

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Sara Malaguti Andrade Soares

**IMPACTOS DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA
GRAVE MURINA CAUSADA POR *Plasmodium berghei* – ANKA:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PARASITOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS**

JUIZ DE FORA
2016

SARA MALAGUTI ANDRADE SOARES

**IMPACTOS DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA
GRAVE MURINA CAUSADA POR *Plasmodium berghei* – ANKA:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PARASITOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Jacy Gameiro

JUIZ DE FORA

2016

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

Malaguti Andrade Soares, Sara.

IMPACTOS DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA GRAVE MURINA CAUSADA POR Plasmodium berghei - ANKA : Avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos / Sara Malaguti Andrade Soares. -- 2016.

51 p.

Orientadora: Jacy Gameiro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Obesidade. 2. Malária. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Sistema Imune.
I. Gameiro, Jacy, orient. II. Título.

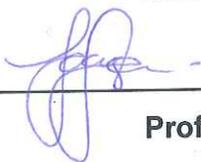
SARA MALAGUTI ANDRADE SOARES

**IMPACTO DA OBESIDADE NO DESENVOLVIMENTO DE MALÁRIA GRAVE
MURINA CAUSADA POR *Plasmodium berghei* – ANKA: AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

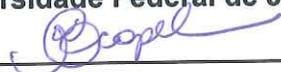
Aprovada em: 01 / 03 / 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Kézia Katiani Gorza Scopel
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Caio César de Souza Alves
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus maiores incentivadores. Pela educação de amor que rodeia nossa família, paciência nos momentos difíceis e principalmente pelo exemplo. Agradeço o apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, que me possibilitou vencer muitos desafios e concretizar grandes sonhos. O meu amor eterno e minha profunda gratidão por toda a abdicção e dedicação aos filhos.

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Só tenho a agradecer.

Agradeço a Deus por sempre mostrar caminhos em sua sabedoria, que por teimosia eu poderia não enxergar

Aos meus pais, Maria da Consolação e Juarez Malaguti, por permitir que eu fosse quem eu quisesse ser, incentivar e apoiar cada decisão, vocês são minha vida.

Ao meu irmão César, meu caçulinha que surpreende cada vez mais, seja por suas próprias conquistas ou por conselhos sábios vindos do meu irmãozinho pequeno que vem se tornando um grande homem, motivo de orgulho.

À minha madrinha por sempre evidenciar minhas raízes, vamos sempre descobrindo o quanto somos parecidas, agradeço por compartilhar a sabedoria, a confiança e o amor de mãe.

Às minhas primas e irmãs mais velhas Natália, Kattia e Thattiane, cada uma a sua maneira me fazendo sentir mais completa e amada, pelos conselhos que sigo a risca, pela proteção, pelo amor e pelas risadas/gargalhadas.

Aos preciosos ensinamentos trazidos pelos familiares não humanos, Meg, Fifi e Pretinha, agradeço a eles também a alegria e amor incondicional.

À amada orientadora Prof^a Dr^a. Jacy Gameiro, agradeço imensamente por ser uma professora completa, que com seu exemplo de humanidade ensina além da Imunologia, valores como ética, solidariedade, compreensão. Me sinto muito honrada de ser sua aluna e amiga, e de ter a alegria de ter você e sua família presente em minha vida.

Aos amigos do Gameiros`s Group essenciais para a conclusão desse trabalho.

Por toda a ajuda e companhia nas madrugadas de experimento sem permitir que o cansaço vencesse o humor agradeço a Gabriela Menezes e Felipe Xavier.

Agradeço pela organização, experiência e didática que Pollyanna Salvador coordenava os experimentos com carinho e capricho.

À Flavia e Lucia Mara pela colaboração e auxílio.

À Renan Carvalho por tantos ensinamentos que possibilitaram esse trabalho.

À todo o auxílio de Maria Júlia, Diego Assis, Luiza Abdo, Rafaela Lima, Mayara Dias e Paula Rodrigues durante os experimentos e cuidado com animais.

À professora Dr^a. Kezia Katiani Gorza Scopel pela colaboração.

À Alyssa Borges, Daniela Renhe e Barbara Carpinter por toda ajuda com os parasitas

A Ana Luísa e Paola grandes amigas que apoiaram, aconselharam, e fizeram meus dias mais felizes mesmo naqueles mais difíceis.

À Maíra Mucci por toda a ajuda, que mesmo sendo de área diferente se esforçou e foi capaz de ajudar na correção com todo cuidado.

Ao companheirismo da Ana Gualberto, é difícil encontrar palavras para agradecer seu apoio em todos os aspectos da vida, obrigada por estar presente, pelas madrugadas em claro, pelo ombro amigo e até pelos puxões de orelha.

Luan, Diego, Maíra e Pilar queridos amigos que tornam a rotina leve e divertida, sem vocês já teria enlouquecido há muito tempo.

A todos os amigos da turma mais animada e unida, Bidelirante, por tantos momentos memoráveis.

Aos amigos do Colégio Militar que sempre se fizeram presentes, espero que nossa amizade seja eterna

À Lilian, por me auxiliar em minha própria compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, ótimas companhias de trabalho.

RESUMO

Impactos da obesidade no desenvolvimento de malária grave murina causada por *Plasmodium berghei* - ANKA

A obesidade é motivo de preocupação para a saúde pública em todo o mundo. Apesar de existirem muitos estudos sobre seu impacto no sistema imunológico, a influência nas doenças infecciosas é pouco relatado. A incidência da obesidade vem aumentando em países em desenvolvimento, assim é de grande importância o estudo do papel da obesidade na resposta imunológica a patógenos, principalmente em doenças infecciosas de grande relevância como a malária. A obesidade é caracterizada por uma inflamação sistêmica de baixo grau crônica, e acredita-se que as manifestações complicadas da malária, como a malária cerebral, injúria respiratória, denominada malária grave, podem ser resultado da resposta inflamatória exagerada causada pelo sequestro de hemácias infectadas nos vasos endoteliais de órgãos vitais como cérebro e pulmão. Portanto a inflamação na obesidade pode alterar o curso da infecção do *Plasmodium berguei* ANKA, parasitas causadores da malária cerebral em modelo murino. Neste trabalho, investigamos a influência da obesidade na resposta imune frente à infecção por *Plasmodium berguei* ANKA. Para isso foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade de 4 a 6 semanas, alimentados durante 12 semanas por uma dieta hiperlipídica com 60% das quilocalorias advindas de lipídeos. Após esse período os animais foram infectados com a cepa ANKA de *Plasmodium berguei*. Nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica, observou-se aumento do peso corporal, assim como da gordura perigonadal dos animais alimentados pela dieta hiperlipídica, sem aumento do consumo de ração. A resistência ao desenvolvimento da malária grave foi observada nos animais obesos; além de conseguir controlar a parasitemia, . Somente esses animais sobreviveram à infecção, por 25 dias após o desafio, sem apresentar sintomas clínicos da doença, ao contrário, os não obesos infectados, vieram a óbito após oito dias de infecção. Foram observadas diferenças no perfil celular dos animais obesos infectados quando comparados aos controles infectados, sugerindo que a inflamação prévia dos animais obesos pode ter influenciado o curso da infecção. Assim, os resultados indicam que alterações na resposta imunológica do camundongo obeso conseguem protegê-lo contra o desenvolvimento da malária grave.

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

ABSTRACT

Impacts of obesity on the immune response during infection by *Plasmodium berghei* – ANKA

Obesity is a public health concern currently affecting worldwide, although there are many studies on the impact of obesity on the immune system, the various aspects of the association between obesity and infection is seldom reported. The incidence of obesity is increasing in the developing countries, and it is very important to study the role of obesity in the immune response to pathogens, especially infectious diseases such as malaria. Obesity is characterized by a low-grade, systemic, chronic inflammation and it is believed that the complicated manifestations of malaria, as severe malaria, can be the result of an exaggerated inflammatory response caused by sequestration of infected erythrocytes to endothelial vessels of vital organs such as brain and lung. So inflammation in obesity may alter the course of infection of *Plasmodium berguei* ANKA, parasites that cause cerebral malaria in mice. In this work, we investigated the influence of obesity on the immune response to infection by *Plasmodium berguei* ANKA. For this, male C57BL/6 mice aged 4 to 6 weeks were used, fed by a high fat diet with 60% of kilocalories from lipid, for 12 weeks. After this period the animals were infected with the strain ANKA of *Plasmodium berguei*. There was an increase in body weight as well as the perigonadal fat in animals fed with the high fat diet, without increasing the food intake, from the second week of dieting. The resistance to the development of severe malaria was observed in the obese animals, beside of control the parasitemia, only those animals survived the infection for 25 days post challenge, without any clinical symptoms of the disease, unlike infected non obese, who died after eight days of infection. Differences were observed in the cell profile of infected obese animals compared to infected controls, suggesting that prior inflammation in obese animals may have influenced the course of infection. Thus, the results indicate that changes in the immune response of obese mice can protect against the development of severe malaria.

Keywords: Obesity, severe malaria, high fat diet.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Efeitos da leptina na imunidade inata e adaptativa	12
Figura 2: Desenho esquemático do ciclo de vida dos parasitas do gênero Plasmodium.	16
Figura 3: Peso Corporal e Consumo de ração.	26
Figura 4: Concentração de leptina no soro.....	26
Figura 5: Média das parasitemias diárias dos animais controles e obesos.....	27
Figura 6: Média das parasitemias diárias dos animais controles e obesos com diferentes vias de infecção.....	27
Figura 7: Curva de sobrevivência.....	28
Figura 8: Análise de população de linfócitos TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo da gordura.	29
Figura 9: Análise de população de linfócitos TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo do baço	30
Figura 10: Análise de população de linfócitos T regulatórios por meio de citometria de fluxo da gordura	31
Figura 11: Análise da produção de citocinas por células TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo da gordura.....	32
Figura 12: Análise do perfil de ativação de macrófagos da gordura por meio de citometria de fluxo	33
Figura 13: Análise de população de células NK por meio de citometria de fluxo do baço	34
Figura 14: Análise de população de células dendríticas por meio de citometria de fluxo do baço.....	35
Figura 15: Análise de população de células dendríticas por meio de citometria de fluxo do baço	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

FOXP3 Forkhead box P3

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 fator- Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral:	20
2.2 Objetivos Específicos:	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais	21
3.2. Delineamento Experimental	21
3.3. Indução da obesidade	22
3.4. Infecção por P.berghei ANKA e eutanásia dos animais	22
3.5. Curva de Parasitemia	23
3.6. Curva de Mortalidade	23
3.7. Dosagem de Leptina	23
3.8. Avaliação fenotípica da população celular da gordura e do baço	23
3.9. Análise estatística	24
3. RESULTADOS	25
3.1. Avaliação da indução do modelo de obesidade em camundongos C57BL/6	25
3.2. Influência da obesidade na parasitemia e mortalidade	27
3.3. Influência da obesidade na população de linfócitos na gordura e no baço	29
3.4. Influência da obesidade na população de monócitos na gordura	33
3.5. Influência da obesidade na população de células NK no baço	34
3.6. Influência da obesidade na população de macrófagos e células dendríticas no baço	35
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1.INTRODUÇÃO

A obesidade é motivo de preocupação para a saúde pública em todo mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da obesidade mais que dobrou nos últimos vinte anos, e em 2014 mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, dentre os quais 600 milhões foram classificados como obesos. Em 2015, 42 milhões de crianças menores que cinco anos estavam acima do peso ou obesas. (WHO, 2015). No Brasil, a pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2014 aponta que 52,5% da população do país está acima do peso e 17,9% está obesa (Vigitel, 2014).

A forma mais aceita atualmente de avaliar o peso de adultos é pelo índice de Massa Corporal (IMC), o qual é dado dividindo-se o peso de uma pessoa (em quilogramas) pelo quadrado da sua altura (em metros), se o resultado for superior a 25 a pessoa é considerada acima do peso, e superior a 30 considerada obesa (WHO, 2015).

A obesidade é uma síndrome de causa multifatorial, que apesar de ser explicada 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 mesmo culturais que interagem em graus variados para promover o desenvolvimento dessa síndrome. (ARONNE; NELINSON; LILLO, 2009).

Além de estar relacionada com o comprometimento funcional, menor qualidade de vida e maior mortalidade, a obesidade aumenta o fator de risco para diversas doenças como diabetes tipo 2, doenças cardíacas, hipertensão e vários tipos de câncer (PI-SUNYER, 2009).

