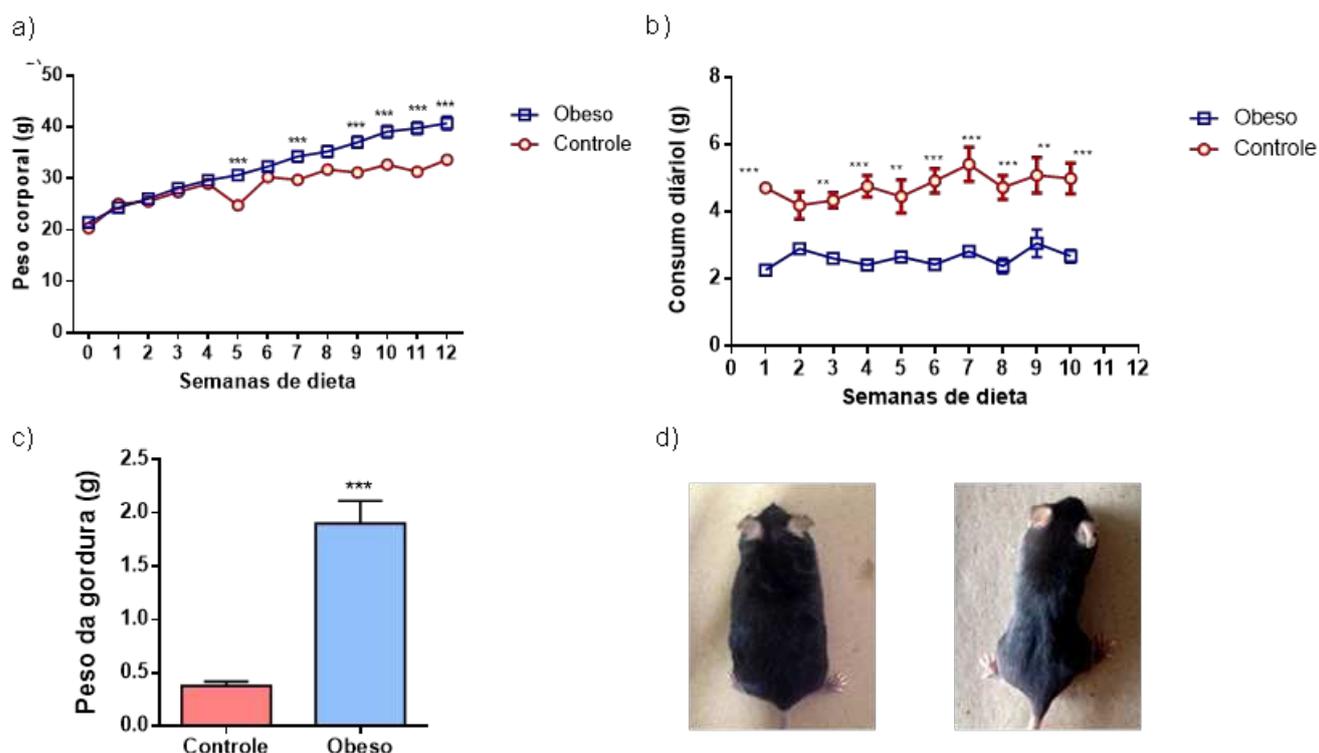


Figura 5. Indução da obesidade por dieta hiperlipídica ao longo de 12 semanas. a) Evolução do peso corporal. Os animais foram pesados uma vez por semana, durante as doze semanas. b) Evolução do consumo de ração. O consumo de ração foi registrado semanalmente através do peso de ração encontrado na gaiola no período de 48h. c) Peso do tecido adiposo perigonadal. Ao final das 12 semanas, os animais foram eutanasiados e seus órgãos coletados para análise e peso. d) imagens ilustrativas para comparação entre camundongos alimentados por dieta HFD ou dieta padrão após 12

semanas. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). N=10

Como já observado em experimentos anteriores em nosso laboratório, os animais do grupo obeso também tiveram a parasitemia controlada e próxima de zero (Figura 2a), Para avaliar o comprometimento neurológico dos animais infectados, foi utilizada uma escala quantitativa de comportamento e coma murino (RMCBS - Rapid murine coma and behaviour scale), desenvolvida por Carroll e colaboradores em 2010 (CARROLL et al., 2010), na qual dez parâmetros são analisados para acessar as manifestações neuronais da malária cerebral experimental murina em camundongos C57BL/6 (Figura 6)

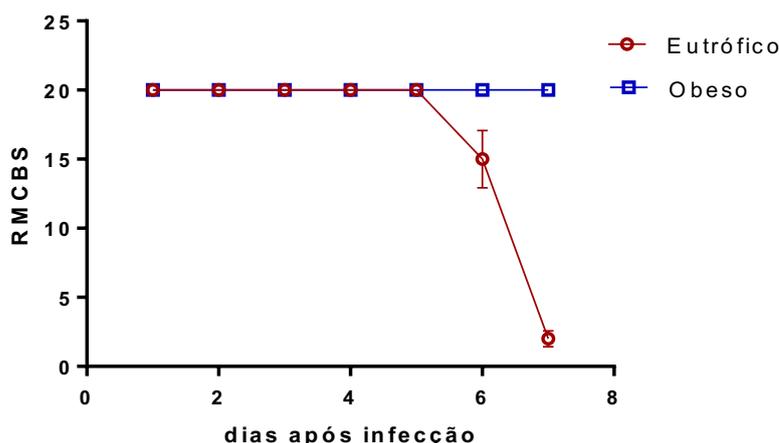


Figura 6. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica. Curva de RMCBS dos grupos controle e obesos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA. Os dados representam os escores dos sintomas neurológicos característicos do modelo murino de malária cerebral (ECM). Com o símbolo quadrado em azul representando os animais do grupo obeso, e o círculo vermelho representando os animais do grupo controle N=5

De acordo com esses resultados, foi possível reafirmar que o consumo da dieta hiperlipídica produzida no laboratório induziu a obesidade após 12 semanas e que a infecção desses animais por *Plasmodium berghei* ANKA não se desenvolveu como nos animais controle, sem apresentar nenhum sinal clínico relacionado a malária.

5.2 Animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 12 semanas não apresentam proteção contra *Plasmodium berghei* NK65.

Visando verificar se a proteção da obesidade contra infecção se estendia para outra linhagem de *Plasmodium*, os animais obesos e controles foram infectados com *Plasmodium berguei* NK65, responsável por uma infecção com desenvolvimento mais lento, atingindo maior parasitemia, porém, também letal. O curso temporal da doença foi obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção. Durante este período, foi possível observar que os animais do grupo controle desenvolveram a doença e foram a óbito mais rapidamente, porém sem diferença significativa quando comparados aos animais do grupo obeso. Portanto, foi demonstrado que a obesidade não foi capaz de proteger o desenvolvimento da malária em infecção por *Plasmodium berghei* NK65.

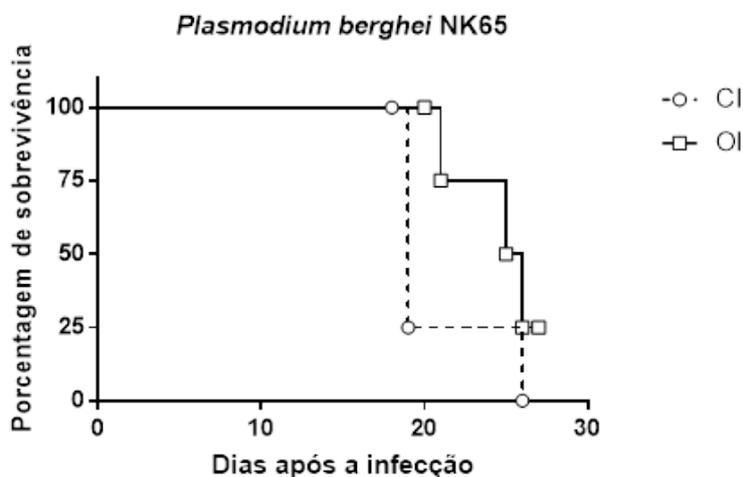


Figura 7. Desenvolvimento da malária por *Plasmodium berghei* NK65 em camundongos alimentados por dieta padrão ou hiperlipídica. Porcentagem de sobrevivência dos animais controle (CI) e obesos (OI) após a infecção por *Plasmodium berguei* NK65 (CI, n = 4; OI, n = 5). P valor determinado de acordo com o teste log-rank Mantel-Cox Chi-squared.

5.3 Modelo animal de camundongo apoE^{-/-} tem desenvolvimento da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA alterada.

