

**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde**



**PMBqBM
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular**

Adenilma Duranes Sousa

**RELAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO E DAS ADIPOCINAS
COM OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL
EXPERIMENTAL**

**Salvador
2016**

Adenilma Duranes Sousa

**RELAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO E DAS ADIPOCINAS COM
OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS NA
LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM – UFBA/SBBq, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientadora: Prof^a Dra. Gyselle Chrystina Baccan

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira

SALVADOR, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S725 Sousa, Adenilma Duranes.

Relação do Tecido Adiposo e das Adipocinas com os Parâmetros Bioquímicos e Imunológicos na Leishmaniose Visceral Experimental. / Adenilma Duranes Sousa. - Salvador, 2016.

69 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan.

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Salvador; Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, São Paulo, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), 2016.

Área de concentração: Bioquímica e biologia molecular.

Linha de pesquisa: Bioquímica dos processos patológicos.

1. Leishmaniose visceral. 2. Tecido adiposo. 3. Adipocinas. 4. Parâmetros bioquímicos. I. Baccan, Gyselle Chrystina. II. Oliveira, Helena Coutinho Franco de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação Multicêntrico na área de Bioquímica e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU: 616.993.161

ADENILMA DURANES SOUSA

RELAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO E DAS ADIPOCINAS COM OS
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS NA
LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Salvador, 26 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan (Orientadora/UFBA)
(Presidente)



Prof. Dr. Petter Franco Entringer (UFRJ)



Dra. Natália Machado Tavares (FIOCRUZ)

Dedico esta dissertação à pessoa que sempre me incentivou e apoiou incondicionalmente, a pessoa responsável pela minha formação moral e ética, a pessoa que, para mim, sempre representará um exemplo de determinação, dedicação, esforço e principalmente, AMOR. Á minha mãe, Maria Duranes Sousa (in memorian).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Duranes (*in memoriam*), por sempre me apoiar e incentivar. Ao meu pai, Antonio Lima, pelo exemplo de força e determinação e por ter facilitado meu acesso ao conhecimento. A minha irmã, Adenilde Duranes, pela compreensão e apoio.

Aos meus amigos André, Cássio, Carina, Célmario, Carla, Elaine, Elismara (e sua linda família), Nádia, Sheila, Japy, Lorenzo, Neyara, Zizi, Ananda e Fabine pelo apoio, ajuda, partilha, paciência, carinho e compreensão, especialmente nos últimos meses.

À professora Dr^a Gyselle Baccan pela orientação, apoio e confiança. À professora Dr^a Helena Coutinho, pela atenção dispensada.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM e a todos os professores que fizeram parte desse caminho, em especial a coordenadora do Colegiado Local PMBqBM/UFBA, professora Dr^a Luzimar Gonzaga, pelo incentivo, compreensão e apoio.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – FIOCRUZ, em especial ao Biotério de experimentação, ao Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) e ao Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP).

Ao Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, ao Laboratório de ImunoNeuroendocrinologia (LNEI), em especial, à Professora Dr^a Rosângela Lima e a doutoranda Fabine Passos e a mestre Ananda Marinho. Ao Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LABNQ), em especial a Lúcia Fonseca e aos mestres Felipe Araújo e Rafael Short. Ao Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Celular (IMUNOBIO), em especial ao Dr. Ryan Costa. Ao Laboratório de Bioquímica, Biologia Molecular e Bioprodutos (LBBB), em especial a DR^a Daniele Takahashi e ao Mestre Valdir Gomes. Ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em especial ao Professor Dr. Vitor Fortuna e aos mestres Tiago Ribeiro e Brysa Silveira e a Central de reagentes de Bioquímica, em especial Lucimara Muzanzo e Renato Marquês.

Ao Instituto multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Texeira- UFBA, em especial ao Prof. Dr^o Robson Amaro, pela disponibilidade e colaboração.

Muito obrigada, a todos que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho direta e indiretamente

RESUMO

RELAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO E DAS ADIPOCINAS COM OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL

As leishmanioses são infecções causadas pelo tripanosomatídeo *Leishmania* sp. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair leishmaniose, em todo mundo. A Leishmaniose visceral (LV) é a forma clínica mais grave da doença. Os principais sintomas apresentados são febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia, perda de peso, e em casos não tratados, óbito. Algumas alterações bioquímicas e metabólicas são observadas na VL, principalmente aumento das concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol e LDL. O tecido adiposo e as adipocinas, podem participar da regulação da resposta imune em processos inflamatórios e em diversas infecções. O objetivo geral desse trabalho foi investigar a relação do tecido adiposo e das adipocinas com parâmetros bioquímicos e imunológicos observados na leishmaniose visceral experimental. Foram utilizados 41 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos adultos, com peso médio de 132 gramas. Os animais foram infectados com 1×10^5 promastigota de *L. infantum* na derme da orelha. A eutanásia ocorreu 4 e 8 meses após a infecção. O Tecido adiposo, o baço e o fígado foram coletados, pesados e acondicionados em solução de conservação. A carga parasitária do baço e fígado, foi avaliada por meio da técnica de diluição limitante. A expressão das citocinas no baço foi avaliada por meio da realização do qRT-PCR. Os parâmetros bioquímicos e as adipocinas foram dosadas no soro. Foi realizada a análise histopatológica e a morfometria do tecido adiposo corado por HE. As análises estatísticas foram realizadas usando o *Software GraphPad Prism 5.0*. Os animais infectados apresentaram perda de peso e esplenomegalia no oitavo mês de infecção. Os animais apresentaram carga parasitária moderada, tanto no baço, quanto no fígado. Não houve diferença na expressão das citocinas, nem na concentração sérica dos parâmetros bioquímicos e das adipocinas. A carga parasitária do baço e do fígado apresenta correlação negativa com os níveis de albumina. A carga parasitária do baço apresentou correlação negativa com os níveis de colesterol total. A Análise de correlação das adipocinas, mostrou que a adiponectina está correlacionada negativamente com as concentrações de glicose e albumina dos animais controles. E a leptina apresentou correlação negativa com o peso relativo do baço no grupo dos animais controle e correlação positiva com as concentrações séricas de triglicérides e VLDL, em ambos os grupos. Adicionalmente, a leptina apresentou correlação positiva com a carga parasitária do baço e com o peso relativo do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Já as concentrações de HDL estão correlacionadas negativamente com os níveis de leptina, em hamster infectados com *L. infantum*. As análises de correlação mostraram que leptina tem relação com o estabelecimento da LV em hamsters.

PALAVRAS CHAVES: Leishmaniose Visceral. Tecido adiposo. Adipocinas

ABSTRACT

RELATION OF ADIPOCITE TISSUE AND ADIPOKINES WITH THE PARAMETERS BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL IN EXPERIMENTAL VISCERAL LEISHMANIASIS.