Biologicamente a obesidade é caracterizada pelo crescimento do tecido adiposo, que desempenha o papel de reservatório de energia, armazenando lipídios caso haja energia excessiva. Esse crescimento está associado com o acúmulo de triglicérides nos adipócitos (hipertrofia) e com o recrutamento de novos adipócitos (hiperplasia) (IYER *et al.*, 2010).

Atualmente o tecido adiposo é visto como mais do que um órgão passivo, que tem a função única de armazenar e liberar energia. Muitos estudos já o consideram um importante órgão endócrino, capaz de secretar uma variedade de hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que influenciam o metabolismo, a

função vascular e endotelial, a imunidade e a fertilidade (SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH; SALZBERGER, 2007). O desenvolvimento exacerbado desse órgão durante a obesidade está associado a alterações nesses fatores, podendo comprometer a relação neuroendócrina que regula o metabolismo e a imunidade (DIXIT, 2008).

Dentre as várias proteínas secretadas pelo tecido adiposo que podem estar alteradas na obesidade são as adipocinas, que atuam na imunidade, hemostasia, pressão sanguínea, metabolismo de lipídios, regulação do apetite e equilíbrio de energia, angiogênese e sensibilidade à insulina (TRAYHURN; WOOD, 2004).

Descrita em 1994 por Zhang e colaboradores como um hormônio secretado pelo tecido adiposo produto do gene *ob*, a leptina foi uma adipocina primeiramente relacionada com a obesidade por controlar a saciedade (ZHANG, Y *et al.*, 1994). Esse controle é mediado por interações com seus respectivos receptores no hipotálamo, em especial no núcleo arqueado hipotalâmico, onde residem duas populações neuronais responsivas à leptina, que culmina na regulação da ingestão de alimentos e gasto energético (COLL; FAROOQI; O'RAHILLY, 2007). A relação da leptina com o tecido adiposo é diretamente proporcional, e sua concentração sérica em indivíduos obesos é elevada (PIJL; TOORNVLIET; MEINDERS, 1996).

A leptina compartilha similaridade estrutural com a família de citocinas de cadeia helicoidal longa, que inclui as citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6 e IL-12 (ZHANG, F *et al.*, 1997). Consistente com essa semelhança a leptina tem papel fundamental no sistema imune, e a deficiência da leptina ou do seu receptor leva a grave disfunção do sistema imune (CAVA; MATARESE, 2004).

Na imunidade inata a leptina atua na ativação de monócitos e macrófagos estimulando sua função fagocítica e a secreção de mediadores inflamatórios como o leucotrieno B₄, cicloxigenase 2, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias como TNF α e IL-1 β (DIXIT *et al.*, 2003; MANCUSO *et al.*, 2002; ZARKESH-ESFAHANI *et al.*, 2001). Além disso, a leptina pode auxiliar na liberação de espécies reativas do oxigênio (ROS). (CALDEFIE-CHEZET; POULIN; VASSON, 2003; CALDEFIE-CHEZET *et al.*, 2001). Ainda, as células natural killer (NK) tem o seu desenvolvimento e ativação alterados pela leptina, apresentando menor citotoxicidade em animais resistentes a leptina (SIEGMUND *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2003) (Fig 1).

Estudos *in vitro* mostram também que a sinalização da leptina pode alterar a maturação e sobrevivência de células dendríticas. Além disso, na ausência dessa

sinalização, essas células apresentadoras de antígenos tem uma tendência maior de estimular linfócitos T auxiliares para um perfil Th2 enquanto o tratamento com leptina exógena provocaria o balanceamento normal do perfil Th1 (LAM *et al.*, 2006; MATTIOLI *et al.*, 2005).

A modulação da imunidade adaptativa pela leptina é destacada pelo aumento da sobrevivência de célula T e o estímulo da produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e a IL-2 (LOFFREDA *et al.*, 1998). Além disso, sua deficiência causa atrofia tímica (LORD *et al.*, 1998). Apesar de ser conhecida por favorecer o perfil Th1 e de ter sido encontrada menor produção de IFN- γ , citocina clássica de Th1, em camundongos deficientes para leptina (BUSSO *et al.*, 2002), parece que a ausência da leptina prejudica a polarização de células TCD 4 tanto para Th1 quanto para Th2 (BATRA *et al.*, 2010).

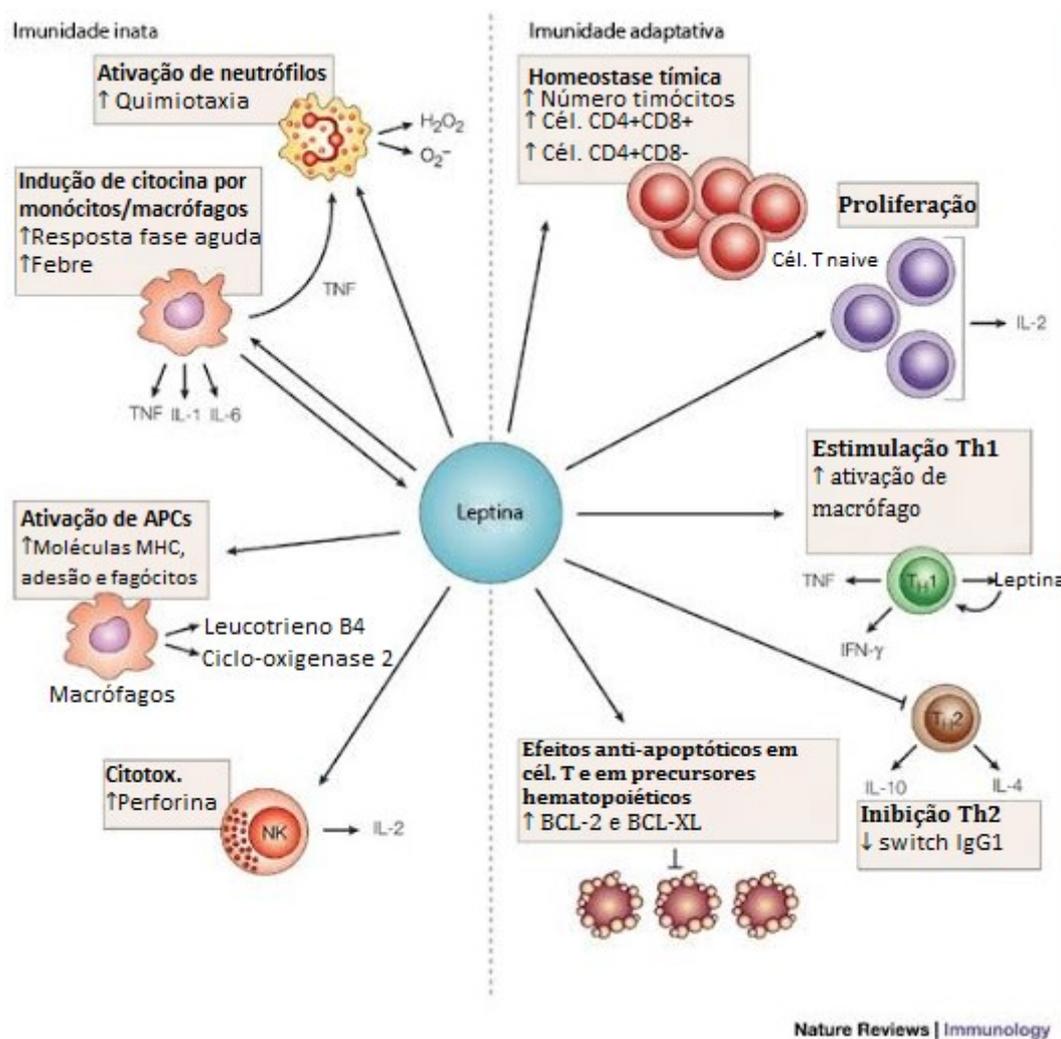


Figura 1: Efeitos da leptina na imunidade inata e adaptativa, adaptado de (CAVA; MATARESE, 2004)

Obesidade e sistema imune

A obesidade está relacionada com um estado inflamatório crônico de baixo grau, devido aos altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e quimiocinas como a CCL2, entre outras e por isso pode ser implicado no desenvolvimento de diversas enfermidades como diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e outras (BERG; SCHERER, 2005; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

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; WEISBERG *et al.*, 2003).

A maioria das células T residentes no tecido adiposo de indivíduos magros são células T-reguladoras (Tregs) 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 efectoras 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). Assim 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 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. Essas células podem ter sua função, propriedades e estados de ativação moldados pelo seu ambiente. 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.

O perfil de ativação dos macrófagos foi dividido em dois estados de polarização, M1 e M2 (GORDON; TAYLOR, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2004). M1, macrófagos "classicamente" ativados são induzidos por mediadores pró-inflamatórios, como LPS e IFN- γ , tem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12)

aumentada e são capazes de gerar espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico, através da ativação de iNOS (NOS2). M2, macrófagos "alternativamente ativados" podem ser gerados pela exposição a IL-4 e IL-13 (GORDON, 2003), apresentam baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias e expressam altos níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Além disso, a produção da arginase é aumentada em M2, que bloqueia a atividade da enzima iNOS por uma variedade de mecanismos, como por competir pelo substrato arginina, necessário para a produção de NO (BRONTE; ZANOVELLO, 2005).

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 existem no tecido adiposo, e de acordo com o aumento de macrófagos residentes do 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).

Devido a tantas alterações, já é 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). Existem evidências sugerindo também 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. (MILNER; BECK, 2012).

Existem diferentes modelos para estudo da obesidade, utilizando alterações genéticas ou dieta. Entre os mutantes, 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 tudo o que poderia potencialmente alterar a homeostase a função das células do sistema imune (KENNEDY *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que a linhagem murina C57BL/6 produz um fenótipo obeso quando ofertadas dietas hiperlipídicas e hipercalóricas e quando submetidos a uma dieta pobre em lipídeos e calorias permanecem com o peso normal. Além disso, BUETNER *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). Os camundongos obesos por essa via também 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.

Malária

Apesar dos contínuos avanços no conhecimento sobre a malária, a doença continua a causar significativa morbidade e mortalidade nas áreas onde é prevalente. Segundo a OMS, 97 países e territórios estiveram sujeitos à transmissão de malária em 2014, incluindo o Brasil, deixando aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas em risco, quase metade da população do planeta. De acordo com o relatório liberado em dezembro de 2014, foram 198 milhões de casos de malária em 2013 e 584 mil mortes. As pessoas que vivem nos países mais pobres são as mais vulneráveis à malária. Todos os anos 90% de todas as mortes por malária ocorreram na África e na maioria crianças menores de 5 anos de idade. (WHO, 2015).

A malária também continua sendo um problema de grande preocupação para a saúde pública no Brasil, com aproximadamente 145 mil casos registrados em 2014 (Ministério da Saúde, 2015). No Brasil, a maioria dos casos ocorre na região amazônica, área endêmica da malária, porém devido a migração de pessoas já foram encontrados surtos na região extra-amazônica (LORENZ *et al.*, 2015).

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 das espécies são similares, 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 merozoítas 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. (Fig 2). (ANTINORI *et al.*, 2012; SCHOFIELD; GRAU, 2005).

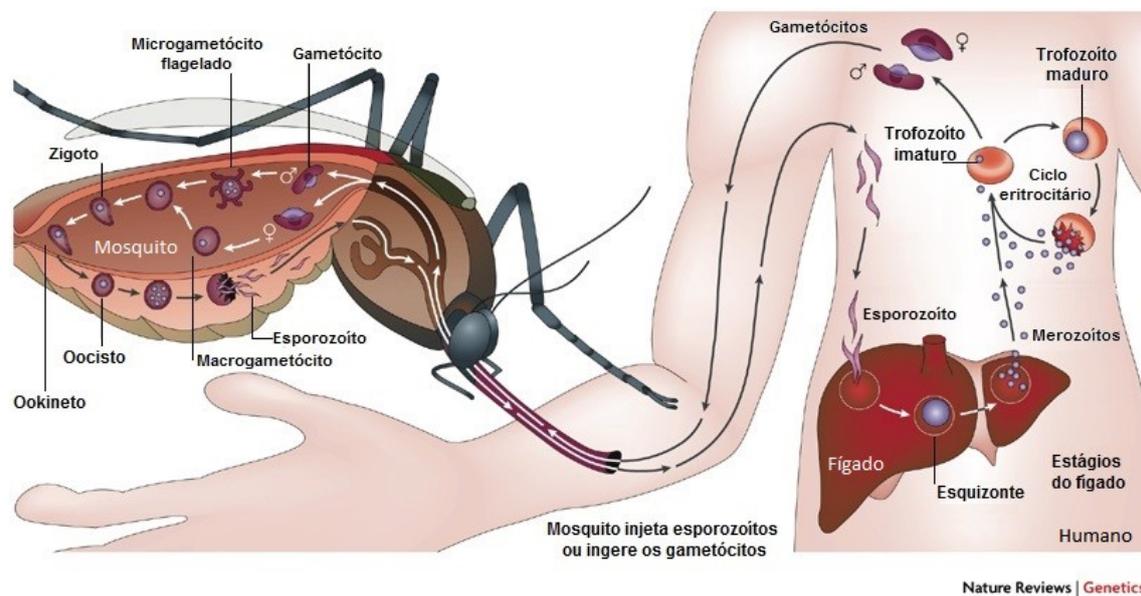


Figura 2: Desenho esquemático demonstrando o ciclo de vida dos parasitas do gênero *Plasmodium*. (adaptado de (SU; HAYTON; WELLEMS, 2007))

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,2015).