Para avaliar o desenvolvimento da infecção por *Plasmodium berguei* ANKA em animais knockout para a Apolipoproteína apoE, condição bem descrita como protetora da malária cerebral, a parasitemia desses animais foi acompanhada diariamente, demonstrando que, de fato, houve proteção contra os sinais clínicos da malária cerebral descritos anteriormente. Entretanto, a parasitemia continuou crescente em animais apoE^{-/-} até o 14º dia após infecção.

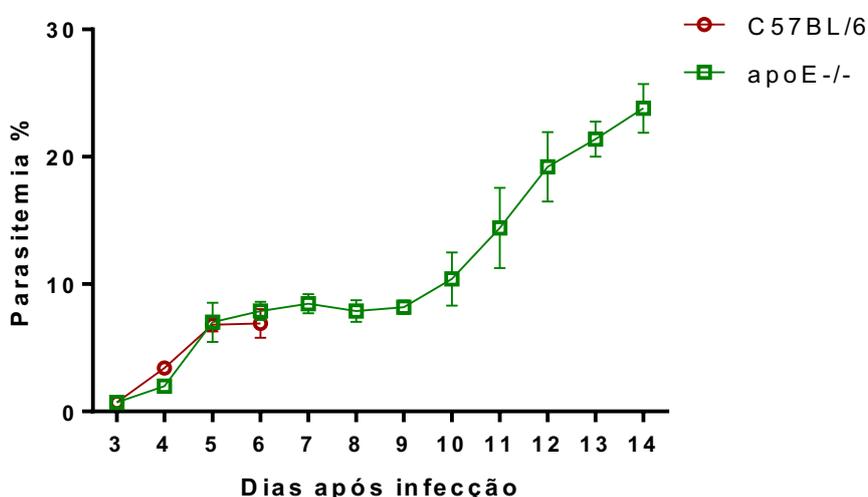


Figura 8. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos apoE^{-/-}. Média das parasitemias diárias dos animais selvagens e apoE^{-/-}, a partir do terceiro dia de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

O aumento da permeabilidade vascular cerebral é uma das principais características na patogênese da malária cerebral, comumente explicada pelo processo inflamatório agudo causado pelo sequestro de hemácias infectadas na microvasculatura cerebral e adesão de linfócitos na região (VAN DER HEYDE et al., 2006).

Nesse sentido, o modelo animal apoE^{-/-} foi usado para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica. Utilizou-se a técnica do Azul de Evans no sexto dia de infecção em que animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos críticos de acordo com o índice RMCBS, descrito anteriormente.

Seguindo os resultados de parasitemia supracitados, foi demonstrado menor extravasamento do corante para os capilares do cérebro em animais obesos infectados e do grupo apoE^{-/-} quando comparados aos animais do grupo controle infectados por *Plasmodium berghei* ANKA. Portanto, no grupo controle infectado, houve maior permeabilidade vascular, característica da quebra da barreira hematoencefálica observada nesse modelo de malária cerebral experimental (ECM) (FRANKE-FAYARD et al., 2010).

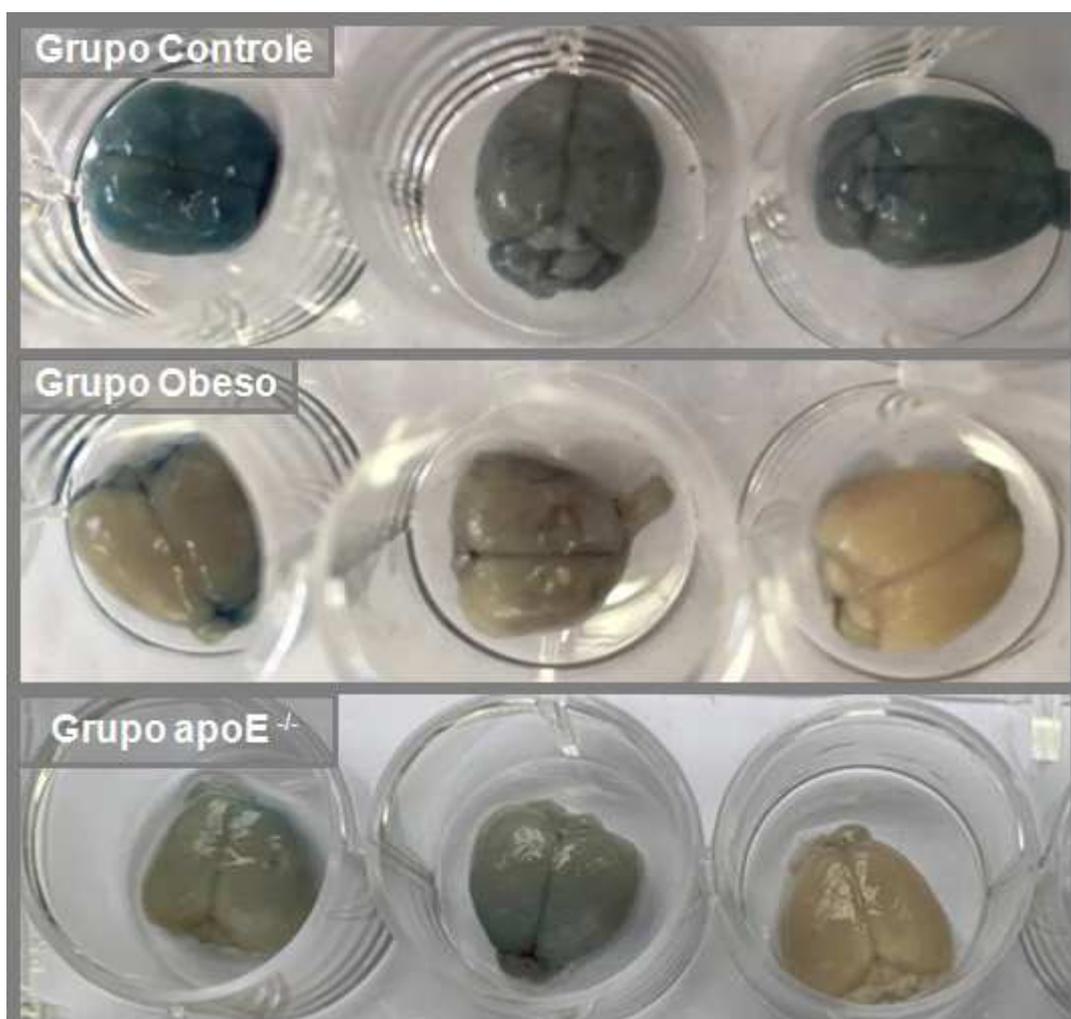


Figura 9. Avaliação da permeabilidade vascular cerebral por corante Blue Evans. Imagens ilustrativas do cérebro de animais do grupo controle, obeso e apoE^{-/-} após ensaio com coloração do corante Blue Evans no sexto dia após infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

5.4 Consumo de dieta hiperlipídica por curto prazo protege contra infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

Com o objetivo de avaliar o papel da dieta hiperlipídica padronizada no nosso laboratório, na proteção contra malária encontrada nesse modelo, animais alimentados por dieta hiperlipídica durante 5 dias (grupo HFD) foram infectados pelo *Plasmodium berghei* ANKA e a parasitemia foi acompanhada diariamente.

De forma surpreendente, os animais alimentados por tão curto prazo por essa dieta hiperlipídica, com lipídeos advindos de banha de porco e óleo de soja, não desenvolveram a malária cerebral, mantendo a parasitemia controlada de forma semelhante aos animais obesos, enquanto os animais do grupo controle tiveram a parasitemia crescente e sinais clínicos da malária cerebral aparentes ao longo dos dias após a infecção.

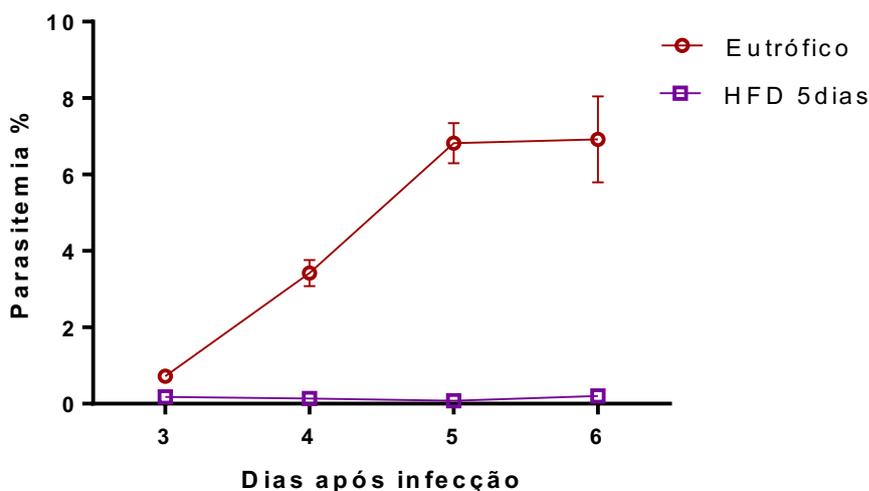


Figura 10. Avaliação da parasitemia de camundongos alimentados por 5 dias de dieta hiperlipídica. Média das parasitemias diárias dos animais eutróficos e alimentados por dieta hiperlipídica a curto prazo, a partir do terceiro dia de infecção.