Leishmaniasis are infections caused by trypanosomatid *Leishmania* sp. It is estimated that 350 million people are at risk of leishmaniasis worldwide. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical form of this disease. The main symptoms are: prolonged fever, hepatomegaly, splenomegaly, hypergammaglobulinemia, pancytopenia, weight loss and death, in untreated cases. Some biochemical and metabolic abnormalities are observed in VL mainly increased levels of triglycerides, cholesterol and LDL. Adipose tissue and adipokines can participate on regulation of the immune response and in inflammatory processes in various infections. The aim of this study, was to investigate the relation of the adipose tissue and adipokines with biochemical and immunological parameters observed in experimental visceral leishmaniasis. Were use 41 golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) adult, male, average weight of 132 grams. The animals were infected with 1×10^5 promastigotes of *L. infantum* in the ear dermis. Euthanasia was realized in the 4 and 8 months after infection. Adipose tissue and organs were collected, weighed and wrapped in conservation solution. The parasite load of spleen and liver was assessed using the limiting dilution technique. The cytokine expression in the spleen was evaluated by performing the qRT-PCR. The biochemical parameters and adipokines were measured in serum. Were analyze the histopathology and morphometry of the adipose tissues, stained by HE. Statistical analyzes were performed using *GraphPad Prism Software 5.0*. The infected animals showed weight loss and splenomegaly in 8 months of infection. The animals showed moderate parasite load in both the spleen and in the liver. There was no difference in the expression of cytokines of the spleen and biochemical parameters and adipokines in serum of the hamsters. The parasite load of the spleen and liver is negatively correlated with albumin levels. The parasite load of the spleen showed a negative correlation with levels of total cholesterol. The correlation analysis of adipokines showed that the adiponectin was negatively correlated with the concentrations of glucose and albumin, and leptin was negatively correlated with the relative weight of spleen, in the control animal group. The leptin has positive correlation with serum concentrations of triglycerides and VLDL in both groups. In hamsters infected with *L. infantum*, leptin was positively correlated with the parasite load of the spleen and with relative weight of adipose tissue (epididimal and retroperitoneal) and negatively correlated with serum HDL concentrations. Correlation analysis showed that leptin is related to the LV establishment in hamsters.

KEYWORDS: Visceral Leishmaniasis. Adipose tissue. adipokines

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA.	20
FIGURA 2. ILUSTRAÇÃO DOS ADIPÓCITOS BRANCO E MARROM.	26
FIGURA 3. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADO COM <i>L. INFANTUM</i>	40
FIGURA 4. PESO RELATIVO DO BAÇO E DO FÍGADO DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> . APÓS 4 E 8 MESES.	41
FIGURA 5. CARGA PARASITÁRIA DO BAÇO E DO FÍGADO DE HAMSTERS INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i>	41
FIGURA 6. EXPRESSÃO RELATIVA DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF-A, IL-6, IL-10 E IL-12, NO BAÇO DE HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i>	42
FIGURA 7. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE GLICOSE E ALBUMINA, DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> , APÓS 4 E 8 MESES.	43
FIGURA 8. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL E DAS LIPOPROTEÍNAS HDL, LDL E VLDL, DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> , APÓS 4 E 8 MESES.	44
FIGURA 9. PESO RELATIVO DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL E DO TECIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL, DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS, APÓS 4 E 8 MESES.	46
FIGURA 10. FOTO REPRESENTATIVA DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL E RETROPERITONEAL DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> , CORADAS COM HE, NO AUMENTO DE 40X.	47
FIGURA 11. MÉDIA DO DIÂMETRO DOS ADIPÓCITOS DO TECIDO EPIDIDIMAL E RETROPERITONEAL, DOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS.	47
FIGURA 12. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS ADIPOCINAS NOS HAMSTERS CONTROLE E INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> , NOS TEMPOS DE 4 E 8 MESES.	48

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANALISADOS.....43
- TABELA 2.** CORRELAÇÕES DA CARGA PARASITÁRIA DO BAÇO E DO FÍGADO COM DIFERENTES PARÂMETROS CLÍNICOS DA LV EXPERIMENTAL.45
- TABELA 3.** CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA ADIPONECTINA COM DIFERENTES PARÂMETROS CLÍNICOS DOS HAMSTERS CONTROLES E INFECTADOS COM *L. INFATUM*..49
- TABELA 4.** CORRELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA LEPTINA COM DIFERENTES PARÂMETROS CLÍNICOS DOS HAMSTERS CONTROLES E INFECTADOS COM *L. INFATUM*..50

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Grupo de diferenciação (inglês: Cluster of Differentiation)
Ct	Cycle threshold
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Monocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
NK	Célula Natural killer
NO	Óxido Nítrico
NOS₂	Óxido Nítrico Sintase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_r	RNA ribossomal
T_{reg}	Célula T Regulatória
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
Th	Célula T helper
Th1	Célula T helper CD4+ subtipo 1
Th2	Célula T helper CD4+ subtipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REVISÃO DE LITERATURA	17
1.0 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	17
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	18
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL	18
1.2 CARACTERÍSTICAS E CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA.....	19
1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV).....	21
1.3.1 MODELO EXPERIMENTAL DA LV	22
1.3.2 Resposta Imune na LV	23
2.0 TECIDO ADIPOSEO	25
2.1 ADIPOCINAS.....	27
2.1.1 Adiponectina	29
2.1.2 Leptina	30
OBJETIVOS.....	32
Objetivo geral	32
Objetivos específicos	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS.....	40
Avaliação da variação do peso corporal e da progressão da infecção	40
Expressão das Citocinas no baço	42
Parâmetros Bioquímicos analisados	42
Análise de correlação - Carga parasitária.....	45
Análise do tecido Adiposo	46
Concentrações séricas das adipocinas	48
Análise de Correlação – Adiponectina e Leptina	48

DISCUSSÃO	51
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS:	61

INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas pelo tripanossomatídeo do gênero *Leishmania*, um parasito intracelular obrigatório (LAISON & SHAW, 1978). Elas apresentam uma ampla distribuição mundial. Estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de ter a doença, em todo mundo. De modo geral, essas enfermidades se dividem em Leishmaniose Tegumentar Americana, que afeta a pele e as mucosas, e Leishmaniose Visceral (LV), que atinge os órgãos internos. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Sendo, está a forma mais grave, podendo ser fatal em casos não tratados (BEKAERT et al., 1989).

No Brasil, a forma de transmissão da LV é através da picada dos vetores *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* infectados pela *Leishmania (L.) infantum* (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Essa espécie de leishmania se difunde através do sistema linfático (CHAPPUIS et al., 2007). Os sinais e sintomas da doença incluem febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso. Além disso, a invasão parasitária do sistema sanguíneo e retículoendotelial causa anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, gerando o aumento do baço e do fígado, e em alguns casos dos gânglios linfáticos (CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

O controle da infecção é mediado por resposta imune do tipo Th1, sendo que a citocina IL-12 é crucial para o controle e resolução da doença (ENGWERDA et al., 1998). Durante a forma ativa da LV, as citocinas interferon-gama (IFN- γ), Interleucina (IL)-2 e IL-12 estão diminuídas e as citocinas produzidas pelas células Th2 estão elevadas, o que causa a inibição da resposta imunológica mediada por células (CALDAS et al., 2005; CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981). Os pacientes podem apresentar níveis plasmáticos elevados de Fator de necrose tumoral (TNF) (LAM et al., 1986). Essa citocina pode desempenhar um papel importante no metabolismo, pois níveis elevados dela, foram associados a anorexia e perda de gordura e músculos (PEARSON et al., 1990).

Os modelos experimentais são ferramentas importantes na investigação de patologias como a LV, uma vez que, os procedimentos para análise de órgãos e tecidos de pessoas infectadas com leishmania, são muito invasivos (NIETO et al., 2011). O

hamster uma vez infectado com as formas visceralizantes de *Leishmania* desenvolve uma doença progressiva, em que o parasita se replica amplamente no fígado, baço e medula óssea o que pode eventualmente conduzir à morte, o que é semelhante ao observado em cães e seres humanos naturalmente infectados (MELBY et al., 2001a; REQUENA et al., 2000). Algumas alterações bioquímicas e metabólicas são observadas na LV. Cães infectados com *L. infantum*, por exemplo, apresentam níveis elevados de triglicérides, colesterol e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuídos de lipoproteína de alta densidade (HDL) (NIETO et al., 1992).