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 (SOUZA; RILEY, 2002).

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 (MILLER *et al.*, 2002).

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 (GRAU *et al.*, 1987, 1990). 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. (HUNT; GRAU, 2003)

Muitos estudos mostram que citocinas pró- inflamatórias Th1 são determinantes cruciais do estados da doença (SCHOFIELD; GRAU, 2005). O fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) podem estar relacionados com os picos febris característicos da patogênese da malária, e estão elevadas em indivíduos infectados (CLARK, 2007; CLARK *et al.*, 2006, 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, e 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).

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 hemato-encefálica através de mecanismos dependentes de perforina. (NITCHEU *et al.*, 2003)

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).

Malária e Obesidade

Ainda é raro encontrar 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. (GORYAKIN *et al.*, 2015; MOKHTAR *et al.*, 2001; PRENTICE, 2006).

A obesidade tem como característica uma inflamação sistêmica de baixo grau crônica, com alterações imunológicas (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011) e acredita-se que 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).

Em um estudo utilizando o modelo genético de camundongos obesos, camundongos deficientes para leptina (ob/ob) foi demonstrado que eles não desenvolveram a malária cerebral e apresentaram um crescente aumento da parasitemia levando à anemia grave (ROBERT *et al.*, 2008). Nesse caso parece que a obesidade pode desempenhar um papel protetor, neutro ou permissivo na evolução das infecções de malária e manifestações fisiopatológicas subseqüentes.

Portanto, muitos fatores podem interferir no desenvolvimento na doença, principalmente a leptina, que influi de maneira decisiva no sistema imunológico.

Um estudo recente mostrou que o estado nutricional do hospedeiro pode afetar patologias infecto-parasitárias, mostrando que a restrição alimentar também levou ao menor acúmulo de parasitas e leucócitos no cérebro, protegendo o animal do desenvolvimento da malária cerebral experimental. (MEJIA *et al.*, 2015).

Muitos estudos relacionam a obesidade e doenças características de países de primeiro mundo, como doenças cardíacas, câncer, diabetes tipo 2, asma e hipertensão. 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.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

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

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o desenvolvimento da obesidade induzida por meio de dieta hiperlipídica
- Comparar a parasitemia e a mortalidade de camundongos obesos e não obesos infectados por *Plasmodium berguei* ANKA.
- Avaliar da leptina presente no soro dos animais, por meio de ELISA.
- Avaliar das principais populações celulares envolvidas na resposta imune a malária no baço e na gordura através de citometria de fluxo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. 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 (028/2010).

2.2. 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 indivíduos controles e obesos infectados por *Plasmodium berghei* ANKA. Por possuir uma grande barreira de tecido adiposo concentrada na região do ventre, foram testadas injeções intraperitoneais e retro orbitais, para descartar a interferência do fator físico da passagem dos parasitas. Foram utilizados 30 animais, 20 deles alimentados com a ração hiperlipídica (grupo obeso) e dez com a ração padrão (grupo não obeso), cada grupo foi dividido em dois para a infecção com o *Plasmodium*, o primeiro grupo, de animais obesos, teve 10 animais infectados pela via intraperitoneal, e 10 pela via retro orbital. Três animais do grupo controle foram utilizados como repique, e o restante foi dividido, portanto quatro animais receberam a injeção intraperitoneal e três pela via retro orbital.

Nos experimentos seguintes foram utilizados 20 animais (10 obesos e 10 controles), e foram formados quatro grupos, com cinco animais cada grupo, de controles não infectados, controles infectados, obesos não infectados e obesos infectados, dos quais foram coletados os órgãos utilizados para as demais análises.

2.3. Indução da obesidade

A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica produzida no laboratório, com a pesagem e mistura de cada um dos componentes (tabela 01), a fim de obter uma porcentagem de 60% de gordura, mas com a quantidade equivalente 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 1: 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

2.4. 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 ou retro orbital com 10^6 hemácias parasitadas e os controles receberam uma injeção pelas mesmas vias de solução salina.

2.5. Curva de Parasitemia

Após a infecção, foram confeccionados esfregaços a partir do terceiro dia de infecção diariamente para medir a parasitemia dos animais. As amostras de sangue eram obtidas por uma pequena secção na ponta da cauda dos camundongos seguindo com o esfregaço sanguíneo, as lâminas então eram coradas com um kit rápido de coloração panótica. Para a determinação da parasitemia foi considerada a porcentagem de hemácias parasitadas em um total de 1000 hemácias contadas por microscopia óptica com aumento de 100x.

2.6. Curva de Mortalidade

Para avaliar o impacto da obesidade no curso da infecção por *P.berghei* ANKA, cepa indutora de malária grave em C57BL/6, estes foram acompanhados diariamente até o 30^o dia após desafio, acompanhando os óbitos que foram registrados para o delineamento da curva de mortalidade.

2.7. Dosagem de Leptina

A concentração de leptina no soro foi determinada por ELISA (R&D Systems), seguindo as recomendações apresentadas no protocolo do fabricante. A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. Os cálculos das concentrações obtidas foram realizados a partir da curva padrão, obtida das diferentes concentrações do anticorpo recombinante.

2.8. Avaliação fenotípica da população celular da gordura e do baço

Foram avaliadas na gordura e no baço, por citometria de fluxo, a presença de marcadores indicativos de linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, macrófagos de perfil M1 e M2, e para a presença de linfócitos T reguladores e células dendríticas.

Para obtenção das células do baço o órgão foi submetido à maceração e digestão com ACK, já para a obtenção de células do tecido adiposo foi usada a colagenase por 2 horas sob agitação. As células provenientes das fontes acima foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para 10^6 células por poço. As células foram então depositadas em placas de 96 wells com fundo em U e incubadas com os seguintes anticorpos: anti-CD4 anti-CD8, anti-CD3, anti CD25, anti FOXP3, anti NK-1.1, anti IL-10, anti IFN γ , anti CD80, anti CD86, anti F4/80, anti CD11b, anti CD11c, por 20 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Após a incubação, as células foram lavadas com adição de PBS aos poços e a placa centrifugada por 10 minutos a 1500rpm, em seguida as células foram fixadas com formaldeído 1% e submetidas a leitura no citômetro de fluxo FACScanto, Para a marcação das citocinas intracelulares: IL10 , IFN-y e IL12, as células foram estimuladas e permeabilizadas por 20nM/mL de PMA e 1uM/mL de ionomicina, depois o estímulo foi interrompido por monencina para então serem marcadas para os anticorpos extracelulares, após a fixação desses marcadores as células foram permeabilizadas por saponina e foram feitas as marcações intracelulares, as células então foram também fixadas com formaldeído 1% e submetidas a leitura no citômetro de fluxo FACScanto.

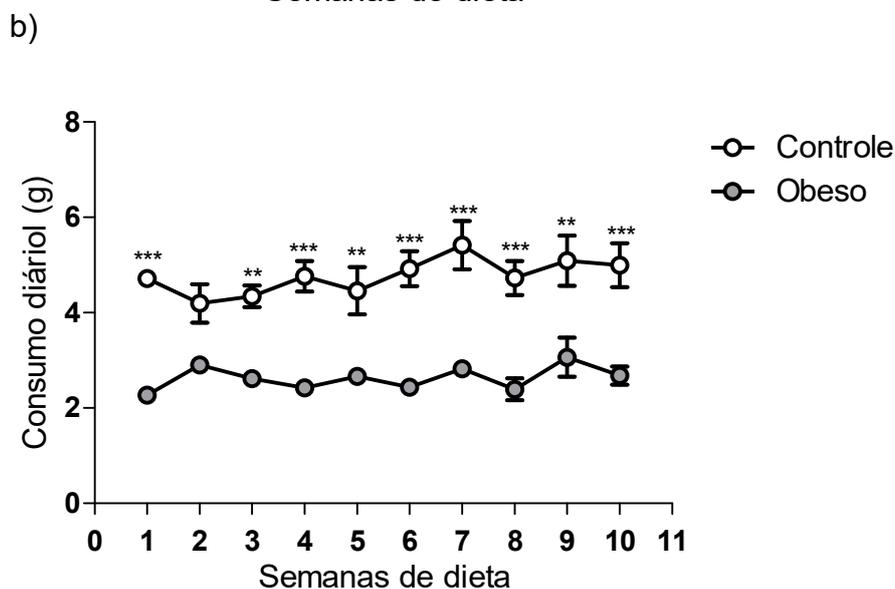
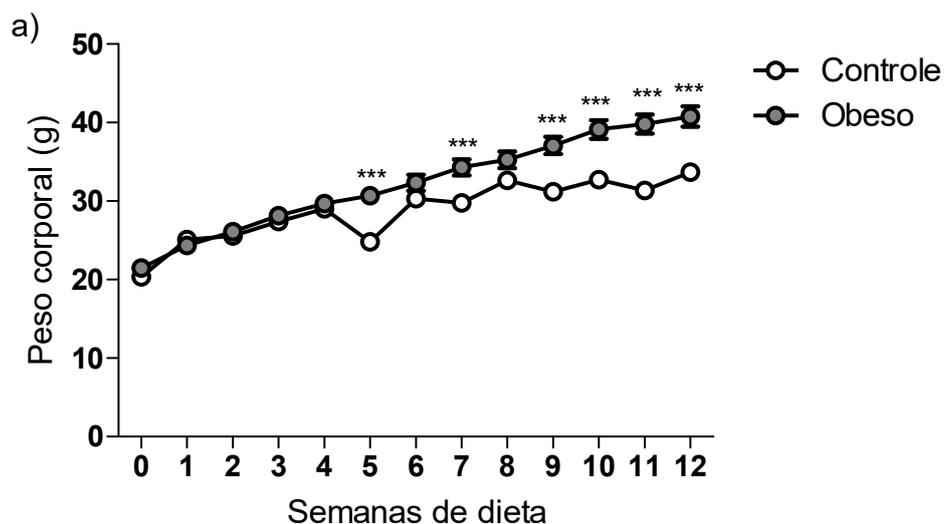
2.9. Análise estatística

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. como significativo $p < 0.05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS, considerando como significativo $p < 0.05$. Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da indução do modelo de obesidade em camundongos C57BL/6

Foi observado aumento significativo de peso dos animais alimentados pela ração hiperlipídica a partir da quinta semana (Fig.4a), esses animais, considerados obesos, tiveram desde o início menor consumo de ração quando comparados com os controles (Fig. 4b), indicando que o ganho de peso se deve a ingestão de uma dieta rica em lipídeos e não a hiperfagia. Além disso, a diferença significativa do peso da gordura perigonadal dos animais obesos em relação aos controles no final da dieta também indicou o quadro de obesidade (Fig. 4c).



c)

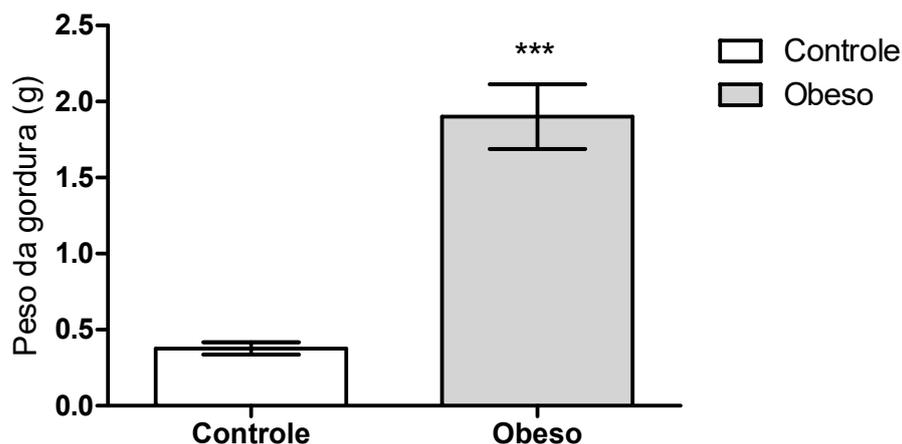


Figura 3: Peso Corporal e Consumo de ração. Animais obesos apresentam aumento do peso corporal e menor consumo de ração. a. Ganho de peso corporal ao longo de doze semanas de dieta. Asteriscos representam diferença significativa realizado através do teste One-Way anova, seguido por post-hoc Bonferroni. (** : $p \leq 0,01$ *** : $p \leq 0,001$) b. Consumo médio diário de ração por animal ao longo de doze semanas de dieta. Asteriscos representam a diferença significativa entre controle e obeso. c. Peso da gordura perigonadal no final das doze semanas de dieta. Asteriscos representam a diferença significativa (*** $p \leq 0,001$); entre controle e obeso, realizado através do teste T student (n = 10 controles e 20 obesos)

A leptina é um dos hormônios mais associados à obesidade, e já foi demonstrado que é proporcional a adiposidade (ZHANG, Y *et al.*, 1994). Assim como o aumento do peso corporal e do peso da gordura perigonadal, foi observado aumento na concentração sérica de leptina no tecido adiposo em ambos os grupos que receberam dieta hiperlipídica quando comparados aos grupos que receberam a dieta padrão (Fig. 5).