5.5 Aumento de citocinas no baço independe da parasitemia periférica.

Considerando que a etapa eritrocítica é bastante intensa na infecção por malária, o baço, órgão do sistema imune responsável pela remoção de células e partículas presentes na circulação sanguínea, e na ativação da resposta imune

inata e adaptativa, desempenha uma função fundamental durante a resposta imunológica a esses parasitas (GHOSH; STUMHOFER, 2021).

Um dos sinais clínicos da malária em humanos é o aumento do baço, a esplenomegalia, e pacientes diagnosticados com malária grave apresentam aumento desse órgão quando comparados aos infectados por sepsis (GUTHMILLER et al., 2017).

Quando comparamos o peso do baço dos grupos de animais infectados, eutanasiados no sétimo dia após a infecção, foi observado um peso significativamente maior nos animais do grupo HFD e apoE^{-/-}. Se tratando do grupo apoE^{-/-}, trata-se de um resultado esperado devido à alta parasitemia, e, portanto, alta filtragem de eritrócitos rompidos com ação do sistema imunológico no baço. Porém, considerando a parasitemia dos animais do grupo HFD ficou aproximadamente zero desde o primeiro dia de infecção, se torna um resultado surpreendente.

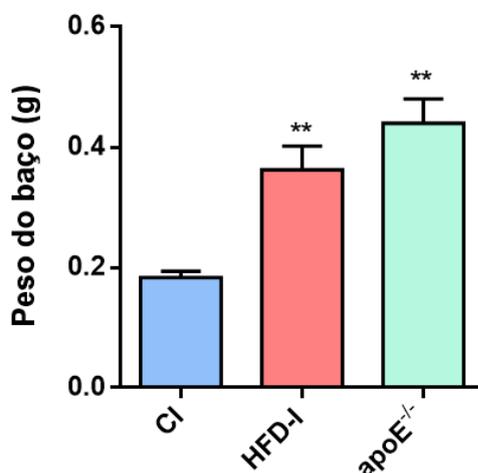


Figura 11. Peso do baço de animais infectados por Plasmodium berghei ANKA. Baço dos animais do grupo eutrófico, HFD e apoE^{-/-}. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), e foram analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). N=5

Neste trabalho foi possível verificar que, apesar da ausência de progressão da parasitemia nos animais alimentados por HFD infectados, a produção de citocinas entre os grupos infectados foi semelhante. Em particular,

as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na malária, IFN- γ e TNF- α , se mantiveram altamente expressas em ambos os grupos infectados, quando analisadas por Cytometric Bead Array (CBA).

Além disso, a presença da citocina IL-10 permaneceu semelhante nos dois grupos infectados, diferente do grupo controle não infectado. Houve uma discrepância significativa entre a presença de IL-4 no baço de animais alimentados por HFD e animais infectados do grupo controle.

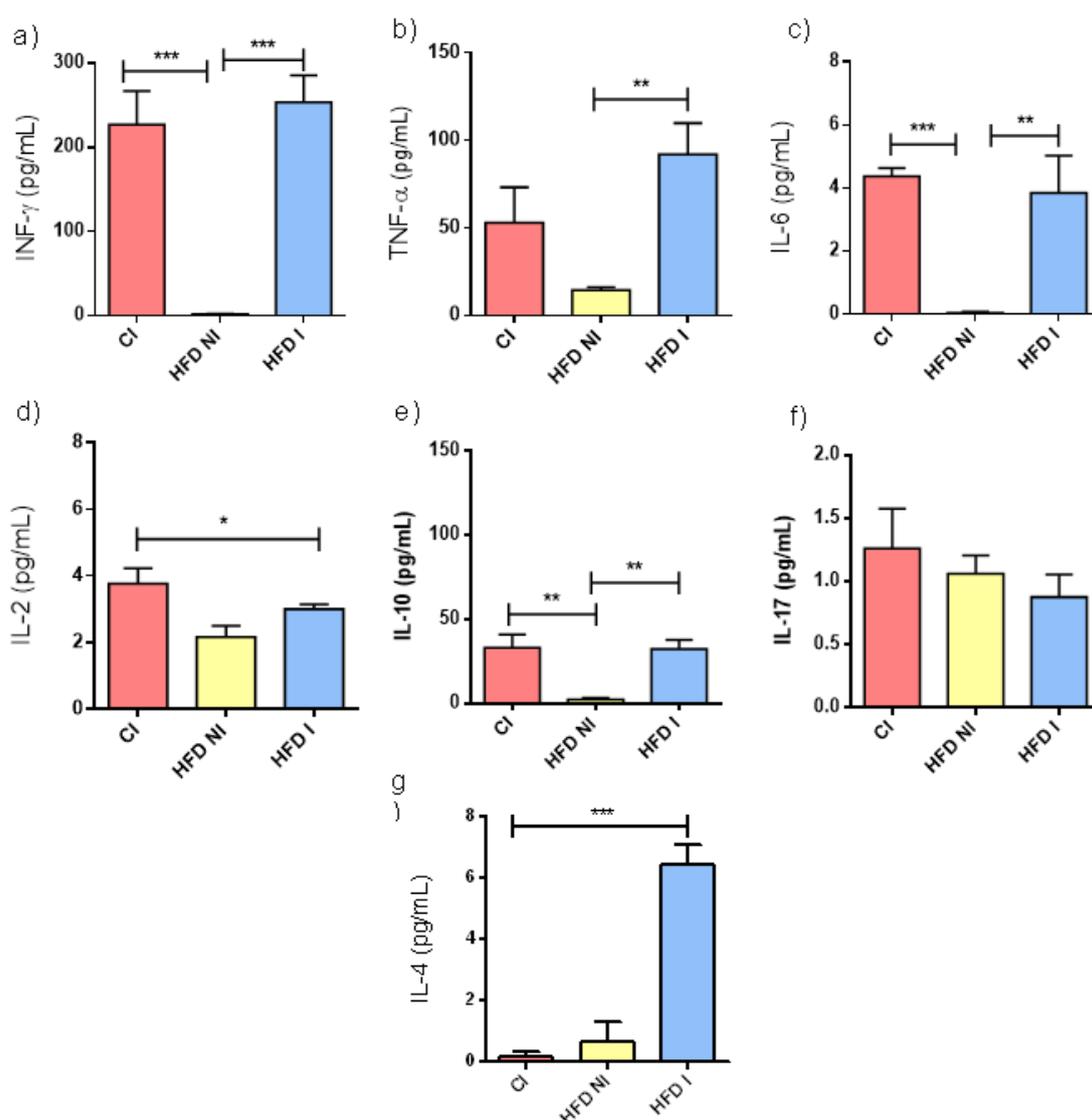


Figura 12. Efeito da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA na produção de citocinas no baço. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta padrão durante cinco dias e infectados por *Plasmodium berghei* ANKA. No sexto dia após a infecção os animais foram eutanasiados o baço foi retirado e um

homogenato do órgão foi preparado para análise por CBA. valores expressos em média \pm EPM (n=5); ??? teste e n

5.6 Avaliação do tecido adiposo de animais alimentados por dieta hiperlipídica a curto prazo infectados por *Plasmodium berghei* ANKA.

O tecido adiposo é um local de especial interesse devido ao fato de ser rapidamente afetado por uma dieta hiperlipídica, além de ser um local de resposta inflamatória e notável ambiente de sequestro de eritrócitos infectados durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (TANOWITZ et al., 2017).

Após 11 dias de dieta hiperlipídica (5 dias antes da infecção, e 6 dias durante a infecção), já foi possível observar o aumento visual dos adipócitos e aumento significativo de peso do tecido adiposo perigonadal.