Com os avanços nas pesquisas sobre obesidade, inflamação e doenças cardiovasculares, ficou bem estabelecido que o tecido adiposo atua como um órgão endócrino, pois secreta várias substâncias bioativas denominadas adipocinas (FANTUZZI, 2005; FRÜHBECK, 2008; OUCHI et al., 2011). Estas regulam vários processos metabólicos nos tecidos corporais, atuam sobre o sistema nervoso central e sobre os tecidos periféricos, regulando a adiposidade, a homeostase da glicose, a ingestão de alimentos, a pressão sanguínea, a fibrinólise, a inflamação, o metabolismo lipídico e a angiogênese (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2007; FANTUZZI, 2005).

As adipocinas também participam de processos não metabólicos podendo afetar a resposta imunológica de diversas formas (FANTUZZI, 2005). Na obesidade por exemplo, os níveis de algumas adipocinas estão alterados, causando mudança nas funções metabólicas e endócrinas do tecido adiposo, ocasionando o aumento da liberação de ácidos graxos, hormônios, e moléculas pró-inflamatórias que contribuem para as complicações associadas a obesidade (WEISBERG et al., 2003).

Vários estudos têm demonstrado a importância do tecido adiposo e das adipocinas na regulação da resposta imunológica durante infecções. A leptina, por exemplo, possui ações pró inflamatórias. A deficiência dessa adipocina pode levar ao aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, devido a desregulação da produção de citocinas ou por imunossupressão (FAGGIONI; FEINGOLD; GRUNFELD, 2001). Em modelo animal de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, foi demonstrado que a leptina tem papel no desenvolvimento da resposta imunológica inicial a tuberculose, (WIELAND et al., 2005). A adipocina adiponectina é um dos poucos fatores produzidos pelo tecido adiposo que tem ação anti-inflamatória. Ela exerce ações relevantes sobre a imunidade inata e adaptativa (GÓMEZ et al., 2009; TILG; MOSCHEN, 2006). Em

pacientes com a tuberculose ativa, os níveis de leptina estão mais baixos que nos pacientes assintomáticos. Além disso, níveis aumentados de adiponectina e diminuídos de leptina, estão associados com a presença de grandes infiltrados inflamatórios, independente do índice de massa corpórea (KEICHO et al., 2012).

O papel do tecido adiposo, tem sido estudado, na patogênese da Doença de Chagas. Foi demonstrado que os adipócitos podem atuar como reservatório de parasitas, contribuindo com a cronicidade da infecção (COMBS et al., 2005). Dados recentes, mostraram que o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), infecta os adipócitos humanos em cultura, com alta eficiência. A infecção gera alterações nos níveis de expressão de diferentes proteínas produzidas nos adipócitos, dentre elas a diminuição dos níveis de adiponectina (FERREIRA et al., 2011; NAGAJYOTHI et al., 2011, 2012). Devido à proximidade filogenética entre *Leishmania* spp. e o *T. cruzi*, é possível que o tecido adiposo também tenha uma papel na leishmaniose.

Foi levantada a hipótese de que as concentrações plasmáticas de leptina poderiam estar diminuídas em pacientes com LV, devido à má nutrição, e que esta diminuição contribuiria para o aumento das respostas Th2, promovendo a sobrevivência do parasita (DAYAKAR et al., 2011). Dados recentes mostraram que a leptina é capaz de ativar os macrófagos humanos, infectados com *L. donovani*, e estimular a capacidade fagocítica, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, o que contribuiu para a eliminação do parasita (DAYAKAR et al., 2016).

Até o presente momento, não foram publicados trabalhos que investiguem o papel do tecido adiposo e das adipocinas na LV. Os resultados preliminares obtidos com o desenvolvimento desse trabalho, não demonstraram a participação do tecido adiposo, na patogênese da LV. No entanto, a adipocina leptina apresentou correlação com alguns parâmetros clínicos.

REVISÃO DE LITERATURA

ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As Leishmanioses são infecções, causada pelo tripanossomatídeo do gênero *Leishmania*. Este é um parasito intracelular obrigatório, digenético que desenvolve seu ciclo biológico em dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado, que é o vetor da doença (LAISON & SHAW, 1978). Elas podem ser transmitidas por 30 espécies diferentes do inseto vetor do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo. Cerca de 20 espécies de *leishmania* podem causar a doença (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; HERWALDT, 1999).

As leishmanioses afetam principalmente a população pobre de países em desenvolvimento, sua prevalência está associada com o status imunológico do hospedeiro, desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e falta de recursos (DESJEUX, 2001). Além disso, as diferentes espécies de *Leishmania*, apesar de apresentarem similaridades genéticas e morfológicas, podem promover alterações patológicas diferentes. (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; CUNNINGHAM, 2002). Contudo, três características são comuns na infecção por qualquer espécie de *leishmania*: a infecção tecidual persistente, a replicação do parasita nos macrófagos teciduais residente, e a resposta imunoinflamatória. Esta regula as características fisiopatológicas apresentadas pelo hospedeiro vertebrado (MURRAY et al., 2005).

As Leishmaniose são um complexo de doenças, que se dividem em Leishmaniose Tegumentar Americana, que afeta a pele e as mucosas, e Leishmaniose Visceral (LV), que atinge os órgãos internos (BEKAERT et al., 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A LV é a forma clínica mais grave da doença, o período de incubação varia de 10 dias a 1 ano (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No velho mundo a LV é causada pelo complexo *L. donovani-L. infantum*. No Novo Mundo, a LV é endêmica, sendo causada pela *L. infantum* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A *L. infantum* e a *L. chagasi* podem ser consideradas sinônimos, ou seja, *L. infantum* (= *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006).

A LV afeta principalmente as crianças, e pode levar a morte, em casos em que o tratamento não seja instituído (CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, muito comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Estima-se que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair leishmaniose, em todo mundo. As leishmanioses são prevalentes em 5 continentes e ocorrem em 98 países. Mais de 90% dos casos de LV acontecem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão. A cada ano, ocorrem aproximadamente 2 milhões de novos casos, dos quais, 500 mil são de LV. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A leishmaniose visceral é autóctone em 12 países das Américas, sendo registrado no período de 2001 a 2013 o total de 45.490 casos com média anual de 3.499 casos (OPAS, 2015).

Em 2013, um total de 3.389 casos de LV, foram registrados em oito países, distribuídos em 798 municípios. Os países com o maior número de casos foram o Brasil com 96% (3.253) dos casos, seguidos do Paraguai 3,2% (107) e Colômbia 0,4% (13). O Brasil e Paraguai apresentaram as maiores taxas de incidência de LV, com 4,35 e 3,85 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (OPAS, 2015).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 habitantes (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Inicialmente a LV tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por Calazar. Os dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

No estado da Bahia, a LV encontra-se em rápida expansão urbana, acometendo indivíduos de diferentes grupos etários, estando presente em 180 (43,26%) municípios. O potencial de urbanização é demonstrado pela ocorrência de casos (131) nos centros urbanos de importantes cidades do Estado, entre os quais: Feira de Santana, Serrinha, Jequié, Juazeiro, Irecê, Camaçari e Salvador, correspondendo a 23,73% dos casos (SESAB, 2015). Até março de 2015, obteve-se um coeficiente de incidência de 33,3% (0,1/10.000 habitantes), e redução média de 50% entre os anos de 2014 e 2015, no mesmo período (janeiro a março) (SESAB, 2015).

1.2 CARACTERÍSTICAS E CICLO BIOLÓGICO DA LEISHMANIA

A *Leishmania* é um parasita flagelado, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os organismos que fazem parte desta ordem, caracterizam-se por apresentar uma mitocôndria única, denominada cinetoplasto, rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Este é formado por dois componentes o minicírculos e maxicírculos (GRIMALDI JUNIOR G., 1993; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; SIMPSON et al., 1987).