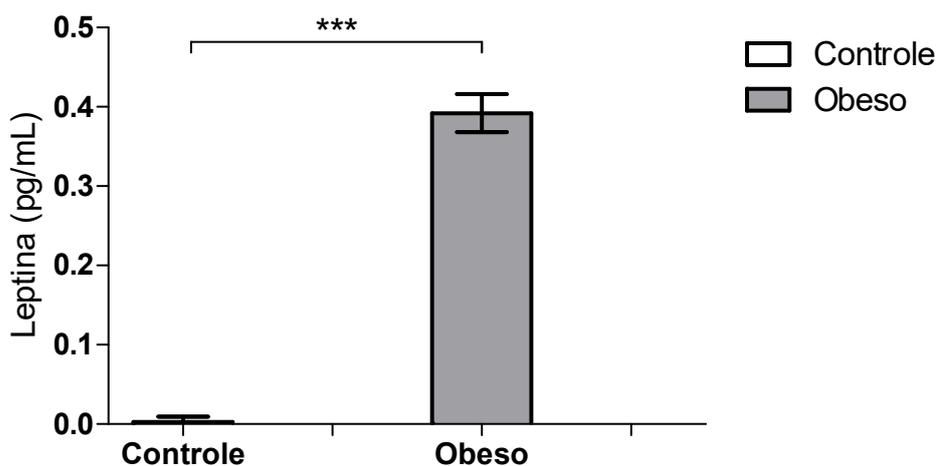


Figura 4: Concentração de leptina no soro. Aumento da concentração de leptina no soro de animais obesos. Cada barra representa a média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; significativamente diferente do grupo controle. Teste T student (n= 5 controles, 10 obesos).

3.2. Influência da obesidade na parasitemia e mortalidade

Para assegurar que os parasitas tiveram acesso à corrente sanguínea, e não ficaram retidos na camada de tecido adiposo, dois métodos de infecção foram utilizados, via intraperitoneal e via retro orbital. A evolução da parasitemia foi acompanhada a partir da obtenção de esfregaços sanguíneos delgadas nos dias 4, 5, 6 e 7 pós-infecção de todos animais, e adicionalmente nos dias 12, 16 e 20 dos animais sobreviventes.

Houve uma evidente e intensa evolução na parasitemia nos animais do grupo controle a partir do 5º dia após a infecção que foi crescente até atingir de 7 a 11% de hemácias parasitadas no sangue, enquanto a porcentagem de hemácias parasitadas nos animais obesos permaneceu constante, não ultrapassando 2%. (Fig. 5). Não houve diferença de parasitemia entre as vias de infecção, intraperitoneal ou via retroorbital (Fig. 6).

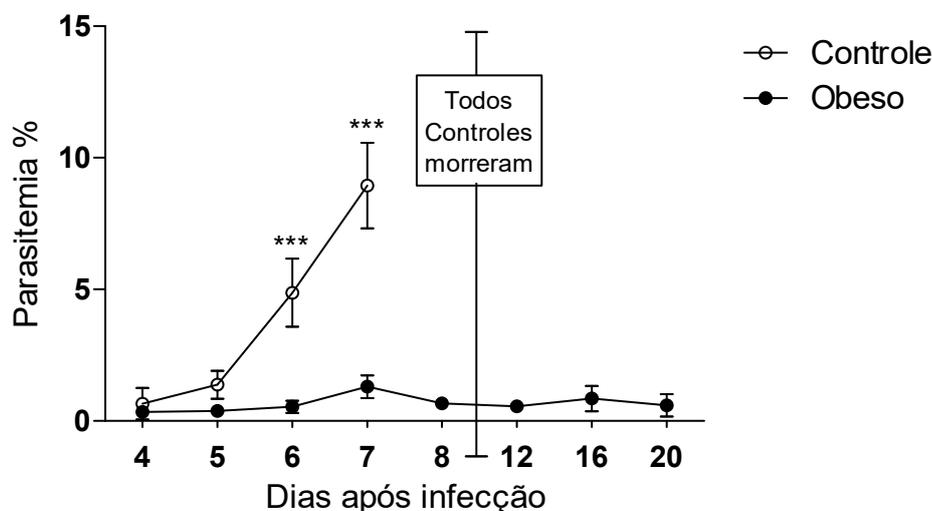


Figura 5: Média das parasitemias diárias dos animais controles e obesos, a partir do quarto dia pós-infecção com *P. berghei* ANKA com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas. A parasitemia foi avaliada com contagem as cegas de esfregaços sanguíneos sob microscopia óptica (aumento 1000X - imersão). Os dados foram analisados pelo teste Two-way RM ANOVA (n = 7 controles e 20 obesos).

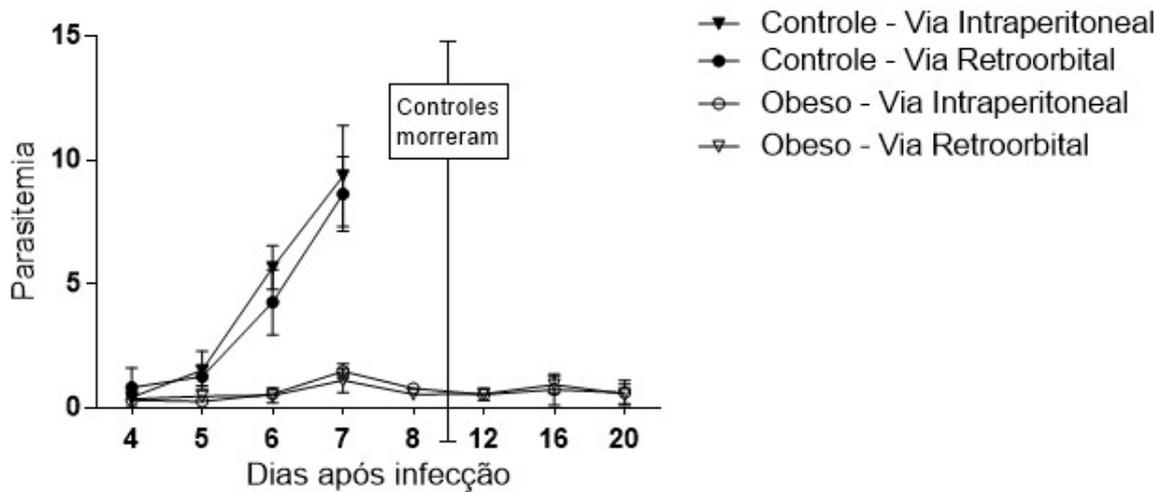


Figura 6: Média das parasitemias diárias dos animais controles e obesos com diferentes vias de infecção, a partir do quarto dia pós-infecção com *P. berghei* ANKA com inóculo padronizado de 10^6 hemácias parasitadas. A parasitemia foi avaliada com contagem as cegas de esfregaços sangüíneos sob microscopia óptica (aumento 1000X - imersão). Os dados foram analisados pelo teste Two-way RM ANOVA (n = 7 controles e 20 obesos).

Também foi avaliado o curso temporal da doença obtido a partir do monitoramento diário da taxa de sobrevivência desses animais após o início da infecção. Durante este período, foi possível observar que a inoculação dos plasmódios nos camundongos alimentados com a ração padrão resultou em uma infecção aguda e letal que iniciou-se no 7º d.p.i., mantendo-se até o 11º d.p.i., com uma significativa diminuição na taxa de sobrevivência no 8º d.p.i, no entanto a inoculação em camundongos obesos da mesma carga parasitária levou a uma baixa parasitemia que não evoluiu para óbito (Fig. 7).

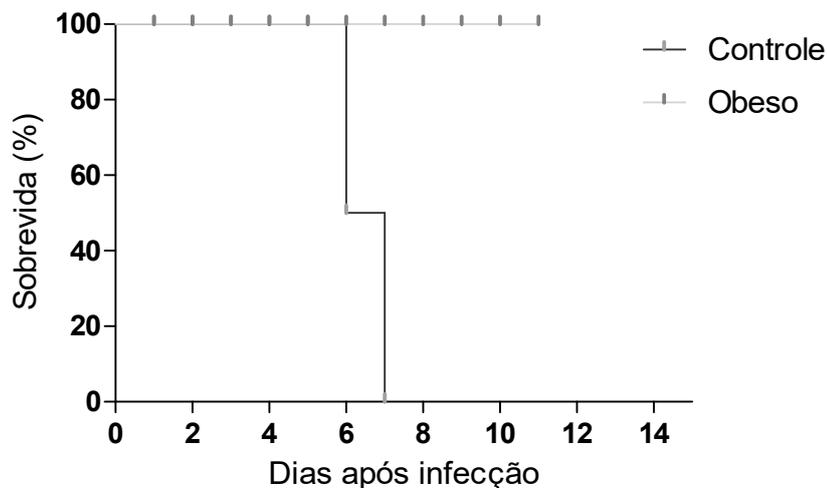


Figura 7: Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA. Os animais foram inoculados com $\approx 10^6$ de eritrócitos parasitados. (n = 7 controles e 20 obesos).

3.3. Influência da obesidade na população de linfócitos na gordura e no baço

Ao analisar a citometria de fluxo foi observado um aumento significativo da população absoluta de células T CD4+ (Fig. 8a e 8b) e TCD8+ (Fig. 8c) nos obesos em relação aos controles. Além disso, as células T citotóxicas estão em maior porcentagem na gordura dos obesos infectados (Fig. 8d)