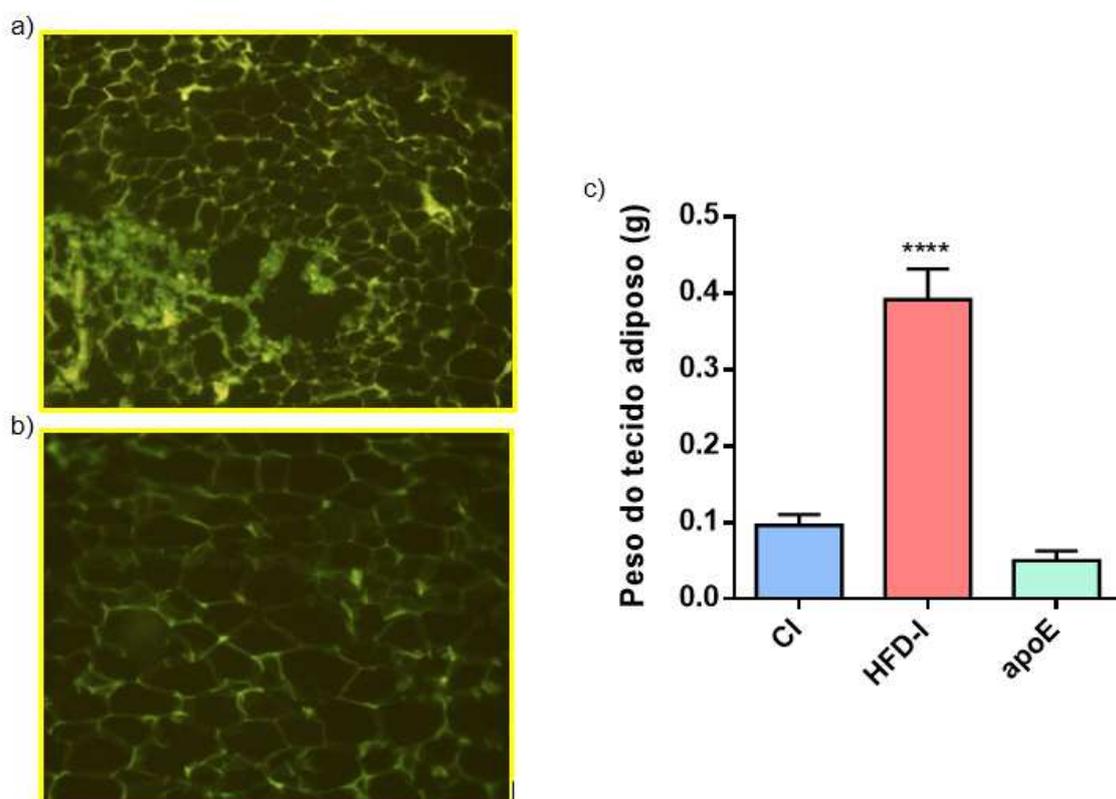


Figura 13. Alterações no tecido adiposo após consumo de dieta hiperlipídica a curto prazo. a) Fotomicrografia do tecido adiposo de animal submetido a dieta padrão. b) Fotomicrografia do tecido adiposo de animal submetido a dieta hiperlipídica. c) Peso do tecido adiposo de animais dos grupos controle, HFD, e apoE^{-/-} no sexto dia após a infecção.

A infecção por *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 tem como característica o sequestro dos parasitas para locais estratégicos do hospedeiro. Assim, um dos órgãos com maior carga parasitária, nesse caso, é o tecido adiposo (FRANKE-FAYARD et al., 2010). Com o objetivo de verificar se o aumento do tecido adiposo nos animais alimentados por dieta hiperlipídica foi o responsável por controlar a parasitemia, atuando como um polo atrativo, foi comparada a expressão gênica de Pb18S no tecido adiposo para verificar sua carga parasitária nos diferentes grupos.

Contrariando nossa hipótese, a carga parasitária se mostrou aumentada apenas nos animais do grupo eutróficos infectado, condizente com a parasitemia periférica. Já os animais alimentados por dieta HFD tiveram a carga parasitária do tecido adiposo reduzida, indicando que o processo de sequestro dos parasitas para essa região também foi evitado.

Recentemente, foi descrito na literatura que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica, estimulou a expressão do receptor CD36 em pré-adipócitos, levando ao seu desenvolvimento para adipócitos maduros (LUO et al., 2020). Sendo um dos principais receptores envolvidos no sequestro de eritrócitos infectados para os tecidos, avaliamos sua expressão no tecido adiposo.

A expressão do receptor CD36 estava significativamente elevada nos animais do grupo eutrófico infectado, e apesar de haver uma tendência de aumento nos animais alimentados por dieta hiperlipídica, a expressão dessa molécula ainda não alcançou o nível dos animais com a parasitemia mais alta.

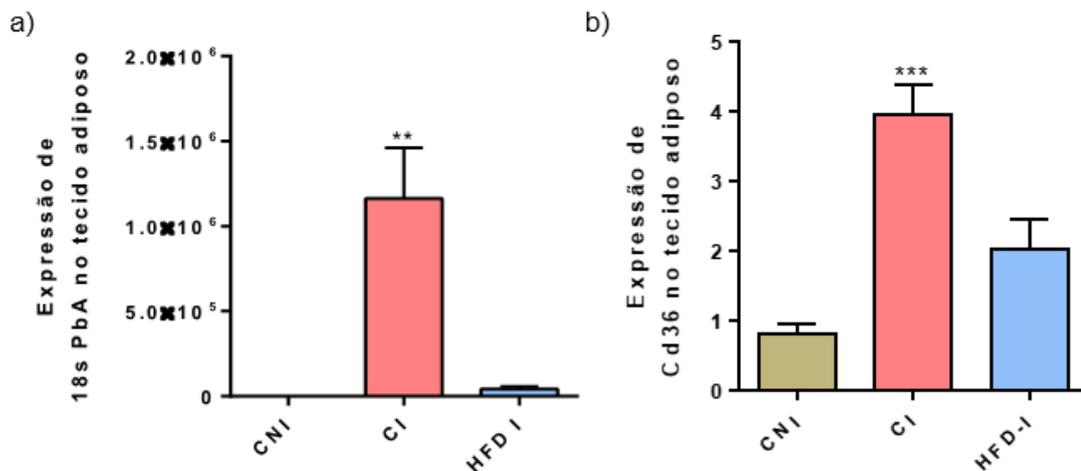


Figura 14. Localização dos parasitos no tecido adiposo. A) Expressão quantitativa de 18s por RT-qPCR no tecido adiposo perigonadal b) Expressão quantitativa de CD36 por RT-qPCR no tecido adiposo perigonadal de animais dos grupos controle não infectado, eutrófico infectado, e HFD infectado.

Considerado um ambiente com grande relevância no sistema imunológico, o perfil de citocinas do tecido adiposo de animais alimentados por dieta HFD a curto prazo após a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA foi avaliado pelo método CBA.

De forma surpreendente, a dieta hiperlipídica de curto prazo não impactou no aumento de citocinas pró inflamatórias, como é possível observar na figura 9. As citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 estão aumentadas nos animais eutróficos infectados, como característico na resposta imunológica a malária, e reduzidas nos animais infectados alimentados por dieta HFD. A IL-2 não teve alterações significativas devido à infecção, tampouco a citocina anti-inflamatório IL-10. A citocina IL-17 estava menos expressa nos animais do grupo controle infectado, do que nos animais não infectados, provavelmente pela ativação do perfil TH17.