A leishmania apresenta duas formas, em seu ciclo de vida (Figura 01). A forma amastigota é circular e intracelular obrigatória. Ela vive dentro de vacúolos lisossomais presentes nas células fagocitárias do hospedeiro vertebrado infectado, ou seja, os monócitos e os macrófagos, que são ingeridos pelo flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo (ALEXANDER, 1999; CHANG, 1990; CUNNINGHAM, 2002). No intestino médio do vetor, a amastigota se diferencia na forma promastigota, que é a forma extracelular que possui flagelo. A promastigota pró-cíclica, se liga as paredes do

intestino do inseto e se divide rapidamente. Ela se transforma na promastigota metacíclica, que não tem a capacidade de se ligar as paredes do intestino do vetor, e migra para a probóscide do hospedeiro invertebrado (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; CUNNINGHAM, 2002; GRIMALDI JUNIOR G., 1993). Quando o flebotomo infectado pica o hospedeiro mamífero, ele inocula as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva (ANDRADE et al., 2007). Após isso, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos, e se instalam no interior do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (RITTIG; BOGDAN, 2000). A replicação contínua de amastigotas, leva ao rompimento da célula hospedeira. O fagócito vizinho, engloba os corpos apoptóticos e as bolhas de membrana que contêm parasitas viáveis, o que permite a propagação da infecção (REAL et al., 2014).

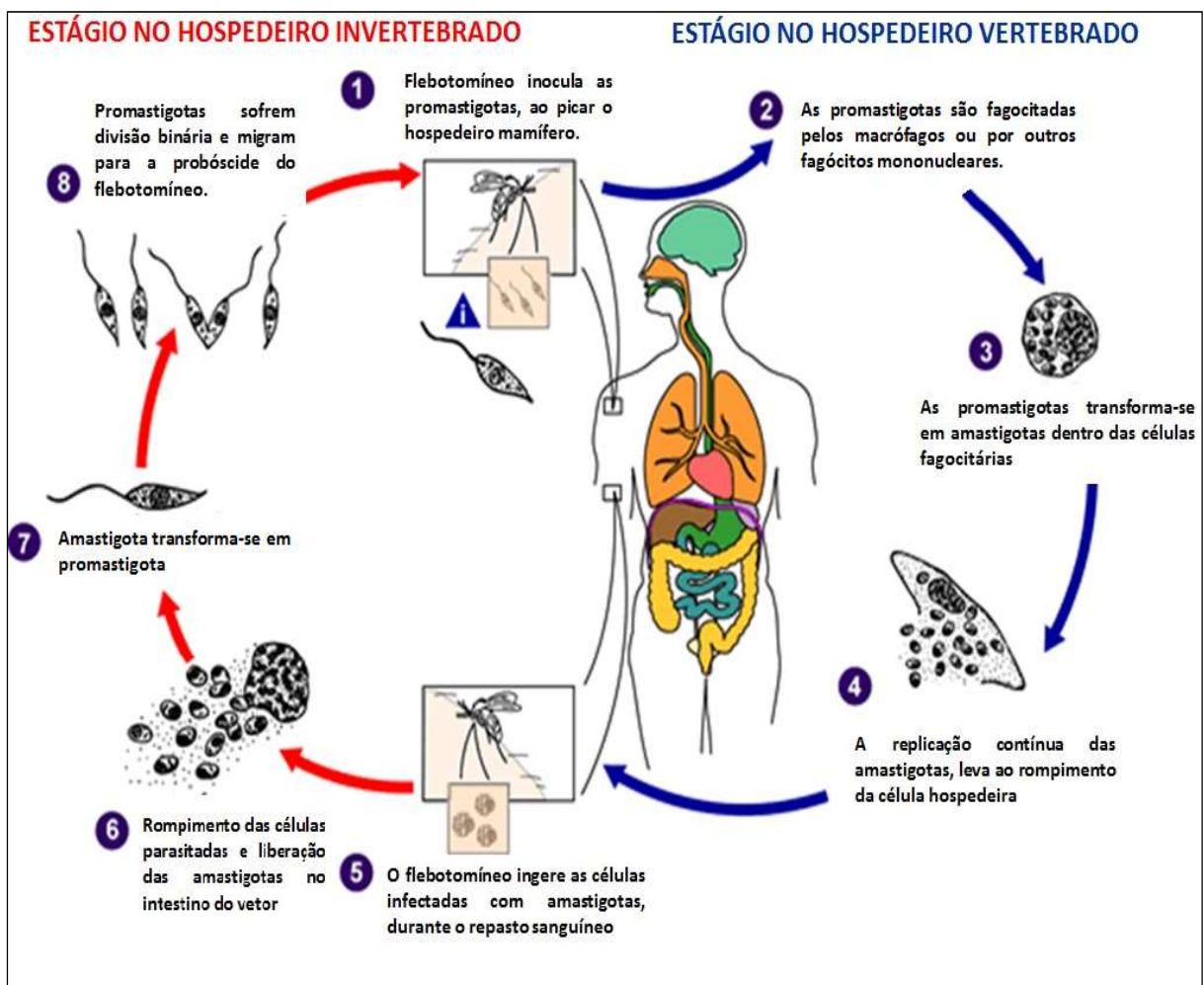


Figura 1. Ciclo biológico da leishmania. *FONTE:* CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2013 (Figura adaptada).

1.3 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

No Brasil, a forma de transmissão da LV é através da picada dos vetores *L. longipalpis* ou *L. cruzi* infectados pela *Leishmania (L.) infantum* (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Essa espécie de leishmania tem tropismo através dos sistemas linfático e vascular, e infecta os macrófagos e monócitos no sistema retículoendotelial, o que resulta em infiltração da medula óssea, do baço, do fígado, da mucosa do intestino delgado, dos nódulos linfáticos e de outros tecidos linfoides (CHAPPUIS et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A LV abrange um amplo espectro de gravidade e manifestações clínicas. O aparecimento pode ser crônico, subagudo, ou agudo. O período de incubação geralmente, que geralmente dura de 2 a 6 meses. Os sinais e sintomas da infecção persistente sistêmica incluem febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso. Além disso, a invasão parasitária do sistema sanguíneo e retículoendotelial causam anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, levam ao aumento do baço e do fígado, e em alguns casos dos gânglios linfáticos (CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON, 1981; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A febre geralmente está associada com calafrios e pode ser intermitente. A fadiga e a fraqueza são agravados por anemia, além disso, trombocitopenia e neutropenia também são frequentes e refletem, tanto sequestro esplênico, quanto supressão da função da medula óssea. Em estágios avançados, a trombocitopenia juntamente com a depleção de protrombina pode levar a hemorragia grave. Com o avanço da doença, a esplenomegalia pode causar distensão e dores abdominais, que podem ser acentuadas por hepatomegalia concomitante (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CHAPPUIS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2016).

O diagnóstico e o tratamento precoce são essenciais para pacientes individuais e para a comunidade (CHAPPUIS et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O diagnóstico parasitológico consiste na observação da forma amastigota do parasita nas células do hospedeiro. A punção aspirativa esplênica é o método que oferece maior sensibilidade (90-95%) para demonstração, seguida pelo aspirado de medula óssea, biópsia hepática e a aspiração de linfonodos. Por ser o procedimento mais seguro, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; GRIMALDI JUNIOR G., 1993). A detecção de parasitas no sangue

ou em tecidos, por meio de culturas ou por técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são mais sensíveis que o exame microscópico (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CHAPPUIS et al., 2007).

A infecção desencadeia uma resposta humoral, levando a produção de anticorpos, que têm um papel insignificante na defesa do hospedeiro, mas são úteis no diagnóstico laboratorial. Este, pode ser realizado através de exames sorológicos como, a imunofluorescência indireta (IFI) e *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), ou através da Intradermorreação de Montenegro reativa. Os títulos de anticorpos em geral são baixos e podem permanecer positivos por um longo período. Pacientes que apresentam cura clínica podem apresentar reatividade nos exames sorológicos e na intradermorreação de Montenegro (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; GRIMALDI JUNIOR G., 1993).