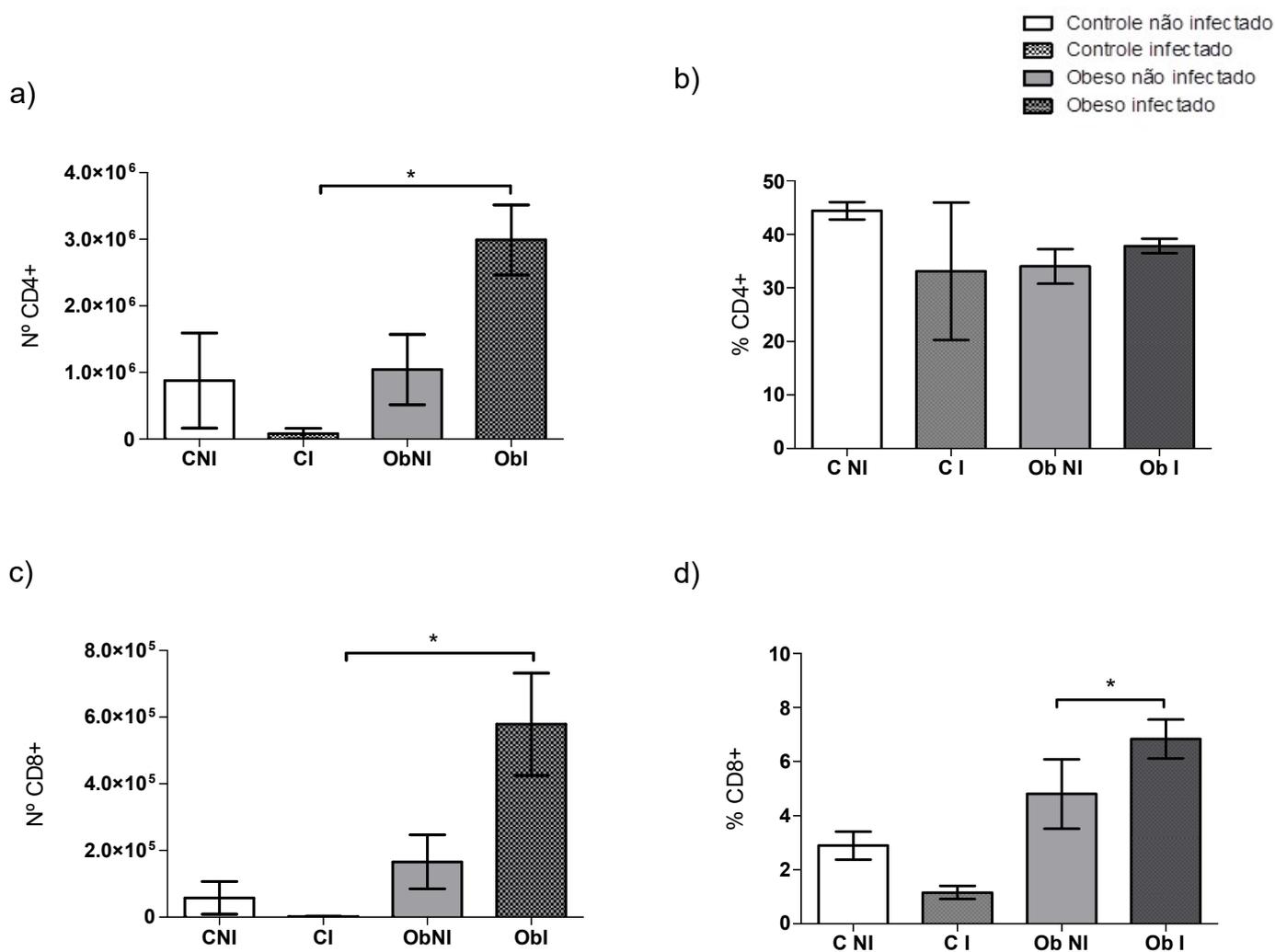


Figura 8: Análise de população de linfócitos TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo da gordura a. número absoluto de células TCD4 b. porcentagem de células T CD4 c. número absoluto de células TCD 8 d. porcentagem de células T CD 8. * p<0,05; significativamente diferente do grupo controle. Two-way anova, post test bonferroni (n= 3 e 2 controles, 5 obesos).

O baço é um grande reservatório de células imunológicas, e responsável por filtrar as células do sangue, no nosso trabalho não foram encontradas diferenças significativas entre as populações de linfócitos nesse órgão (Fig 9). Na infecção por *P. berghei* – ANKA as hemácias parasitadas são rapidamente sequestradas para o cérebro, diminuindo a sua disponibilidade na corrente sanguínea e evitando que haja uma forte resposta no do baço.

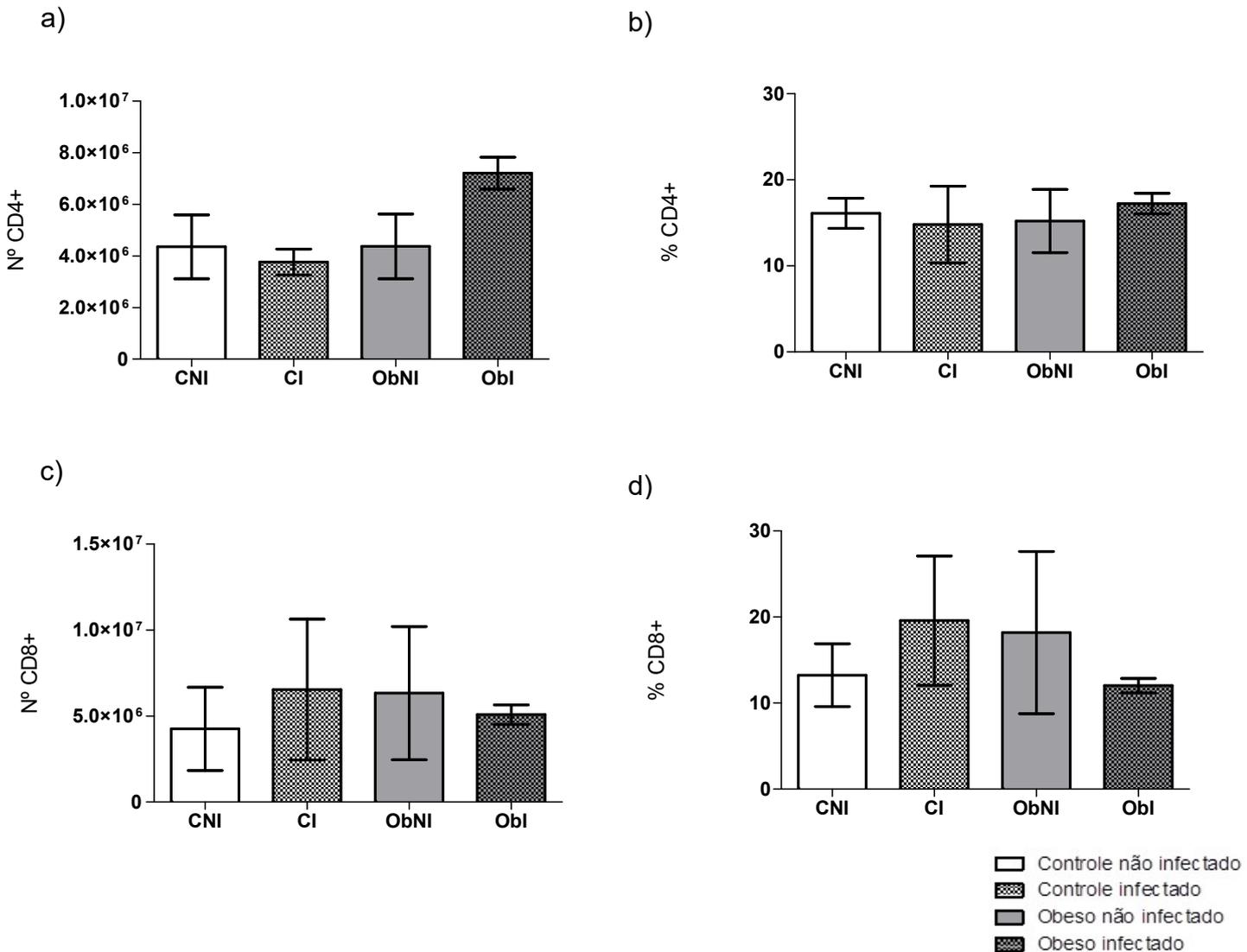


Figura 9: Análise de população de linfócitos TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo do baço a. número absoluto de células TCD4 b. porcentagem de células T CD4 c. número absoluto de células TCD 8 d. porcentagem de células T CD 8. * $p \leq 0,05$; significativamente diferente do grupo controle. Two-way anova, post test bonferroni (n= 3 e 2 controles, 5 obesos).

As células T regulatórias podem ser marcadas como TCD4+ CD25+, além disso, podem expressar FoxP3, fator de transcrição da família forkhead, que desempenha um papel fundamental na sua atividade de célula supressora do sistema imune. Apesar de não alcançar diferença significativa na população absoluta, existe uma tendência de maior população de células T CD4+ CD25+ FoxP3 na gordura dos obesos infectados (Fig 10a e 10b). Porém a porcentagem dessas células mostra diferença significativa de células T CD4+ CD25+ e FOXp3 do controle infectado em relação aos outros animais.

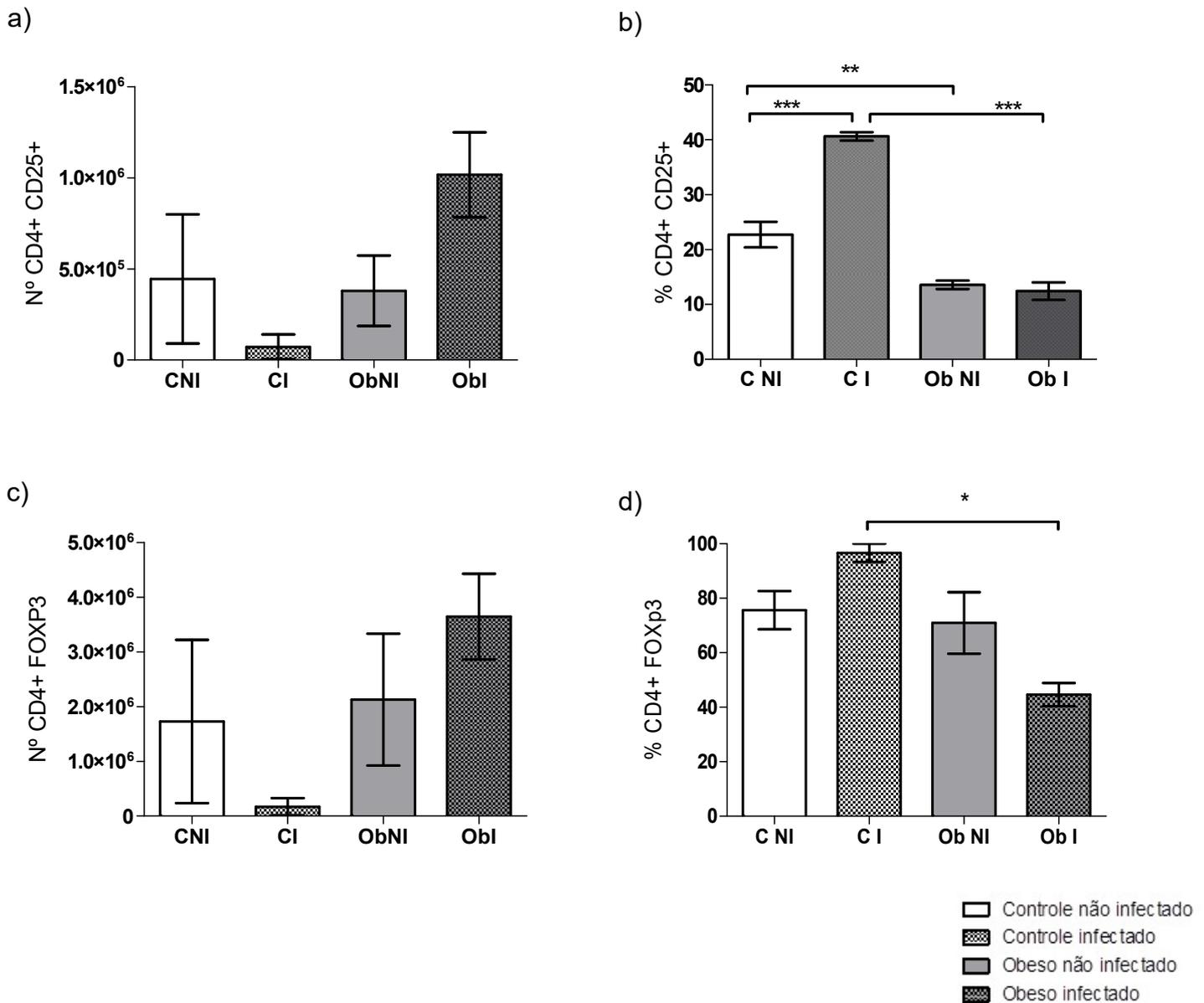


Figura 10: Análise de população de linfócitos T regulatórios por meio de citometria de fluxo da gordura a. número de células TCD4+ expressando CD25+ b. porcentagem de células TCD4+ expressando CD25+ c. número de células TCD4+ CD25+ expressando FoxP3 d. porcentagem de células TCD4+ CD25+ expressando FoxP3. * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001; significativamente diferente do grupo controle (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). Two-way anova, post test bonferroni

A regulação de células auxiliares para um perfil Th1 ou Th2, pode ser muito importante para o curso da infecção, portanto analisamos na gordura células TCD4+ expressando IL10 e células TCD4+ e TCD8+ expressando IFN- γ . Não foram encontrados resultados significativos para definir o perfil linfocítico do tecido adiposo.