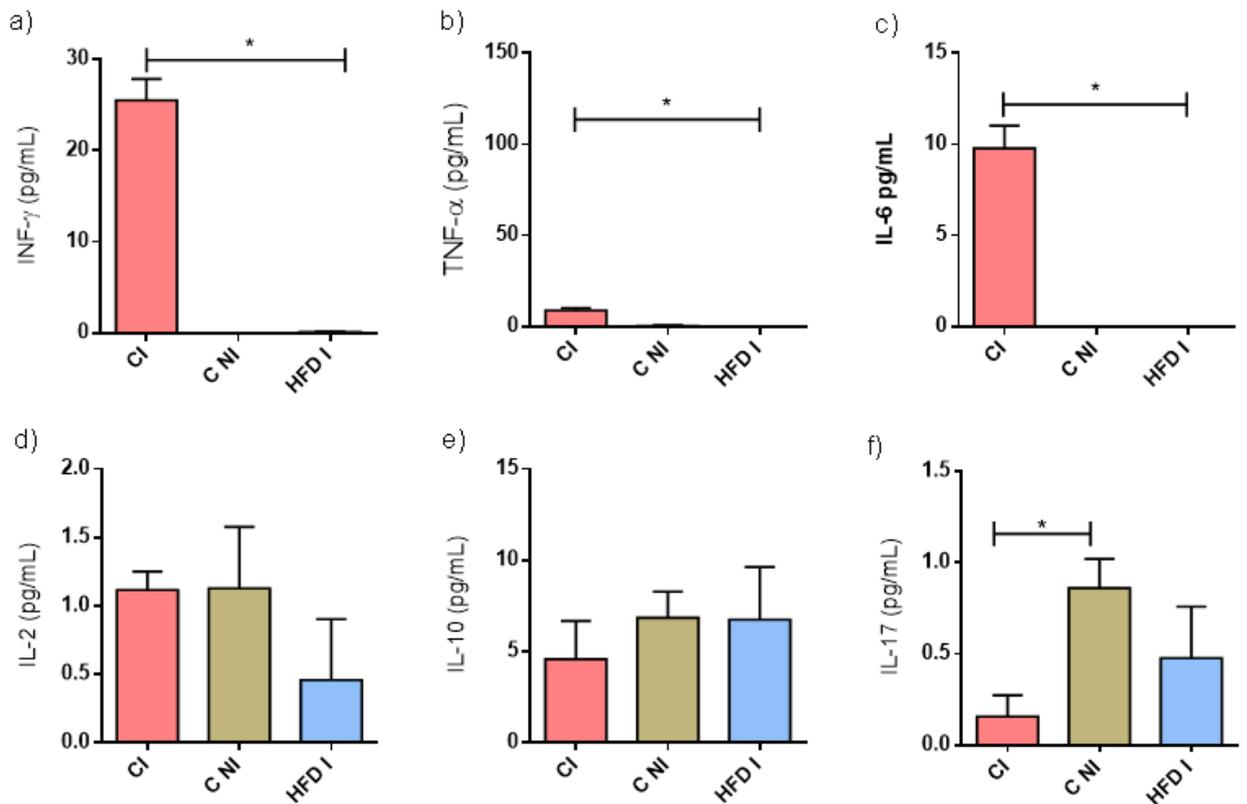


Figura 15. Efeito da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA na produção de citocinas no tecido adiposo perigonadal. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) ou dieta padrão durante cinco dias e infectados por *Plasmodium berghei* ANKA. No sexto dia após a infecção os animais foram eutanasiados, o tecido adiposo perigonadal foi retirado, e um homogenato do órgão foi preparado para análise por CBA. Valores expressos em média \pm EPM (n=5); teste ANOVA.

5.7 Consumo de Ômega 3 não altera o curso da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

Considerando que a literatura encontra um efeito protetor do ômega-3 e seus derivados contra parasitas causadores da malária, avaliamos se a quantidade presente na dieta hiperlipídica por banha de porco e óleo de soja, era responsável pelo controle da parasitemia e consequente proteção à malária cerebral observada anteriormente, uma dosagem compatível com a que está presente na dieta foi administrada via gavagem durante 5 dias com posterior

infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Não foi observada diferença no desenvolvimento da malária cerebral nesses animais que apresentaram parasitemia semelhante aos animais do grupo controle. como mostrado na figura 10.

A dosagem de ômega-3 administrada foi aproximadamente a presente na dieta hiperlipídica produzida no laboratório, portanto possivelmente, não houve alteração na parasitemia devido a quantidade baixa do composto, sendo possível afirmar apenas que os ácidos graxos do tipo ômega-3 não foram responsáveis pela proteção conferida pela dieta, porem em quantidades maiores possivelmente o desenvolvimento da infecção seria alterado.

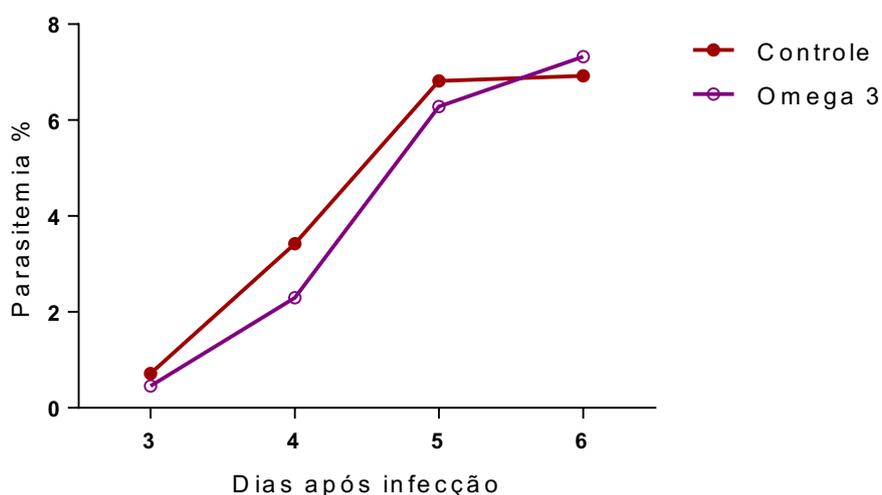


Figura 16. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos com dieta suplementada com Ômega 3. Média das parasitemias diárias dos animais do grupo controle e animais com suplementação de ômega 3 a partir do terceiro dia de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA.

5.8 O uso do antioxidante NAC (N-Acetilcisteína) não foi capaz de restaurar a susceptibilidade a infecção de camundongos alimentados por dieta hiperlipídica.

Maria Mota e colaboradores, em 2017, demonstraram que animais alimentados por dieta hiperlipídica por curto prazo, com lipídeos advindos principalmente de óleo de coco e predominantemente ácidos graxos saturados, apresentavam certa proteção contra a infecção de *Plasmodium berghei* ANKA,

porém não completa. De acordo com esse estudo, a proteção poderia ser revertida com o uso do antioxidante NAC (N-Acetilcisteína), e responsabiliza a proteção, portanto, ao estresse oxidativo presente no fígado causado pela dieta. (ZUZARTE-LUÍS et al., 2017).

Para avaliar se a administração do mesmo antioxidante seria capaz de reverter a proteção conferida aos animais do grupo HFD, os animais infectados desse grupo receberam a mesma dosagem de NAC do estudo supracitado, mas a proteção não foi revertida. Os animais do grupo HFD, mesmo tratados com antioxidante se mantiveram com a parasitemia próxima de zero, sem desenvolver nenhum sinal clínico relacionado a malária.

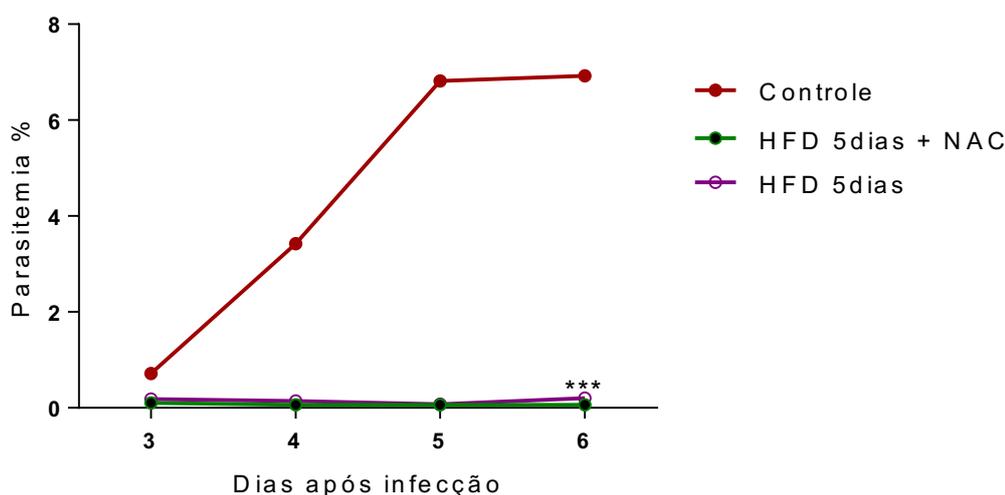


Figura 17. Desenvolvimento da malária cerebral em camundongos alimentados com dieta HFD e tratados com NAC. Média das parasitemias diárias dos animais do grupo eutrófico infectado, HFD infectado e HFD infectado tratado com NAC a partir do terceiro dia de infecção por *Plasmodium berghei ANKA*.

6 DISCUSSÃO

O crescente aumento da obesidade e do sobrepeso no mundo impacta de inúmeras maneiras a saúde pública e sua influência no sistema imunológico vem sendo muito estudada (DE HEREDIA; GÓMEZ-MARTÍNEZ; MARCOS, 2012; KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021). Contudo, a respeito do papel da obesidade

durante o desenvolvimento de doenças infecciosas ainda existem lacunas a serem preenchidas.

Portanto, embora a obesidade e o consumo de dieta hiperlipídica estejam comumente relacionados ao pior prognóstico de diversas patologias estéreis, como câncer, diabetes e arteriosclerose (CALLE; KAAKS, 2004; REUTER, 2007), no caso de doenças infecciosas esse papel pode ser controverso. O prejuízo à saúde evidenciado na obesidade, pode ser contrabalanceado com algum benefício em situações específicas, como certas infecções que exigem um equilíbrio delicado na relação hospedeiro-patógeno (BRAUN; GOMES; SCHUETZ, 2015; SCHETZ et al., 2019).

Nesse contexto de prejuízo versus vantagem, a infecção por parasitas do gênero *Plasmodium* evidencia essa situação paradoxal, como quando pessoas com anemia falciforme são protegidas contra malária (FERREIRA et al., 2011), ou quando o organismo infectado por *Plasmodium* entra em hipoglicemia na tentativa de controlar a parasitemia por falta de nutrientes (RAMOS et al., 2022). Portanto, demonstrando que doenças genéticas, ou até mesmo o organismo saudável durante a infecção, provocam um desequilíbrio na relação hospedeiro-patógeno que podem contribuir na resolução ou proteção da doença.