Apenas uma pequena parcela de indivíduos infectados, desenvolvem sinais e sintomas da doença. Os pacientes provenientes de áreas endêmicas, onde há evidência epidemiológica e imunológica da infecção, mas não apresentam sintomas da doença, são classificados como assintomáticos. É importante ressaltar, que para o diagnóstico clínico da LV, é necessário avaliar os sinais e sintomas clínicos em conjunto com os resultados do ensaios à base de anticorpos (BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CHAPPUIS et al., 2007).

1.3.1 MODELO EXPERIMENTAL DA LV

Os modelos experimentais são ferramentas importantes na investigação de patologias como a LV, uma vez que, os procedimentos para análise de órgãos e tecidos de pessoas infectadas com leishmania, são muito invasivos (NIETO et al., 2011). A quantidade e a natureza do inóculo do parasita são fatores que contribuem para as diferenças apresentadas entre a infecção nos seres humanos e nos modelos animais (HANDMAN, 2001; REQUENA et al., 2000).

Em infecções naturais, o vetor introduz na pele, um número muito pequeno de parasita (100 a 1000 promastigotas metacíclicos), em conjunto com a saliva. Enquanto que, em infecções laboratoriais são injetadas de milhares a milhões de promastigotas,

derivadas de cultura, ou amastigotas, derivadas de tecidos. Além disso, a progressão da LV experimental depende ainda da via de infecção e da espécie da *Leishmania* utilizada (HANDMAN, 2001; REQUENA et al., 2000).

Camundongos quando infectados com espécie viceralizante de *Leishmania*, inicialmente apresentam uma elevação da carga parasitária, mas com o decorrer da infecção, são capazes de desenvolver uma resposta imunológica contra a *leishmania* e controlar a infecção. Este é um bom modelo para observar a replicação do parasita, o controle imunológico e a infecção subclínica. Porém, não há um modelo murino que simule a progressão da doença como observada na LV humana ativa (MELBY et al., 2001a; REQUENA et al., 2000).

Os cães apresentam sintomas muito semelhantes aos humanos com LV. Muitos dos animais infectados são susceptíveis e desenvolvem a doença ativa. Enquanto que, uma pequena parcela não desenvolve a doença ou cura espontaneamente. Devido a esses fatores, estes animais são considerados bons modelos para LV (NIETO et al., 1999). No entanto, a dificuldade de gerir estes animais, faz com que este modelo seja pouco utilizado (REQUENA et al., 2000).

O hamster desenvolve sinais clínicos e sintomas graves da LV, semelhantes aos observados em cães e seres humanos naturalmente infectados (MELBY et al., 2001a; REQUENA et al., 2000). O modelo experimental de Hamsters Sirius (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. infantum* ou *L. donovani*, são considerados bons modelos para estudo das manifestações clínicas da LV, que podem variar de infecções assintomáticas e oligossintomáticas até uma doença visceral progressiva e fatal (DORIA et al., 2000; MELBY et al., 2001). A principal limitação desse modelo é a falta de reagentes imunológicos disponíveis. Este obstáculo vem sendo superado pela utilização de novas abordagens moleculares para a avaliação imunológica destes animais (Melby et al., 1998; Melby et al., 2001).

1.3.2 RESPOSTA IMUNE NA LV

A Leishmaniose visceral humana está associada com um padrão misto de resposta, com a participação tanto de células Th1, quanto de células Th2. A cura da doença,

após o tratamento, é acompanhada pelo aumento dos níveis de IFN- γ e IL-12, e diminuição dos níveis de IL-10 e o fator de transformação do crescimento – beta (TGF- β) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Isso acontece porque a resistência a infecção por *Leishmania* depende do desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, caracterizada pela produção inicial de IL-12, por células apresentadoras de antígenos (APCs), e pela liberação de IFN- γ , pelas células Th1 (MULLER, 1989). O IFN- γ , induz a ativação de mecanismos microbicidas do macrófago, como a produção de óxido nítrico (NO) e de ROS, que possuem importante ação leishmanicida (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; MURRAY; NATHAN, 1999). A IL-10 desempenha um papel importante na supressão da respostas imune pró-inflamatória. Ela é um potente inibidor da produção e das citocinas IL-12 e IFN- γ , inibindo assim a ativação dos macrófagos (AYE, 1996; STANLEY; ENGWERDA, 2007; VASCONCELOS et al., 1993)

A leishmaniose visceral experimental leva ao desenvolvimento de uma imunidade específica no tecido hepático e no tecido esplênico. No fígado há a formação de granulomas, na tentativa de conter a infecção (AYE, 1996). Enquanto que no baço, a resposta imune mediada por células, não consegue eliminar o parasita, levando ao estabelecimento de uma infecção crônica e alterações imunopatológicas, como alterações na arquitetura desse órgão (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Em camundongos, a formação do granuloma hepático é dependente da produção de citocinas, recrutamento de monócitos, neutrófilos, células T CD4+ e CD8+, produção de citocinas inflamatórias e ativação das células de kupffer infectadas. As citocinas desempenham um papel crítico no desenvolvimento do granuloma. As pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- γ e TNF, são importantes para a formação eficiente do granuloma, uma vez que, elas estimulam a produção de citocinas e a geração de moléculas leishmanicidas pelas células infectadas (AYE, 1996; RODRIGUES et al., 2016; STANLEY; ENGWERDA, 2007). A IL-12 atua de forma efetiva na resposta do hospedeiro contra a leishmania, através de um mecanismo dependente de IFN- γ . Este ativa os macrófagos, o que é essencial para a eliminação dos parasitas (AYE, 1996). O TNF também atua na ativação dos macrófagos e na formação e desenvolvimento do granuloma (KAYE et al., 2004).

A infecção no baço ocorre de forma persistente, onde o número de parasitas aumenta lentamente e persiste durante a vida do animal (ENGWERDA et al., 1998). A Resposta imune protetora no baço é iniciada pelas células que foram expostas aos produtos antigênicos da leishmania. Elas secretam IL-12, que leva a diferenciação das células Th1 que vão produzir IFN- γ e TNF. Em paralelo, as células T CD8 naives (virgens), na presença de IL-12 e IFN, diferenciam-se em células efectoras, que potencializam a resposta protetora, devido a produção de IFN- γ e TNF (RODRIGUES et al., 2016). Níveis elevados de TNF no baço estão associados com a indução de IL -10, o que contribui de forma significativa para o estabelecimento da infecção. Além disso, o excesso de TNF no ambiente esplênico é responsável por danos na arquitetura tecidual e disfunção imunológica associada ao estado inflamatório crônico do baço (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Mas esses dados foram obtidos com modelos experimental de camundongo, pouco se sabe sobre a resposta imune em modelo de hamsters.

2.0 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo frouxo, composto por vários tipos celulares, incluindo os adipócitos (correspondem 35% a 70% do tecido), pré-adipócitos, células estaminais, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico (FRÜHBECK, 2008; HUH et al., 2014). Essas células são cercadas por redes de capilares e inervação (GUENGERICH et al., 2001; MURANO et al., 2009).

Existem dois tipos principais de adipócitos que são fáceis de distinguir pela morfologia: os adipócitos marrons e os adipócitos brancos. Os adipócitos marrons são células poligonais, com um núcleo arredondado e várias gotículas lipídicas citoplasmáticas, apresentam inúmeras mitocôndrias e atuam no controle da termogênese (MURANO et al., 2009; MURANO; ZINGARETTI; CINTI, 2005). Os adipócitos brancos são células esféricas, com aproximadamente 90% do seu volume compreendendo uma única gota citoplasmática de lipídio, com núcleo periférico (Figura 02). Eles armazenam energia, sob a forma de triglicérides, durante períodos de abundância nutricional, e liberam sob a forma de ácidos graxos, em períodos de privação (CANNON; NEDERGAARD, 2004; RICHARD; STEPHENS, 2014; TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994). O tecido

adiposo branco é caracterizado pela sua capacidade de adaptação e expansão em resposta à energia excedente, por meio do processo de hipertrofia dos adipócitos e/ou recrutamento e proliferação de células precursoras (PELLEGRINELLI; CAROBIO; VIDAL-PUIG, 2016). A diferenciação dos adipócitos é um processo complexo, que envolve mudanças drásticas na morfologia celular e na expressão gênica (TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994).