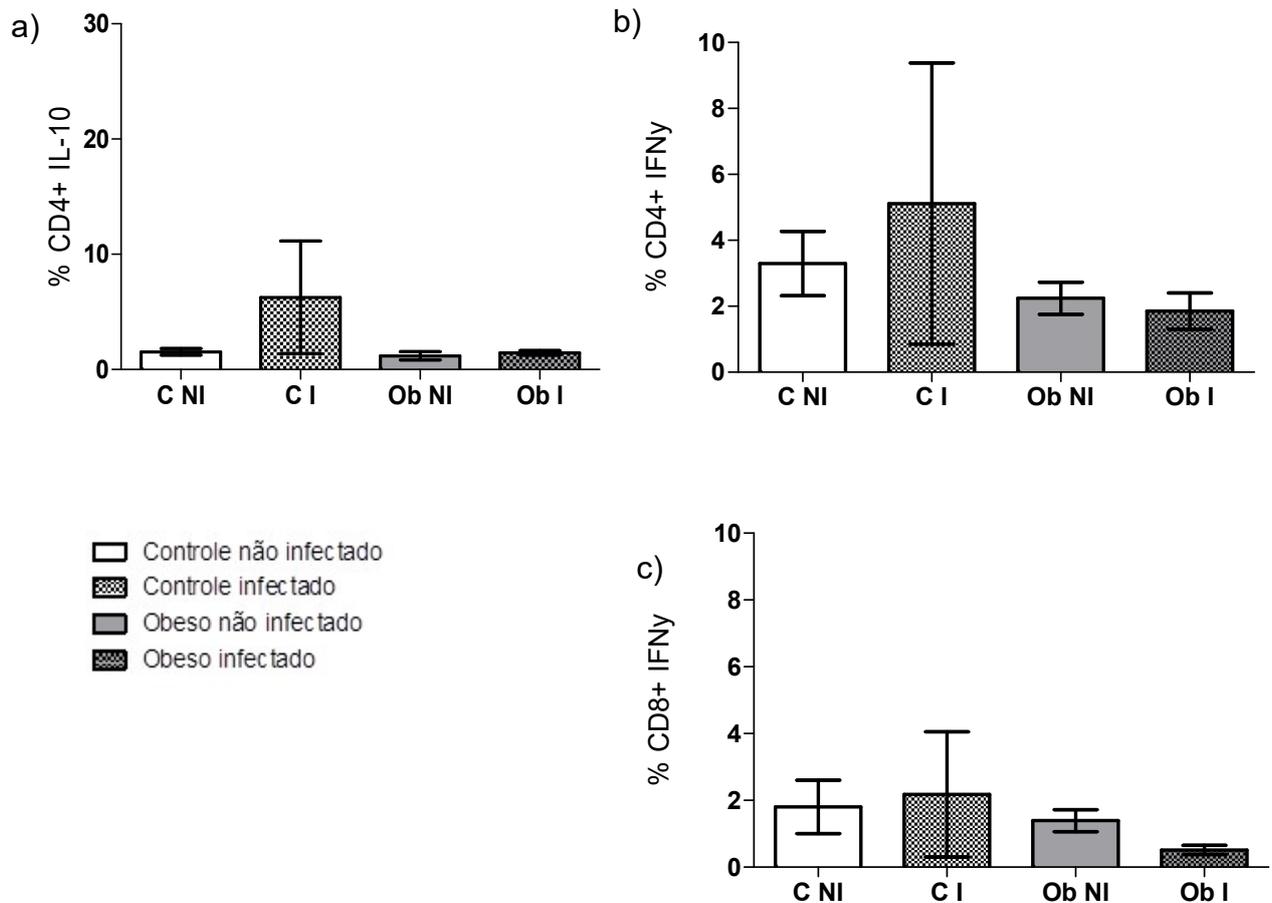


Figura 11: Análise da produção de citocinas por células TCD4 e TCD8 por meio de citometria de fluxo da gordura a. porcentagem de células TCD4+ produzindo IL-10 b. porcentagem de células TCD4+ produzindo IFN- γ c. porcentagem de células TCD8+ produzindo IFN- γ (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). One-way anova, post test bonferroni.

3.4. Influência da obesidade na população de monócitos na gordura

Uma característica da obesidade é o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, e é importante saber se eles estão polarizados para um perfil classicamente ativado M1, que produz citocinas pro inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-12 ou alternativamente ativado M2 com a produção de citocinas anti inflamatórias como IL-10 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). Apesar de não serem significativos, aparentemente existem mais macrófagos expressando IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no tecido adiposo dos animais controles infectados.

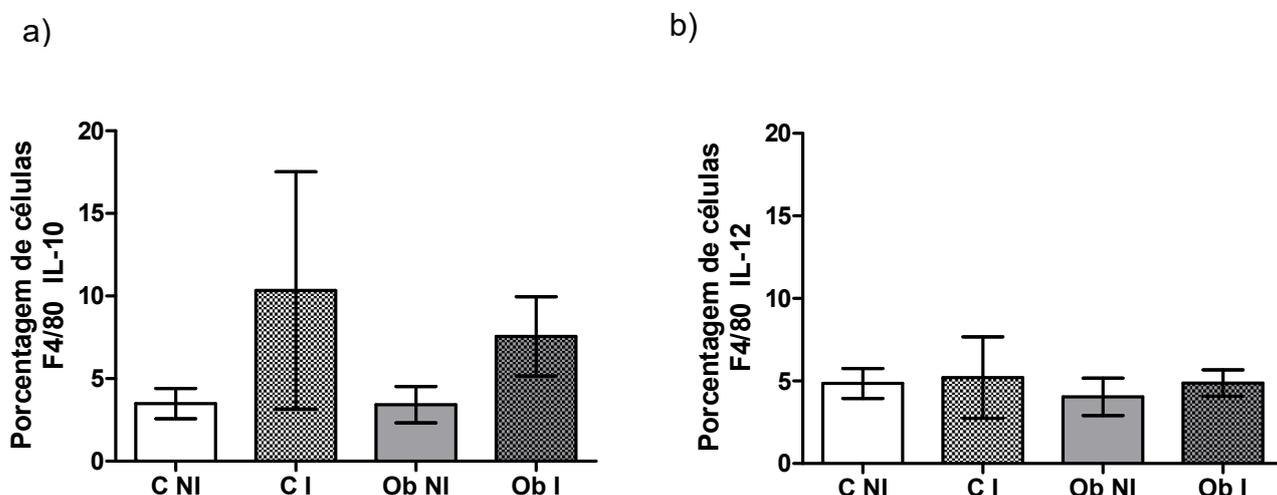


Figura 12: Análise do perfil de ativação de macrófagos da gordura por meio de citometria de fluxo a. número de células F4/80 produzindo IL-10 b. porcentagem de células F4/80 produzindo IL-10 (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). One-way anova, post test bonferroni

3.5. Influência da obesidade na população de células NK no baço

Já foi demonstrado que as células NK também medeiam a resposta inflamatória durante a malária, secretando IFN- γ durante a infecção em humanos (BARATIN *et al.*, 2005) e em camundongos (ING; STEVENSON, 2009). Além disso as células NK parecem contribuir para indução da malária cerebral experimental, já que a depleção dessa linhagem celular por anticorpos protege camundongos C57BL/6 da malária cerebral induzida por *P. berghei* ANKA (HANSEN *et al.*, 2007).

Apesar de não alcançar diferença significativa, os animais do grupo controle infectado parecem ter mais células NK quando comparados aos obesos infectados.

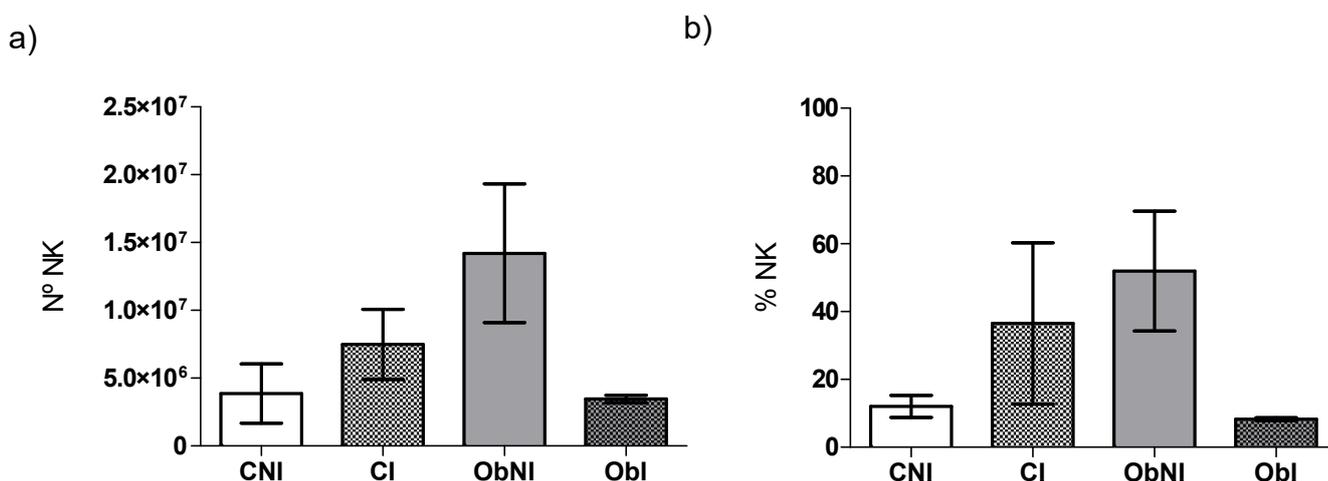


Figura 13: Análise de população de células NK por meio de citometria de fluxo do baço a. número de células NK 1.1 b. porcentagem de células NK 1.1. (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). One-way anova, post test bonferroni

3.6. Influência da obesidade na população de macrófagos e células dendríticas no baço

Os marcadores analisados CD80 CD11b, CD86 CD11b são característicos de macrófagos, enquanto os primeiros caracterizam a ativação dessas células, os últimos são constitutivos. Parece haver a tendência de maior número de macrófagos ativados nos controles infectados, mas não foram encontradas diferenças significativas.

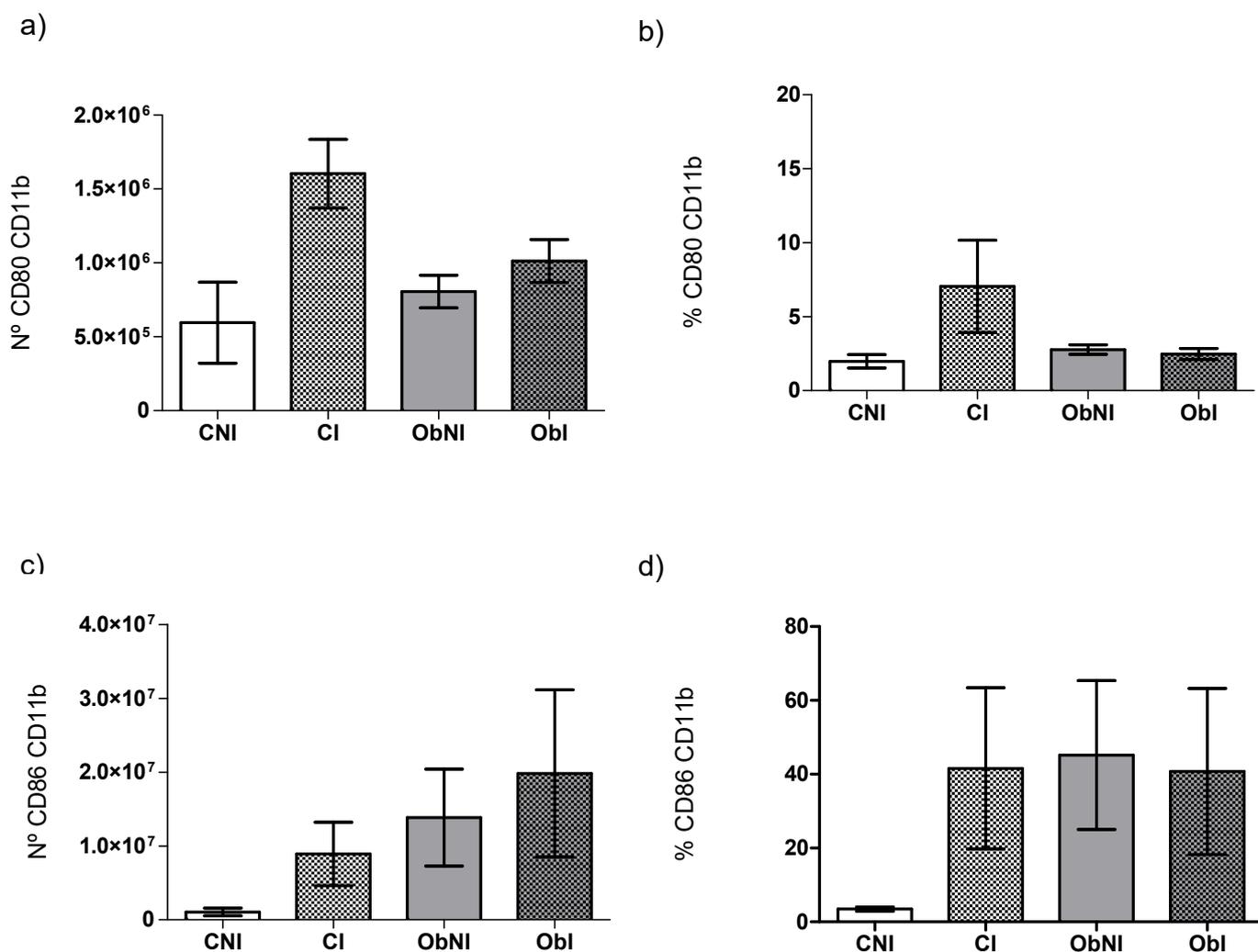


Figura 14: Análise de população e ativação de macrófagos por meio de citometria de fluxo do baço. a. número de células CD80 CD11b b. porcentagem de células CD80 CD11b c. número de células CD86 CD11b d. porcentagem de células CD86 CD11b (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). One way anova, post test bonferroni

As células dendríticas são as principais apresentadoras de antígenos, e por isso essenciais para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Não foram encontradas diferenças significativas mas, existe uma tendência de essas células estarem em maior número e porcentagem nos controles infectados, apesar de ainda estar alta nos obesos não infectados devido á inflamação crônica de baixo grau característica da obesidade, esse número decresce de alguma maneira nos animais obesos infectados, o que pode favorecer esses animais nessa doença especificamente.