Um dos fatores mais impactantes e controláveis no desenvolvimento da obesidade é o consumo alimentar. Com a urbanização o mundo passou por uma importante transição nutricional que transformou os padrões alimentares, com o aumento do consumo de alimentos açucarados, gordurosos e ultra processados se torna fundamental compreender como essa dieta hiperlipídica é capaz de modular o sistema imunológico e alterar a resposta a infecções (ALLAIN et al., 2021; BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; POPKIN; ADAIR; NG, 2012).

Como já demonstrado em nosso laboratório anteriormente em dados ainda não publicados, a obesidade induzida através do consumo de dieta hiperlipídica por 12 semanas foi capaz de prevenir o desenvolvimento da malária cerebral após a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA controlando a parasitemia desde o princípio da infecção, inclusive por outras vias de infecção (intraperitoneal e retroorbital), garantindo a sobrevivência de todos os animais obesos infectados.

Para compreender se a proteção por dieta foi restrita a apenas essa linhagem do parasita, foi utilizada a infecção com o *Plasmodium berghei* NK65, modelo que causa anemia e hiperparasitemia em camundongos C57BL/6, mas que, apesar de já ter sido encontrado aderência de células T CD8+ no cérebro de animais, não apresenta sequestro de hemácias parasitadas e não provoca malária cerebral (BAPTISTA et al., 2010).

Ainda não está bem esclarecido a razão das duas linhagens supracitadas, geneticamente próximas, apresentarem patogenicidade diferente (AKKAYA et al., 2020). A incapacidade da linhagem NK65 de sequestrar hemácias parasitadas na microvasculatura cerebral encontrado na infecção pela linhagem ANKA pode ser determinante nessa diferença.

De fato, a obesidade não modificou de forma significativa o curso da doença causada por *Plasmodium berghei* NK65 em camundongos C57BL/6, levando ao aumento da parasitemia nos dois grupos testados e no aparecimento de sintomas no mesmo período. Nossa hipótese seria que a proteção conferida aos animais obesos contra a linhagem ANKA está provavelmente relacionada com seu mecanismo de sequestro, ausente em NK65.

Na tentativa de compreender esse cenário, é importante considerar a possibilidade de o receptor CD36 do tipo Scavenger estar aumentado na obesidade devido a sua capacidade em reconhecer a LDLox, uma forma aterogênica da LDL diretamente ligada a um conjunto de alterações nos níveis de gordura no sangue. Apesar de ainda não ter sido encontrado aumento de CD36 especificamente em células do sistema imunológico durante a obesidade, o aumento desse receptor em adipócitos após o consumo de dieta hiperlipídica já foi relatado (LUO et al., 2020). Durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, a proteína alvo que se liga ao CD36, leva ao sequestro de hemácias parasitadas e consequente escape do sistema imunológico, pode ter sido reconhecida mais intensamente por células do sistema imunológico durante a obesidade, principalmente macrófagos com CD36 aumentado, provocando sua rápida eliminação.

Para avaliar o desempenho de outro modelo animal no desenvolvimento da malária por *Plasmodium berghei* ANKA, infectamos animais deficientes para a glicoproteína apoE, secretada no fígado, mas também no tecido adiposo, que

atua regulando o fluxo de triglicérides e a expressão gênica de adipócitos (HUANG et al., 2013). Animais apoE^{-/-} são geneticamente iguais aos camundongos C57BL/6 com a exceção da deleção do gene apoE e caracterizam-se por um tecido adiposo reduzido e com menor acúmulo de triglicerídeos.

Em relação à malária, já foi demonstrado haver uma certa proteção contra a malária cerebral em animais apoE^{-/-} em que a maioria dos animais mostrou sobrevivência prolongada com aumento contínuo da parasitemia (KASSA et al., 2016). Nossos resultados foram concordantes com esse estudo e os animais apoE^{-/-} infectados por *Plasmodium berghei* ANKA tiveram a parasitemia crescente, mas sem os sintomas da malária cerebral observada nos animais do grupo controle.

O aumento da permeabilidade vascular é uma característica marcante da malária cerebral causada no modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Ao avaliar se houve quebra da barreira hematoencefálica, observamos que a mesma se manteve intacta no grupo obeso por dieta e no grupo apoE^{-/-}. Esse resultado é condizente com a parasitemia controlada dos animais obesos que não desenvolveram a malária e com animais apoE^{-/-} que demonstraram parasitemia crescente, aparentemente sem sequestro de hemácias parasitadas.

Além disso, esse mesmo estudo avaliou o papel de uma dieta hiperlipídica durante a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA e os camundongos não ficaram protegidos contra a doença, diferente do nosso modelo. Porém, a composição da dieta parece ser o fator diferencial, já que no estudo de Kassa e colaboradores, a origem da gordura é proveniente do leite e rica em ácidos graxos saturados, a dieta do nosso modelo de estudo advém da banha de porco e óleo de soja, havendo um equilíbrio entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos monoinsaturados.

Outros tipos de dieta já foram testadas e não apresentaram a mesma proteção contra a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA, como, por exemplo, um estudo que se propôs a avaliar uma dieta rica em carboidratos e não observou alteração no curso da doença (AUDU et al., 2022). Maria Mota e colaboradores observaram proteção contra a malária cerebral através da dieta

hiperlipídica a curto prazo, mas não proteção completa (ZUZARTE-LUÍS et al., 2017).

Observando a importância da composição da dieta nas alterações do curso da patologia estudada, demonstramos que a dieta hiperlipídica produzida no nosso laboratório e administrada por apenas 5 dias antes da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA continuou sendo capaz de controlar a parasitemia e evitar quaisquer sintomas nos camundongos infectados.

O modelo de malária cerebral experimental murino utilizando *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 foi caracterizado por um intenso sequestro de hemácias parasitadas para diversos órgãos, como cérebro, tecido adiposo e baço, mediado principalmente pelo receptor CD36 (FRANKE-FAYARD et al., 2005). O tecido adiposo se apresenta como um grande reservatório de parasitas não apenas no caso da malária, mas também em outras infecções (TANOWITZ et al., 2017). Por exemplo, em um estudo foi constatado que camundongos obesos infectados por *Trypanosoma cruzi* apresentaram maior carga parasitária no tecido adiposo, levando a diminuição da carga parasitária no coração e conseqüentemente maior sobrevivência. (NAGAJYOTHI et al., 2014).

Ao avaliar o tecido adiposo desses animais alimentados por dieta hiperlipídica, observamos que ele já apresentava maior peso quando comparado aos animais alimentados por dieta padrão. Ao comparar a expressão de 18s nesse tecido, não identificamos aumento significativo da parasitemia no tecido adiposo de animais alimentados por dieta hiperlipídica, diferente dos animais eutróficos infectados, que, como esperado, apresentavam uma alta taxa de parasitos no local.

Já ao avaliar a expressão do receptor CD36 no mesmo tecido, observamos que houve um aumento significativo no grupo eutrófico infectado, provavelmente devido ao sequestro de linfócitos e hemácias infectadas e, portanto, do aumento da resposta inflamatória no local. Apesar de não ser um aumento significativo, podemos observar que nos animais alimentados por dieta hiperlipídica houve uma tendência de aumento do CD36 no tecido adiposo, o que já pode ser indicativo de alterações devido à dieta.

Ao comparar o nível de secreção de diferentes citocinas do tecido adiposo, os animais infectados dos dois grupos se mantiveram semelhantes. As citocinas pró inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-6 que estavam mais expressas no tecido adiposo dos animais eutróficos infectados se encontravam reduzidas de forma semelhante no grupo HFD infectado e controle não infectado. Indicando que aparentemente não houve estímulo inflamatório no tecido adiposo dos animais alimentados por dieta hiperlipídica após a infecção por *Plasmodium berghei* ANKA como houve nos animais alimentados por dieta padrão.

Comparando o peso dos órgãos dos animais experimentais, foi possível observar aumento do peso do baço dos animais do grupo HFD infectado em relação ao grupo eutrófico infectado, apesar do grupo apresentar parasitemia próxima de zero desde o início da infecção.

Ao avaliar as citocinas presentes no baço encontramos um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias em animais alimentados por dieta hiperlipídica IFN- γ , TNF- α e IL-6 quando comparados aos animais não infectados, indicando que apesar de aparentemente a eliminação do parasita ter acontecido no princípio da infecção desse grupo, ainda era possível observar resposta inflamatória no baço. Em experimentos anteriores em nosso laboratório, acompanhamos a infecção de animais obesos por até 30 dias e não houve aumento de parasitemia, indicando que a infecção estava controlada.