Figura 2. Ilustração dos adipócitos branco e marrom. *FONTE: RICHARD & STEPHENS, 2014 (figura adaptada).*

A presença de dois tecidos distintos, que particionam a energia contida em lipídios entre a termogênese e as outras funções metabólicas, faz com que o tecido adiposo possa ser classificado como órgão, pois este é definido como uma série de tecidos (no mínimo dois tecidos distintos) que realizam conjuntamente uma ou mais funções interligadas (CINTI, 2001). O órgão adiposo é composto de vários depósitos localizados em dois compartimentos do corpo: depósitos subcutâneos e depósitos viscerais. Além disso, os adipócitos estão presentes em todo o corpo, associados com múltiplos órgãos, incluindo o coração e os rins. Eles também podem ser encontrados na medula óssea, pulmões e na camada adventícia de vasos sanguíneos principais (OUCHI et al., 2011).

As células imunológicas presentes no tecido adiposo podem ser divididas em células imunes da resposta inata, que são os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos; e as células imunes da resposta adaptativa, que incluem vários subtipos de células T e células B (HUH et al., 2014). Os fatores secretados pelo macrófagos,

em cultura de células, interferem no metabolismo dos ácidos graxos livres e na absorção de glicose pelo adipócito (PERMANA; MENGE; REAVEN, 2006). Na obesidade, o número de macrófagos presente no tecido adiposo branco, está diretamente relacionado com a adiposidade e com o tamanho dos adipócitos. Tanto em humanos, quanto em ratos, os pré-adipócitos podem proliferar e se diferenciar em adipócitos ou em macrófagos (CHARRIÈRE et al., 2003; FANTUZZI, 2005). Demonstrando que a interação entre os diferentes tipos celulares é importante para a realização das funções fisiológicas do tecido adiposo e que existe uma interação entre os adipócitos e as células do sistema imunológico.

O tecido adiposo pode reagir a infecções por ativação de várias cascatas inflamatórias, através da transdução de sinal, da secreção de citocinas como TNF α , IL-1, IL-6 e IFN (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993), e da produção e secreção de várias substâncias bioativas, dentre elas uma variedade de hormônios peptídicos e protéicos, denominados adipocinas (FANTUZZI, 2005; FRÜHBECK, 2008; OUCHI et al., 2011; TILG; MOSCHEN, 2006) Assim, a expressão desregulada desses fatores, pelo tecido adiposo, pode levar a alterações na respostas imunes e metabólicas (OUCHI et al., 2011).

2.1 ADIPOCINAS

Por um longo período de tempo, acreditou-se que as funções do tecido adiposo branco, eram limitadas ao armazenamento de energia. No entanto, com os avanços nas pesquisas sobre obesidade, inflamação e doenças cardiovasculares, ficou bem estabelecido que o tecido adiposo atua como um órgão endócrino. Pois ele pode influenciar e estabelecer comunicação com outros órgãos, incluindo cérebro, coração, vasculatura, fígado e músculos, através de secreção das adipocinas. (FANTUZZI, 2005; FRÜHBECK, 2008; OUCHI et al., 2011; TILG; MOSCHEN, 2006). Há uma grande diversidade de adipocinas, tanto no que se refere a estrutura proteica, quanto em relação a função (TRAYHURN; WOOD, 2004).

O termo adipocina é utilizado para descrever substâncias que são produzidas e secretadas pelo tecido adiposo. Mas nem todas são derivadas exclusivamente deste órgão (TILG; MOSCHEN, 2006; TRAYHURN; WOOD, 2004). A secreção das

adipocinas é dependente da composição celular do tecido adiposo. Podendo ser alterada, por mudanças no número, fenótipos e localização das células do sistema imune, vascular e estrutural. A expressão das adipocinas também pode variar dependendo da localização do depósito de tecido adiposo(OUCHI et al., 2011).

As adipocinas regulam vários processos metabólicos e também contribuem em processos não-metabólicos numa variedade de tecidos. Elas atuam sobre o sistema nervoso central e sobre os tecidos periféricos, regulando a adiposidade, a homeostase da glicose, a ingestão de alimentos, a pressão sanguínea, a fibrinólise, a inflamação, o metabolismo lipídico e a angiogênese (ALVAREZ-LLAMAS et al., 2007; FANTUZZI, 2005). Na obesidade por exemplo, os níveis de algumas adipocinas estão alterados, levando a mudança nas funções metabólicas e endócrinas do tecido adiposo, ocasionando o aumento da liberação de ácidos graxos, hormônios e moléculas pró-inflamatórias, que contribuem para as complicações associadas a obesidade (WEISBERG et al., 2003).

A adiponectina e a leptina são as adipocinas mais abundantes, produzidas pelo tecido adiposo. Mas vários outros produtos tem sido caracterizados, dentre eles, citocinas clássicas como TNF, IL-6 e IL-1, e fatores de crescimento como o TGF- β , entre outros (FANTUZZI, 2005; TILG; MOSCHEN, 2006; TRAYHURN; WOOD, 2004). Estes produtos apresentam funções conhecidas no sistema imune, e apesar de serem produzidos pelos adipócitos, eles não são classificados como adipocinas. No entanto, eles possuem um papel importante na interface entre os sistemas imunológico e o metabolismo (TILG; MOSCHEN, 2006).

A TNF e IL-6, por exemplo, são citocinas com ação pró-inflamatória, que tem sua expressão aumentada no tecido adiposo, em modelos animais de obesidade e diabetes (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; MOHAMED-ALI et al., 1997). Os níveis plasmáticos delas, também estão elevadas em seres humanos obesos (KERN et al., 1995a). Embora, tanto a IL-6 quanto TNF sejam expressas pelo tecido adiposo, existem diferenças na sua liberação sistêmica in vivo. A TNF não é liberada pelos depósitos de tecido adiposo subcutâneo, enquanto que a IL-6 é liberada (KERN et al., 1995b). Além disso, a análise da expressão dos macrófagos e de outras populações celulares, isoladas do tecido adiposo, demonstraram que os

macrófagos são responsáveis por quase toda expressão de TNF, e de quantidades significativas de IL-6, em camundongos (WEISBERG et al., 2003).

2.1.1 ADIPONECTINA

A adiponectina é uma proteína de 247 aminoácidos, produzida quase que exclusivamente pelo tecido adiposo branco (TILG; MOSCHEN, 2006). O RNA mensageiro (RNAm) da adiponectina está presente no tecido adiposo e nas células sanguíneas (MASAKI et al., 2004). A concentração sérica de adiponectina, circulante no organismo, é relativamente alta (micrograma/mililitro) (MANJU C, PILLIPS SA, THEODORE C, 2003). Os receptores de adiponectina são abundantes no fígado e no músculo (MASAKI et al., 2004). A principal função da adiponectina é modular o metabolismo da glicose e dos lipídios, em tecidos sensíveis a insulina, tanto em humano quanto em modelos animais. Uma vez que, ela atua aumentando a sensibilidade dos tecidos a insulina (FANTUZZI, 2005).