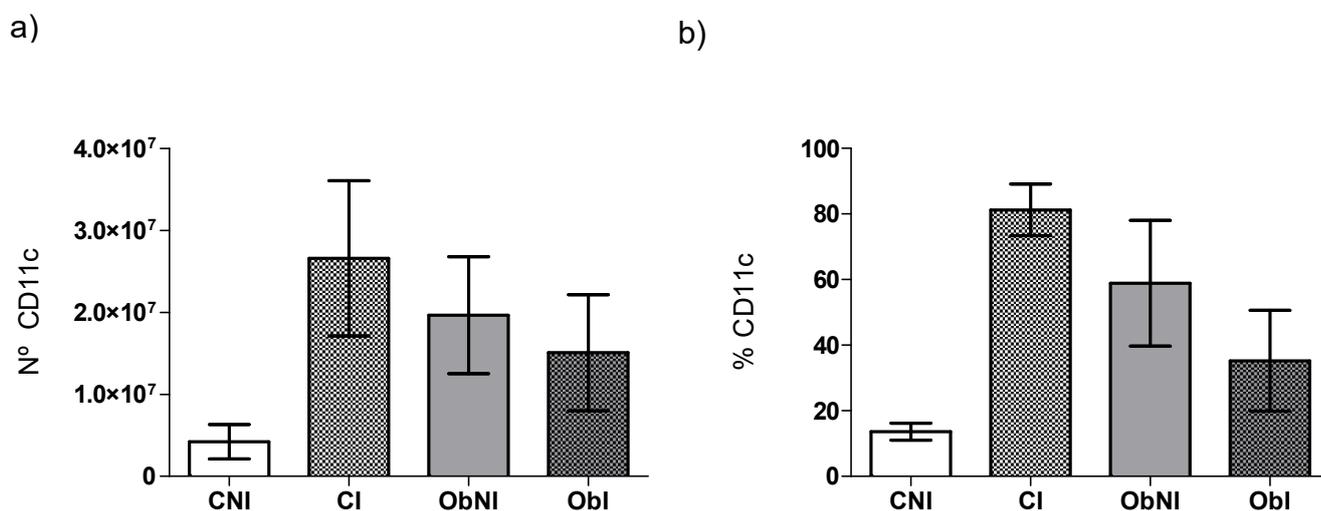


Figura 15: Análise de população de células dendríticas por meio de citometria de fluxo do baço. a. número de células CD11c b. porcentagem de células CD11c (n= 3 e 2 controles, 5 obesos). One way anova, post test bonferroni

3. DISCUSSÃO

A obesidade, caracterizada por uma inflamação sistêmica de baixo grau, é capaz de modificar a resposta imunológica do animal obeso frente a uma infecção (MILNER; BECK, 2012).

Com o objetivo de avaliar a influência da obesidade no curso da malária grave, foi utilizado um modelo de indução de obesidade utilizando a linhagem C57BL/6 de camundongos para produzir um modelo susceptível tanto ao desenvolvimento da malária grave quanto a obesidade (LIN *et al.*, 2000) (LI; SEIXAS; LANGHORNE, 2001).

Os resultados obtidos demonstram que após a alimentação por dieta hiperlipídica por 12 semanas os animais apresentaram características condizentes com o quadro de obesidade, como o significativo ganho de peso e acúmulo da gordura perigonadal, que é reconhecida como mais envolvida com o processo inflamatório e com as doenças metabólicas que frequentemente acompanham a obesidade (BUCCI *et al.*, 2015). É importante ressaltar que a obesidade foi ocasionada pelo alto teor de lipídios da dieta e não por hiperfagia, já que desde o princípio os animais alimentados com a dieta hiperlipídica ingeriram menor quantidade de ração.

Nesse estudo observou-se que a obesidade induzida por dieta protegeu os animais do desenvolvimento da malária cerebral já que houve maior sobrevivência do grupo alimentado por dieta hiperlipídica, além de menores níveis de parasitas circulantes ao longo dos dias após a infecção nos animais obesos.

De acordo com o encontrado na literatura (PIJL; TOORNVLIET; MEINDERS, 1996), foi observado aumento significativo dos níveis séricos de leptina nos animais obesos. A leptina é um hormônio principalmente secretado pelo tecido adiposo que também tem ação de citocina sendo potente indutora de respostas inflamatórias, principalmente associadas a um perfil Th1, com ativação de mecanismos efetores da resposta imune mediada por células (LAM; LU, 2007; LOFFREDA *et al.*, 1998). Em um estudo utilizando o modelo deficiente para leptina *ob/ob*, também foi encontrada maior sobrevivência, porém, nesse caso, a parasitemia dos animais *knockout ob/ob* continuou a aumentar, levando a um quadro de anemia típico da malária.

Para comprovar que a resistência era devido ao maior tamanho do camundongo, o autor desse artigo ajustou as doses de infecção, dobrando a quantidade de esporozoítos para os camundongos obesos, e mesmo assim a doença não evoluiu para a malária cerebral (ROBERT *et al.*, 2008). No presente trabalho, ao contrário do

anteriormente citado, foi encontrado alto nível de leptina circulante mas também houve proteção do desenvolvimento da malária grave. A alta de leptina nesse caso pode ter contribuído favorecendo o perfil inflamatório Th1 que pode ter combatido de forma eficaz o parasita.

No presente trabalho, foi testada outra via de infecção, retroorbital, para verificar se os parasitos não estavam sendo detidos por uma barreira física do tecido adiposo e o mesmo resultado foi encontrado nas duas formas de inoculação do parasita.

Após eliminar a via física de proteção que o acúmulo de gordura poderia oferecer foram estudadas possíveis alterações imunológicas desse tecido. Além de ser a fonte primária da inflamação crônica de baixo grau dos animais obesos, a literatura mostra que existe sequestro de eritrócitos infectados no tecido adiposo (FRANKE-FAYARD *et al.*, 2005).

As respostas imunológicas à infecção por *Plasmodium*, em particular respostas de células T, desempenham um papel duplo na malária, mediando mecanismos de proteção e patogênicos. Ao analisar a população linfocítica do tecido adiposo visceral foi encontrado maior número absoluto de células TCD4+ quanto TCD8+ nos animais obesos infectados quando comparados aos controles infectados, e maior porcentagem de células TCD8+.

Em estudos utilizando depleção por anticorpos ou camundongos deficientes de célula T foi demonstrada a dependência da presença de células T CD4 + e células T CD8 + no desenvolvimento da malária cerebral (BAGOT *et al.*, 2004; GRAU *et al.*, 1986; HERMSEN *et al.*, 1997). As células TCD8+, em especial, são indispensáveis na patogênese da doença devido ao seu acúmulo no cérebro produzindo IFN γ , (BELNOUE *et al.*, 2002; NITCHEU *et al.*, 2003), citocina inflamatória conhecida por ser mediadora da malária cerebral (HUNT; GRAU, 2003). Uma hipótese é que sua presença aumentada no tecido adiposo do animal obeso infectado, indica que o combate ao parasito poderia estar sendo realizado ali, onde os danos teciduais consequentes não são tão deletérios quanto em órgãos como o cérebro.

Já as células T regulatórias no tecido adiposo estavam em maior número nos animais infectados do grupo não obeso. A expansão de células CD4+CD25+Foxp3+ durante a infecção por *Plasmodium* pode ser devido a resposta das células Treg a estímulo antigênico (WALKER *et al.*, 2003; YAMAZAKI *et al.*, 2003).

O papel das células Treg na imunossupressão observada durante a malária foi demonstrada em um modelo letal de infecção de *Plasmodium yoelii* 17XL em BALB/c, resultando na incapacidade de controlar a multiplicação do parasita

(HISAEDA *et al.*, 2004). No entanto, um estudo anterior demonstrou que a depleção de células CD25+ não alterou o desenvolvimento da hiperparasitemia e a morte induzida por *P. berghei* NK65, outra cepa letal em camundongos BALB/C (LONG *et al.*, 2003). Ao contrário a estes dois modelos de infecção por Plasmodium, a letalidade durante a malária cerebral induzida por *Plasmodium berghei* ANKA em C57BL/6 não está associada com hiperparasitemia, mas com um processo imunopatológico ligado a resposta inflamatória intensa e síndrome neurológica que conduz à morte de 7-10 dias após a infecção (SOUZA; RILEY, 2002). Os números obtidos no presente trabalho de células TCD4+, TCD8+ e Treg no tecido adiposo sugerem que, se houve sequestro de parasitas para a gordura, esse balanço favoreceu uma resposta imunológica do tipo Th1 permitindo uma resposta mais agressiva no combate à infecção.

De acordo com essa hipótese, apesar de não atingir diferença significativa, foi encontrada uma tendência de maior porcentagem de macrófagos expressando IL10 nos animais do grupo controle infectados. Em animais obesos já foi relatada a polarização de macrófagos para o perfil classicamente ativados M1 secretores de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a inflamação crônica de baixo grau da obesidade (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Além disso, o baço dos animais também foram analisados, e no grupo não obeso infectado houve tendência a maior quantidade de células NK, macrófagos ativados e células dendríticas quando comparados aos obesos também infectados. Um estudo mostrou a capacidade das células dendríticas em fazer apresentação cruzada para células TCD8+ naives durante a infecção (Lundie *et al.* 2008), e outro que as células NK contribuem para a essa apresentação para células citotóxicas fundamentais para o desenvolvimento da patologia (RYG-CORNEJO *et al.*, 2013). Neste trabalho foi observada baixa parasitemia ao longo dos dias nos animais obesos infectados, levando a crer que as células esplênicas não teriam sido estimuladas de forma notável.

De forma geral, os dados obtidos nesse trabalho fornecem evidências para a resistência do desenvolvimento da malária grave, complicação causada pela infecção por *P. berghei* ANKA, em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Em trabalhos recentes foi mostrado que a obesidade também afeta a patogênese da Doença de Chagas, com animais alimentados por dieta hiperlipídica apresentando menor carga parasitária no tecido cardíaco e maior taxa de sobrevivência (NAGAJYOTHI *et al.*, 2014).

De acordo com a análise fenotípica das células do tecido adiposo e do baço dos camundongos experimentais a inflamação de crônica de baixo grau nos camundongos obesos pode ter sido capaz de proteger o camundongo, promovendo uma resposta mais rápida e agressiva aos parasitas, evitando o sequestro de hemácias parasitadas para órgãos vitais.

4. CONCLUSÃO

Esses resultados reunidos demonstraram que a obesidade pode desempenhar papel protetor para o hospedeiro durante a infecção por *P. berghei* ANKA, prevenindo contra o desenvolvimento da malária grave, controlando a parasitemia e evitando a letalidade independentemente da via de infecção. Os dados indicam que o aumento da leptina e a inflamação crônica de baixo grau proveniente do tecido adiposo pode ser responsável por uma resposta mais eficaz, capaz de controlar a replicação dos parasitas.

Este modelo pode contribuir para aprofundar o entendimento da obesidade, e seu papel enquanto modulador do sistema imunológico. A compreensão de como essas alterações podem modificar a resposta frente a uma infecção é relevante para entender o funcionamento do sistema imune em animais obesos e novas abordagens terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amani, V., Vigário, A. M., Belnoue, E., Marussig, M., Fonseca, L., Mazier, D., & Rénia, L. (2000). Involvement of IFN γ receptor mediated signaling in pathology and antimalarial immunity induced by Plasmodium berghei infection. **European journal of immunology**, **30(6)**, 1646-1655.

Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., & Corbellino, M. (2012). Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, **4(1)**, 2012013.

Aronne, L. J., Nelinson, D. S., & Lillo, J. L. (2009). Obesity as a disease state: a new paradigm for diagnosis and treatment. **Clinical cornerstone**, **9(4)**, 9-29.

Bagot, S., Nogueira, F., Collette, A., do Rosario, V., Lemonier, F., Cazenave, P. A., & Pied, S. (2004). Comparative study of brain CD8⁺ T cells induced by sporozoites and those induced by blood-stage Plasmodium berghei ANKA involved in the development of cerebral malaria. **Infection and immunity**, **72(5)**, 2817-2826.

Batra, A., Okur, B., Glaubien, R., Erben, U., Ihbe, J., Stroh, T., ... & Siegmund, B. (2010). Leptin: a critical regulator of CD4⁺ T-cell polarization in vitro and in vivo. **Endocrinology**, **151(1)**, 56-62.

Belnoue, E., Kayibanda, M., Vigario, A. M., Deschemin, J. C., van Rooijen, N., Viguier, M., ... & Rénia, L. (2002). On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **169(11)**, 6369-6375.

BRONTE, Vincenzo; ZANOVELLO, Paola. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nature reviews. **Immunology v. 5**, n. 8, p. 641–654 , 2005.1474-1733

Bucci, M., Karmi, A. C., Iozzo, P., Fielding, B. A., Viljanen, A., Badeau, R. M., ... & Kalliokoski, K. (2015). Enhanced fatty acid uptake in visceral adipose tissue is not

reversed by weight loss in obese individuals with the metabolic syndrome. **Diabetologia**, **58(1)**, 158-164.

Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, **15(4)**, 798-808.

Busso, N., So, A., Chobaz-Péclat, V., Morard, C., Martinez-Soria, E., Talabot-Ayer, D., & Gabay, C. (2002). Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. **The Journal of Immunology**, **168(2)**, 875-882.

Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B., & Vasson, M. P. (2001). Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?. **Journal of Leukocyte Biology**, **69(3)**, 414-418.

Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., & Vasson, M. P. (2003). Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. **Free radical research**, **37(8)**, 809-814.

La Cava, A., & Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. **Nature Reviews Immunology**, **4(5)**, 371-379.

Clark, I. A., Budd, A. C., Alleva, L. M., & Cowden, W. B. (2006). Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. **Malaria Journal**, **5(1)**, 1.

Clark, I. A. (2007). How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine & growth factor reviews**, **18(3)**, 335-343.

Clark, I. A., Alleva, L. M., Budd, A. C., & Cowden, W. B. (2008). Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. **Travel medicine and infectious disease**, **6(1)**, 67-81.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., Hirsch, J., & Smith, F. J. (1996). Serum leptin in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**, **1996(334)**, 1544.

Coll, A. P., Farooqi, I. S., & O'Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. **Cell**, **129(2)**, 251-262.

Dixit, V. D. (2008). Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of leukocyte biology**, **84(4)**, 882-892.

Dixit, V. D., Mielenz, M., Taub, D. D., & Parvizi, N. (2003). Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism. **Endocrinology**, **144(12)**, 5595-5603.

Doolan, D. L., Dobaño, C., & Baird, J. K. (2009). Acquired immunity to malaria. **Clinical microbiology reviews**, **22(1)**, 13-36.

Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., ... & Mathis, D. (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature medicine**, **15(8)**, 930-939.

Franke-Fayard, B., Janse, C. J., Cunha-Rodrigues, M., Ramesar, J., Büscher, P., Que, I., & Febbraio, M. (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **102(32)**, 11468-11473.

Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, **14(11)**, 744-757.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, **3(1)**, 23-35.

Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, **5(12)**, 953-964.

Goryakin, Y., Lobstein, T., James, W. P. T., & Suhrcke, M. (2015). The impact of economic, political and social globalization on overweight and obesity in the 56 low and middle income countries. **Social Science & Medicine**, **133**, 67-76.

Grau, G. E., Frei, K., Piguet, P. F., Fontana, A., Heremans, H., Billiau, A., ... & Lambert, P. H. (1990). Interleukin 6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia. **The Journal of experimental medicine**, **172(5)**, 1505-1508.

Grau, G. E., Piguet, P. F., Engers, H. D., Louis, J. A., Vassalli, P. I. E. R. R. E., & Lambert, P. H. (1986). L3T4+ T lymphocytes play a major role in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **137(7)**, 2348-2354.

Grau, G. E., Heremans, H., Piguet, P. F., Pointaire, P., Lambert, P. H., Billiau, A., & Vassalli, P. (1989). Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **86(14)**, 5572-5574.

Grau, G. E., Fajardo, L. F., Piguet, P. F., Allet, B., Lambert, P. H., & Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*, **237(4819)**, 1210-1212.

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, **29**, 415-445.

Hansen, D. S., Bernard, N. J., Nie, C. Q., & Schofield, L. (2007). NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **178(9)**, 5779-5788.

Hansen, D. S., Bernard, N. J., Nie, C. Q., & Schofield, L. (2007). NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. **The Journal of Immunology**, **178(9)**, 5779-5788.

Hermesen, C., van de Wiel, T. J. J. M., Mommers, E., Sauerwein, R., & Eling, W. (1997). Depletion of CD4+ or CD8+ T-cells prevents Plasmodium berghei induced cerebral malaria in end-stage disease. **Parasitology**, **114(01)**, 7-12.

Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2003). Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. **Trends in immunology**, **24(9)**, 491-499.

Ing, R., & Stevenson, M. M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. **Infection and immunity**, **77(2)**, 770-782.

Iyer, A., Fairlie, D. P., Prins, J. B., Hammock, B. D., & Brown, L. (2010). Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, **6(2)**, 71-82.

Crawley, J., Chu, C., Mtove, G., & Nosten, F. (2010). Malaria in children. *The Lancet*, 375(9724), 1468-1481.

Karlsson, E. A., Sheridan, P. A., & Beck, M. A. (2010). Diet-induced obesity impairs the T cell memory response to influenza virus infection. **The Journal of Immunology**, **184(6)**, 3127-3133.

Kennedy, A. J., Ellacott, K. L., King, V. L., & Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. **Disease Models and Mechanisms**, **3(3-4)**, 156-166.

Lam, Q. L. K., Liu, S., Cao, X., & Lu, L. (2006). Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. **European journal of immunology**, **36(12)**, 3118-3130.

Lam, Q. L., & Lu, L. (2007). Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*, 4(1), 1-13.

Li, C., Seixas, E., & Langhorne, J. (2001). Rodent malarias: the mouse as a model for understanding immune responses and pathology induced by the erythrocytic stages of the parasite. **Medical microbiology and immunology**, **189(3)**, 115-126.

Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H., & Huang, X. F. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C 57 Bl/6 J mice. **International journal of obesity**, **24(5)**, 639-646.

Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., ... & Lane, M. D. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. **The FASEB Journal**, **12(1)**, 57-65.

Long, T. T. A., Nakazawa, S., Onizuka, S., Huaman, M. C., & Kanbara, H. (2003). Influence of CD4⁺ CD25⁺ T cells on Plasmodium berghei NK65 infection in BALB/c mice. **International journal for parasitology**, **33(2)**, 175-183.

Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., & Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, **394(6696)**, 897-901.

Lorenz, C., Virginio, F., Aguiar, B. S., Suesdek, L., & Chiaravalloti-Neto, F. (2015). Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malaria journal**, **14(1)**, 1.

Lumeng, C. N., Maillard, I., & Saltiel, A. R. (2009). T-ing up inflammation in fat. **Nature medicine**, **15(8)**, 846-847.

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, **117(1)**, 175-184.

Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., & Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. **The Journal of Immunology**, **168(8)**, 4018-4024.

Mancuso, P. (2010). Obesity and lung inflammation. **Journal of applied physiology**, **108(3)**, 722-728.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, **25(12)**, 677-686.

Mattioli, B., Straface, E., Quaranta, M. G., Giordani, L., & Viora, M. (2005). Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. **The Journal of Immunology**, **174(11)**, 6820-6828.

Mejia, P., Treviño-Villarreal, J. H., Hine, C., Harputlugil, E., Lang, S., Calay, E., ... & Mitchell, J. R. (2015). Dietary restriction protects against experimental cerebral malaria via leptin modulation and T-cell mTORC1 suppression. **Nature communications**, **6**. p. 6050

Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, **415(6872)**, 673-679.

Milner, J. J., & Beck, M. A. (2012). The impact of obesity on the immune response to infection. *Proceedings of the Nutrition Society*, **71(02)**, 298-306.

Mokhtar, N., Elati, J., Chabir, R., Bour, A., Elkari, K., Schlossman, N. P. & Aguenou, H. (2001). Diet culture and obesity in northern Africa. **The Journal of nutrition**, **131(3)**, 887S-892S.

Nagajyothi, F., Weiss, L. M., Zhao, D., Koba, W., Jelicks, L. A., Cui, M. H. & Tanowitz, H. B. (2014). High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, **8(10)**, e3118.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., ... & Yoshimura, K. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature medicine**, **15(8)**, 914-920.

Nitcheu, J., Bonduelle, O., Combadiere, C., Tefit, M., Seilhean, D., Mazier, D., & Combadiere, B. (2003). Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. **The Journal of Immunology**, **170(4)**, 2221-2228.]

Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Smith, E., Shanley, C., Harton, M., Troudt, J., ... & Chan, E. D. (2008). Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. **Journal of leukocyte biology**, **83(6)**, 1502-1511.

Pi-Sunyer, X. (2009). The medical risks of obesity. **Postgraduate Medicine**,**121(6)**, 21-33.

Prentice, A. M. (2006). The emerging epidemic of obesity in developing countries. **International journal of epidemiology**, **35(1)**, 93-99.

Reuter, T. Y. (2007). Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today*: **Disease Models**, **4(1)**, 3-8.

Riley, E. M., Wahl, S., Perkins, D. J., & Schofield, L. (2006). Regulating immunity to malaria. **Parasite immunology**, **28(1-2)**, 35-49.

Robert, V., Bourgooin, C., Depoix, D., Thouvenot, C., Lombard, M. N., & Grellier, P. (2008). Malaria and obesity: obese mice are resistant to cerebral malaria. **Malaria journal**, **7(1)**, 1.

Ryg-Cornejo, V., Nie, C. Q., Bernard, N. J., Lundie, R. J., Evans, K. J., Crabb, B. S., ... & Hansen, D. S. (2013). NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during Plasmodium berghei ANKA infection. **Immunobiology**,**218(2)**, 263-271.

Schäffler, A., Schölmerich, J., & Salzberger, B. (2007). Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. **Trends in immunology**, **28(9)**, 393-399.

Schofield, L., & Grau, G. E. (2005). Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, **5(9)**, 722-735.

Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, **116(7)**, 1793-1801.

Siegmund, B., Learns-Kaul, K. C., Faggioni, R., & Fantuzzi, G. (2002). Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. **European journal of immunology**, **32(2)**, 552-560.

- Smith, A. G., Sheridan, P. A., Tseng, R. J., Sheridan, J. F., & Beck, M. A. (2009). Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8+ T cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. **Immunology**, **126(2)**, 268-279.
- De Souza, J. B., & Riley, E. M. (2002). Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, **4(3)**, 291-300.
- Stevenson, M. M., & Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, **4(3)**, 169-180.
- Su, X., Hayton, K., & Wellems, T. E. (2007). Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. **Nature Reviews Genetics**, **8(7)**, 497-506.
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H., & Gao, B. (2002). Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. **Biochemical and biophysical research communications**, **298(3)**, 297-302.
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, **92(03)**, 347-355.
- Walker, L. S., Chodos, A., Eggena, M., Doms, H., & Abbas, A. K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. **The Journal of experimental medicine**, **198(2)**, 249-258.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, **112(12)**, 1796-1808.
- Wieland, C. W., Florquin, S., Chan, E. D., Leemans, J. C., Weijer, S., Verbon, A., ... & van der Poll, T. (2005). Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. **International immunology**, **17(11)**, 1399-1408.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., & Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, **198**(2), 235-247.

Yipp, B. G., Hickey, M. J., Andonegui, G., Murray, A. G., Looareesuwan, S., Kubes, P., & Ho, M. (2007). Differential roles of CD36, ICAM-1, and P-selectin in *Plasmodium falciparum* cytoadherence in vivo. **Microcirculation**, **14**(6), 593-602.

Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., ... & Ross, R. J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. **The Journal of Immunology**, **167**(8), 4593-4599.

Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., ... & Schoner, B. E. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. **Nature** **387**, 206 - 209

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, **372**(6505), 425-432.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, **372**(6505), 425-432.

Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C., & Tian, Z. (2003). Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, **300**(2), 247-252.