Surpreendentemente, foi observado um aumento significativo da citocina IL-4 no baço dos animais do grupo HFD infectados em comparação aos animais alimentados por dieta padrão, também infectados. Um artigo recente mostrou que o tratamento com IL-4 diminui a patogênese da malária cerebral em animais infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, atuando por diferentes formas, entre elas, aumentando o potencial fagocítico de macrófagos no baço e consequentemente auxiliando na eliminação do parasita e na regulação da resposta imune, e redução do infiltrado de células T CD8 citotóxicas no cérebro (WU et al., 2021).

Para elucidar como o consumo da dieta hiperlipídica afetou a secreção de citocinas, é possível considerar um estudo em humanos que mostrou que o consumo de dieta HFD durante uma semana levou a diminuição do receptor TLR-2 (WAN et al., 2014). E já foi demonstrada a presença de ligantes de TLR

em Plasmodium, âncoras de Glicofosfatidil-inositol (GPI) que ativam TLR-2 (Krishnegowda et al. 2005). Além disso, células dendríticas ativadas por parasitas, induzem a secreção de IL-4 através de linfócitos T, favorecendo o perfil Th2 de maneira independente de TLR, via PI3k (WU et al., 2018).

Considerando que diferentes linhagens do parasita causador da malária, levam a maior expressão de IL-12 ou IL-4 e que esse pode ser um fator contribuinte para a maior letalidade de uma linhagem em relação a outra, seria possível questionar, se o aumento de IL-4 no baço de camundongos alimentados por dieta nesse trabalho, ocorreu devido à ativação de células dendríticas por essa via, e que a alteração do perfil voltado para o Th2 também auxiliou na eliminação do parasito, sem os danos característicos da resposta exagerados provocados pelo perfil Th1 observados na malária grave.

Observando que a não houve aumento de parasitemia durante os 7 dias após a infecção, seria possível questionar se os parasitas foram capazes de infectar os eritrócitos ou conseguiram se replicar no seu interior, porém, ao observar que a resposta inflamatória do baço dos animais infectados foi semelhante independente da dieta e da parasitemia periférica, nos leva a inferir que a infecção das hemácias aconteceu, houve controle da parasitemia e eliminação de eritrócitos infectados no baço.

Compreendendo que a composição da dieta hiperlipídica era de grande relevância no efeito protetor contra a malária nesse estudo, foi considerado que a dieta utilizada possui altos níveis de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Porém, diversos estudos mostram o potencial antimalárico de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente do ácido docosaenoico (KUMARATILAKE et al., 1992). Assim, foi avaliado se a suplementação de ômega 3 contendo DHA seria capaz de promover a mesma proteção que a dieta, todavia, após 5 dias de suplementação e infecção dos animais por *Plasmodium berghei* ANKA, não foi observada diferença na parasitemia dos animais controles e animais suplementados.

Ao analisar na literatura a composição de ácidos graxos da dieta hiperlipídica produzida com banha de porco, foi demonstrado maior quantidade de ácidos esteáricos (C18), especialmente os ácidos oleicos e linoleicos, além de maiores níveis de ácido mirístico (C14) quando comparada a dieta padrão.

Observou-se que animais alimentados por essa dieta hiperlipídica apresentaram maiores níveis de malonaldeído (MDA), um importante marcador de peroxidação lipídica, sugerindo que a dieta induziu o aumento do estresse oxidativo (EMELYANOVA et al., 2019). Outro aspecto que pode ser considerado, seria o fato de os ácidos graxos encontrados em abundância na banha de porco, como o ácido oleico e ácido mirístico, inibirem a enzima topoisomerase, (SUZUKI et al., 2000), essencial na replicação parasitária e estudada como um novo potencial alvo no tratamento da malária (SINGH et al., 2022).

Estudos iniciais mostram uma inibição irreversível do crescimento do *Plasmodium* em altas concentrações de ácidos graxos, como o oleico e linoleico. Além disso, foi demonstrado que após a adição de vitamina E, um potente antioxidante nessa dieta, foi possível reverter o efeito supressor dos ácidos graxos, sugerindo que a peroxidação lipídica estava envolvida na atividade antimalárica (LEVANDER; AGER, 1993) (KRUGLIAK et al., 1995). No trabalho de Maria Mota e colaboradores, em que a dieta hiperlipídica a curto prazo também tem efeito protetor contra a malária cerebral, a administração do antioxidante NAC reverteu o efeito protetor da dieta contra a infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA (ZUZARTE-LUÍS et al., 2017). No presente trabalho, avaliamos se a utilização desse mesmo antioxidante (NAC) seria capaz de anular os efeitos protetores da dieta, porém os animais alimentados por dieta hiperlipídica e tratados com NAC não desenvolveram a malária cerebral, e tiveram a parasitemia controlada assim como os animais não tratados com o antioxidante.

A diferença entre os estudos pode estar na via de infecção, enquanto utilizamos merozoítos injetados diretamente para a corrente sanguínea, envolvendo apenas a fase eritrocítica da infecção, Maria Mota e colaboradores realizaram a infecção a partir do mosquito, e observaram a proteção por estresse oxidativo na fase hepática da infecção (ZUZARTE-LUÍS et al., 2017). Apesar de o uso de antioxidante não ter sido eficiente para reverter a proteção conferida pela dieta, não seria necessário descartar a hipótese do estresse oxidativo como responsável pela rápida eliminação do parasita, ao sugerir que antioxidantes mais potentes, ou de mecanismos de ação diferentes seriam capazes de anular o efeito da dieta. Um estudo em humanos demonstrou que o consumo de uma

única refeição hiperlipídica foi capaz de aumentar os níveis de ROS intracelular das hemácias. Sendo assim, avaliar o estresse oxidativo no interior dos eritrócitos também pode contribuir para o entendimento da proteção conferida pela dieta no nosso modelo (BENSON et al., 2018).

Embora ainda não tenha sido possível compreender de forma definitiva os mecanismos envolvidos, nossos resultados demonstram um claro papel protetor da dieta hiperlipídica na infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Aparentemente, essa proteção seria exclusiva para essa linhagem, indicando um envolvimento do seu mecanismo de evasão, a expressão de proteínas ligantes que levam ao sequestro de hemácias parasitadas e a eliminação precoce dos parasitas.

Há anos existem indícios que a dieta pode afetar o curso da infecção da malária, principalmente na proteção da malária grave. Em humanos, o grupo étnico Fulani, chama atenção por ser um grupo nômade que consome leite como maior fonte de alimento e é especialmente observado por seus hábitos alimentares e apresentarem poucos casos de malária grave, apesar de viverem em região endêmica (MURRAY et al., 1978).

Considerando o aumento da resistência de medicamentos, e da dificuldade na produção de uma vacina capaz de proteger contra a malária grave, se torna fundamental desenvolver diferentes formas de prevenção e tratamento conjunto para a malária. Ademais, a obesidade tem sido observada com alta incidência em todo o mundo, tornando-se de grande relevância elucidar as respostas das infecções associadas a obesidade para contribuir com o manejo adequado dos indivíduos acometidos, além de descobrir novos alvos e moléculas que culminem em novas abordagens terapêuticas.

1. CONCLUSÃO

O presente trabalho reuniu resultados que demonstram que o consumo da dieta hiperlipídica, com a gordura advinda de banha de porco e óleo de soja, tanto a longo ou a curto prazo, foi capaz de proteger camundongos C57BL/6 do desenvolvimento da malária através da infecção por *Plasmodium*

berghei ANKA. Além disso, demonstramos que essa proteção se restringe a esse modelo de infecção, portanto, depende justamente das características particulares da cepa ANKA.

A suplementação de ômega-3, conhecido por sua propriedade antioxidante, e reguladora do crescimento de *Plasmodium falciparum*, não foi suficiente para fornecer a mesma proteção conferida pela dieta completa. A utilização de um antioxidante para tentar reverter a proteção da dieta também não foi eficaz, sugerindo que a dieta pode ter diferentes vias para levar a essa proteção.

Dessa maneira, podemos concluir que diferenças no padrão de alimentação da população podem ser relevantes na modificação da resposta imunológica e no desenvolvimento de doenças infecciosas, considerando o equilíbrio entre hospedeiro e parasita como uma questão sensível que pode determinar o destino daquela infecção.

Além disso, ficou evidenciado que não apenas a quantidade de alimento, mas a composição dessa dieta, do teor e do tipo de gordura, já que outros estudos com condições similares foram capazes de encontrar alguma proteção contra o desenvolvimento da malária, mas ainda não completa como a desse trabalho.