Os níveis plasmáticos de adiponectina, estão reduzidos em indivíduos obesos. Eles foram associados com o desenvolvimento da resistência à insulina em modelos animais de obesidade (MANJU C, PILLIPS SA, THEODORE C, 2003). Essa adipocina é expressa a níveis mais elevados pelos adipócitos funcionais, que são encontrados em indivíduos magros, mas a sua expressão é regulada negativamente nos adipócitos disfuncionais que estão associados com a obesidade (OUCHI et al., 2011). A perda de peso é um potente indutor da síntese dessa adipocina (TILG; MOSCHEN, 2006).

A adiponectina é um dos poucos fatores produzidos pelo tecido adiposo que tem ação anti-inflamatória. Ela exerce ações relevantes sobre a imunidade inata e adaptativa. Ela inibe a capacidade fagocítica dos macrófagos e a produção de TNF e de IL-6. Além disso, reduz a linfopoiese de células B, diminui a resposta das células T e induz a produção de IL-10, por monócitos, macrófagos e células dendríticas humanas (GÓMEZ et al., 2009; TILG; MOSCHEN, 2006). Por outro lado, a produção de adiponectina por adipócitos é inibida por fatores pró-inflamatórios, tais como TNF e IL-6, que se encontram elevados em indivíduos obesos (FANTUZZI, 2005).

A habilidade de inibir a produção de TNF, sugere que a adiponectina tem uma papel importante contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias graves. No entanto, na defesa contra patógenos intracelulares, níveis elevados de adiponectina, aumentariam a susceptibilidade do hospedeiro a infecção (YOKOTA et al., 2000).

2.1.2 LEPTINA

A leptina é uma proteína, codificada pelo gene *ob* (ZHANG et al., 1994), estruturalmente similar à família das citocinas helicoidais de cadeia longa (ZHANG et al., 1997). A maior parte da leptina circulante é produzida e secretada pelos adipócitos, mas a mucosa gástrica, músculo esquelético, placenta e epitélio mamário também podem contribuir (BADO et al., 1998; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; MASUZAKI et al., 1997). A atividade biológica é mediada pela interação da leptina com receptores de membrana específicos, que apresentam sequencias homologas com os receptores de citocinas (TARTAGLIA et al., 1995). A leptina e seus receptores estão presente em uma variedade de tecidos e órgãos (DESRUISSEAU et al., 2007).

A principal função da leptina é regular o balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Assim, os níveis circulantes de leptina estão diretamente relacionados com a massa de tecido adiposo. A perda de gordura corporal, leva a diminuição dos níveis de leptina, que por sua vez, faz com o que o indivíduo aumente o consumo de alimentos, excedendo o gasto energético, o que leva a um estado de equilíbrio energético positivo. Por outro lado, um aumento da adiposidade, eleva os níveis de leptina, que irá promover um estado de equilíbrio energético negativo, com o gasto de energia superior a ingestão de alimentos. Isso é possível por meio da atuação da leptina no hipotálamo, este libera diferentes neuropeptídios, em resposta aos níveis de leptina. Uma série de outras respostas metabólicas e endócrinas também ocorrem (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

A leptina atua na resposta imunológica induzindo uma resposta pró-inflamatória. Na resposta imune inata, ela atua induzindo o aumento da produção das citocinas TNF, IL-6 e IL-12, pelos macrófagos e monócitos; aumenta a fagocitose de macrófagos, e induz a ativação, proliferação e migração de monócitos; estimula a quimiotaxia dos neutrófilos e a produção de espécies reativas de oxigênio, por essas células; regula a

diferenciação, proliferação, ativação e citotoxicidade das células *natural killer* (NK) (FANTUZZI, 2005; LA CAVA et al., 2004; TILG; MOSCHEN, 2006).

Na resposta imune adaptativa, a leptina estimula a linfopoiese, protege os linfócitos T da apoptose; modula a proliferação das células T, induzindo a proliferação de células T virgem e inibindo a produção de células T de memória; estimula a produção da citocinas IFN γ e IL-2 e suprime a produção da citocina IL-4 (FANTUZZI, 2005; LA CAVA et al., 2004; TILG; MOSCHEN, 2006). Assim, a deficiência de leptina leva a o aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas, devido a desregulação da produção de citocinas ou por imunossupressão (FAGGIONI; FEINGOLD; GRUNFELD, 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a relação do tecido adiposo e das adipocinas com parâmetros bioquímicos e imunológicos observados na leishmaniose visceral experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão das citocinas no baço (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10)
- Determinar as concentrações séricas de glicose, albumina, triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL.
- Determinar as concentrações séricas das adipocinas, leptina e adiponectina, dos animais.
- Correlacionar a carga parasitária com os parâmetros bioquímicos, perfil de citocinas e com os níveis séricos das adipocinas
- Verificar o tamanho dos adipócitos presentes no tecido adiposo epididimal e retroperitoneal.
- Correlacionar os níveis séricos das adipocinas com parâmetros clínicos e bioquímicos dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo amostral e aspectos éticos

Foram utilizados 41 Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com 3 meses de idade e com peso médio de 132 gramas. Os animais foram divididos em dois grupos: controle (n=20) e infectado (n=21). Todos os animais foram mantidos no Biotério Experimental do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPQGM) da FIOCRUZ, sob as mesmas condições. Eles foram manipulados e eutanasiados de acordo com os princípios de conduta e o manejo ético de animais utilizados para fins científicos, da Fundação Oswaldo Cruz para Experimentação Animal (Protocolo de aprovação CEUA: 034/2012).

Cultura de *Leishmania Infantum* e infecção experimental

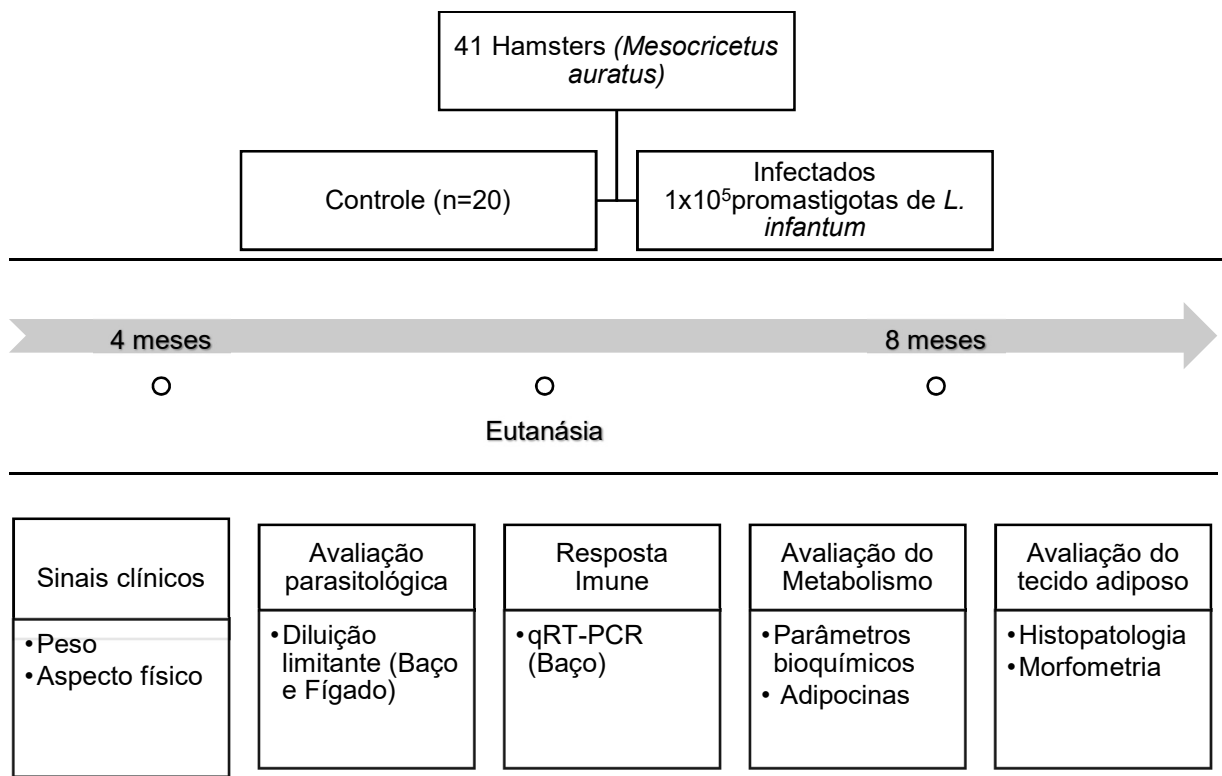
As formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR00/Ba262) foram obtidas por meio do cultivo em meio Schneider's (Schneider insect medium) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml). Mantidas a 23°C, em estufa BOD, até a fase estacionária. Os parasitas foram obtidos na fase estacionária sendo lavados três vezes com salina a 3000 rpm por 10 minutos e foram ajustados para uma concentração de 5×10^7 - 10^8 /ml.