Dessa forma demonstramos de forma inédita a proteção contra a malária utilizando uma dieta hiperlipídica de baixo custo e a curto prazo, apesar de, ainda, não ser possível definir seu mecanismo de ação

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M. et al. Testing the impact of a single nucleotide polymorphism in a *Plasmodium berghei* ApiAP2 transcription factor on experimental cerebral malaria in mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- ALLAIN, T. et al. High-fat diet increases the severity of *Giardia* infection in association with low-grade inflammation and gut microbiota dysbiosis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2021.
- AMANI, V. et al. Involvement of IFN- γ receptor-mediated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by *Plasmodium berghei* infection. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1646–1655, 2000.
- ANTINORI, S. et al. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, 2012.
- ARONNE, L. J.; NELINSON, D. S.; LILLO, J. L. Obesity as a disease state: A new paradigm for diagnosis and treatment. **Clinical Cornerstone**, v. 9, n. 4, p. 9–29, jan. 2009.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of

IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 6, p. 2956–63, 15 set. 2002.

BAPTISTA, F. G. et al. Accumulation of Plasmodium berghei-infected red blood cells in the brain is crucial for the development of cerebral malaria in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 4033–4039, 2010.

BENSON, T. W. et al. A single high-fat meal provokes pathological erythrocyte remodeling and increases myeloperoxidase levels: implications for acute coronary syndrome. **Laboratory Investigation**, p. 1–11, 2018.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, p. 939–949, 2005.

BLÜHER, M. Obesity : global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. May, 2019.

BONEN, A. et al. The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. **International Journal of Obesity**, v. 30, n. 6, p. 877–883, jun. 2006.

BRAUN, N.; GOMES, F.; SCHUETZ, P. “The obesity paradox” in disease - Is the protective effect of obesity true? **Swiss Medical Weekly**, v. 145, n. December, p. 1–5, 2015.

BRUGAT, B. T. Editorial: CD36: Russian roulette of host and parasites during malaria infection. p. 1–3, 2015.

BUCKMAN, L. B. et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 35, p. 33–42, 2014.

BUETTNER, R.; SCHÖLMEICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

CABRERA, A.; NECULAI, D.; KAIN, K. C. CD36 and malaria: friends or foes? A decade of data provides some answers. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 9, p. 436–44, 2014.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. August, p. 579–591, 2004.

CARDOSO, A. R.; KAKIMOTO, P. A. H. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Diet-Sensitive Sources of Reactive Oxygen Species in Liver Mitochondria: Role of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases. **PLoS ONE**, 2013.

CASTELLI, F.; TOMASONI, L. R. New insights on malaria. **The New Microbiologica**, v. 45, n. 2, p. 83–98, abr. 2022.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794–811, 19 nov. 2019.

CHRISTIAENS, V. et al. CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 949–956, jul. 2012.

CLARK, I. A. et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria journal**, v. 5, p. 85, 2006.

CLARK, I. A. et al. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1–2, p. 67–81, 2008.

COMBES, V. et al. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood–brain barrier. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 541–546, maio 2006.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 02, p. 332–338, 2012.

DOS SANTOS, B. et al. Effects of a diet enriched with polyunsaturated, saturated, or trans fatty acids on cytokine content in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle of adult mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. July, 2017.

FELISBINO-MENDES, M. S. et al. The burden of non-communicable diseases attributable to high BMI in Brazil, 1990–2017: findings from the Global Burden of Disease Study. **Population Health Metrics**, v. 18, n. S1, p. 18, set. 2020.

FERREIRA, A. et al. Sick hemoglobin confers tolerance to plasmodium infection. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 398–409, 2011.

FITCH, C. D.; CAI, G. Z.; SHOEMAKER, J. D. A role for linoleic acid in erythrocytes infected with plasmodium berghei. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1535, n. 1, p. 45–49, 2000.

FONAGER, J. et al. Reduced CD36-dependent tissue sequestration of Plasmodium-infected erythrocytes is detrimental to malaria parasite growth in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p.

93–107, 16 jan. 2012.

FRANKE-FAYARD, B. et al. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: Can we learn anything from rodent models of malaria? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

FRASCA, D.; BLOMBERG, B. B. The Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Vaccination Success. Em: WEINBERGER, B. (Ed.). **Interdisciplinary Topics in Gerontology and Geriatrics**. [s.l.] S. Karger AG, 2020. v. 43p. 86–97.

GARAVELLI, P. L.; CORTI, E. Chloroquine resistance in Plasmodium vivax: the first case in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 128, 1 mar. 1992.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744–757, 2014.

GONÇALVES, D. A. et al. COVID-19 and Obesity: An Epidemiologic Analysis of the Brazilian Data. **International Journal of Endocrinology**, v. 2021, p. 6667135, 2021.

GRAU, G. E. et al. Interleukin 6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia. **The Journal of experimental medicine**, v. 172, n. 5, p. 1505–8, 1 nov. 1990.

GUH, D. P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 9, p. 1–20, 2009.

GUIMARÃES, V. H. D. et al. Comparative study of dietary fat: lard and sugar as a better obesity and metabolic syndrome mice model. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–11, 11 nov. 2020.

HERAS, V. L. et al. Short-term consumption of a high-fat diet increases host susceptibility to Listeria monocytogenes infection. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2019.

HOWLAND, S. W.; POH, C. M.; RÊNIA, L. Activated Brain Endothelial Cells Cross- Present Malaria Antigen. p. 1–24, 2015.

HUNT, N. H. et al. Immunopathogenesis of cerebral malaria. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 569–582, 1 maio 2006.

IYER, A. et al. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 71–82, 2010.

J. CRAWLEY, C. CHU, G. MTOVE, F. N. Malaria in children. **Lancet**, v. 375, n. 1, p. 1468–81, 2010.

JAMES, W. P. T. WHO recognition of the global obesity epidemic. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. S7, p. S120–S126, dez. 2008.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 1 mar. 2021.

KENNEDY, A. J. et al. Mouse models of the metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 3, n. 3–4, p. 156–166, 2010.

LALANZA, J. F.; SNOEREN, E. M. S. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 122, p. 92–119, 1 mar. 2021.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MEJIA, P. et al. Dietary restriction protects against experimental cerebral malaria via leptin modulation and T-cell mTORC1 suppression. **Nature Communications**, v. 6, p. 6050, 2015.

MELARIRI, P. et al. In Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of Linolenic and Linoleic Acids and their Methyl Esters. **Advanced Studies in Biology**, 2012.

MILNER, D. A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 02, p. 298–306, 2012.

MOUMARIS, M. et al. Effect of Fatty Acid Treatment in Cerebral Malaria-Susceptible and Nonsusceptible Strains of Mice. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 997, dez. 1995.

MURRAY, M. J. et al. Diet and cerebral malaria: the effect of famine and refeeding. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 57–61, 1 jan. 1978.

NACER, A. et al. Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis—Hemodynamics at the Blood Brain Barrier. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.

NITCHEU, J. et al. Perforin-Dependent Brain-Infiltrating Cytotoxic CD8+ T Lymphocytes Mediate Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 2221–2228, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE., 72. **World malaria report 2021**. Geneva: World Health Organization: Organização Mundial da Saúde., 2021. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/364378>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

PATEL, S. N. et al. Disruption of CD36 Impairs Cytokine Response to Plasmodium falciparum Glycosylphosphatidylinositol and Confers Susceptibility to Severe and Fatal Malaria In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3954–3961, 15 mar. 2007.

POHL, K.; COCKBURN, I. A. Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 914598, 19 ago. 2022.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 1, p. 3–21, 2012.

PROCACCINI, C. et al. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 66, p. 120–129, 2017.

RAMOS, S. et al. A hypometabolic defense strategy against malaria. **Cell Metabolism**, v. 34, n. 8, p. 1183–1200.e12, ago. 2022.

RÉNIA, L.; GRAU, G. E. R.; WASSMER, S. C. CD8+ T cells and human cerebral malaria: a shifting episteme. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1109–1111, 2020.

REUTER, T. Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 4, n. 1, p. 3–8, mar. 2007.

SCHANUEL, F. S.; ROMANA-SOUZA, B.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Short-Term Administration of a High-Fat Diet Impairs Wound Repair in Mice. **Lipids**, v. 55, n. 1, p. 23–33, 2020.

SCHETZ, M. et al. Obesity in the critically ill: a narrative review. **Intensive Care Medicine**, mar. 2019.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 9, p. 722–735, 2005.

THOMAS, D.; APOVIAN, C. M. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 72, p. 120–143, jul. 2017.

THYLUR, R. P. et al. CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 22, p. 9394–9408, 2017.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **The British journal of nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347–355, 2004.

YIPP, B. G. et al. Differential roles of CD36, ICAM-1, and P-selectin in Plasmodium falciparum cytoadherence in vivo. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 14, n. 6, p. 593–602, 2007.

ZHAO, S.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. **Circulation research**, v. 128, n. 1, p. 136–149, 8 jan. 2021.

ZUZARTE-LUÍS, V. et al. Dietary alterations modulate susceptibility to Plasmodium infection. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 1600–1607, 2017.