Delineamento e protocolo experimental

Os animais foram infectados intradermicamente na orelha com 1×10^5 promastigotas de *L. infantum* ressuspensas em salina (20 µl). Os animais foram avaliados semanalmente, buscando identificar a presença de sinais clínicos da doença, como perda de peso e pelo, aparecimento de lesões na pele. Para a pesagem, foi utilizada uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000, com capacidade de 4kg e sensibilidade de 0,001g. A eutanásia foi realizada por decapitação, em dois momentos: 4 meses e 8 meses após a infecção. O sangue total foi coletado, e o baço e o fígado foram removidos assepticamente e pesados. Foram utilizados 2 mg desses órgãos, para a realização da carga parasitária. O tecido adiposo (retroperitoneal e epidídimo) foi coletado, pesado, e armazenado em formol a 10%, para análise

histopatológica. E ambos, baço e tecido adiposo foram armazenados em solução de preservação de ácidos nucleicos, para avaliação da expressão das citocinas.

No Fluxograma 01 encontra-se o delineamento experimental deste estudo. Os animais foram divididos em dois grandes grupos experimentais: um grupo infectado com promastigotas de *L. infantum* e um grupo controle não infectado. Os hamsters foram necropsiados e avaliados no 4 e 8 meses após a infecção.



Fluxograma 1: Delineamento experimental em modelo de infecção de *L. infantum* em hamster, utilizando a via intradérmica.

Avaliação da Carga Parasitária

A avaliação da carga parasitária do baço e do fígado foi analisada pela técnica de diluição limitante descrita previamente (HONDOWICZ & SCOTT, 2002). Onde foi retirada uma amostra de baço e uma de fígado (2mg). Elas foram maceradas individualmente, em peneira metálica ultrafina descartável, com 1 ml de meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA) suplementado com soro bovino fetal a 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Adicionou-se 4 ml de solução salina. O material foi transferido para tubo falcon (15

mL), onde foi adicionado solução salina até completar o volume final de de 10 mL. Foi retirada uma alíquota de 20µl dessa solução, para a diluição seriada. Que foi realizada em uma placa de 96 poços, contendo 180µl de meio Schneider suplementado, em cada poço. A diluição foi realizada na proporção de 1:10. As placas foram armazenadas na estufa BOD a 23° C por 7 dias. No sétimo dia, após a realização da diluição, as placas foram observadas, em microscópio invertido, para verificação da presença das formas promastigotas de *L. infantum*. A quantificação da carga parasitária foi estimada com base no valor da diluição mais elevada, que foi positiva para o crescimento dos parasitas. O valor obtido foi multiplicado pelo peso do órgão (mg), e calculado os valores do log na base 10.

Extração de RNA e preparo de cDNA para detecção da expressão de citocinas no baço

O RNA total do baço, foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O tecido foi macerado, em 1 ml de trizol, com o homogeneizador de tecidos (OMNI 125). O RNA foi isolado e precipitado na presença de clorofórmio e isopropanol. Após lavagem com etanol a 70% e a 100%, o RNA foi dissolvido em água livre de DNase e RNase. A quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total extraído foi realizada por meio do *Thermo Scientific NanoDrop 2000c*. Foi utilizado 1µL de RNA total e o grau de pureza em relação à presença de proteínas, foi avaliado utilizando a relação dos valores de absorbância obtidos A260/280nm. O grau de contaminação por outros compostos (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) foi avaliado pela absorbância A260/230nm. As amostras que apresentaram absorbância A260/280nm maior ou igual a 2 foram consideradas com um grau de pureza satisfatório. Após a quantificação, o material foi armazenado a -80 °C. A Integridade do RNA extraído, foi avaliada por meio da separação eletroforética das amostras de RNA total em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA. A síntese de DNA complementar (cDNA), foi realizada acrescentando 2 µg de RNA a 30 µl de uma mistura contendo primers oligo (dT)12-18, 2,5 µM. dNTPs, 1 mM, tampão IX (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM), 20U de inibidor de ribonuclease e 50U da transcriptase reversa Superscript (SuperScript® III SuperMix for qRT-PCR - Thermo

Scientific). A reação foi incubada no termociclador a uma temperatura de 42 °C durante 50 minutos.

Desenho dos iniciadores (primers)

Os primers foram desenhados utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems, EUA). As sequências de nucleotídeos referentes aos genes avaliados nesse estudo foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando sequências completas de CDs, e quando não disponível foram utilizadas sequências parciais encontradas. Para os genes que apresentavam variações de transcritos, foi realizado um alinhamento das sequências para identificar regiões em comum entre os transcritos, e a partir dessas, foram desenhados os respectivos primers. Os tamanho dos amplicons variou de 50 a 150 pb. Os primers utilizados nesse estudo estão relacionados no quadro 1.

Quadro 1- Relação das Sequências de primers forward e reverse referente aos genes avaliados, utilizados para quantificação da expressão de citocinas por qPCR.

Gene alvo	Sequência de oligonucleotídeos
HPRT	F: TGATAGATCCACTCCCATAACTGTAGA R: CCATTAATTTTTAAGTCCCCTGTTG
IFN- γ	F: GCTACTGCCAGGGCACACTC R: TAAAGACGAGGTCCCCTCCA
TNF	F: GCTCCATGGGCCAGACT R: ACAGGCTTGTCGTTTGAATTTT
IL-6	F: CACCATCAAACCCTAAGTCAGATC R: TGGGCTAGGCGTGACTATTTTATC
IL-10	F: TTGGGTTGCCAACCTTATC R: TTTTCACAGGGGAGAAATCG
IL-12	F: CCATATGGGAGCTGGAGAAA R: CCCAGAGCCTACAGCTTCAC

PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente "SYBR-Green PCR Master MIX" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e termociclador "Applied Biosystems 7500 real time PCR system". A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do AR_n ($AR_n = R_n^{\wedge} - R_n$), onde R_n^{\wedge} = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e R_n = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de AR_n permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a AR_n ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa foi estabelecido um valor de AR_n , que é uma linha de corte (Threshold) para cada curva de amplificação de um dado par de primers. O número do ciclo em que a AR_n cruza o threshold corresponde ao C_t (cycle threshold) da amostra. O valor de C_t é preditivo da quantidade de mRNA alvo, presente na amostra. O cálculo da quantificação relativa foi feito pelo método do ΔC_t , onde $\Delta C_t = C_t$ gene alvo - C_t gene referência. O valor de C_t é um valor logarítmico gerado no gráfico da curva de amplificação da reação de qPCR (já explicado anteriormente nesse estudo) e os valores de " C_t " são gerados a partir da normalização dos valores de quantificação da amostra alvo em relação à amostra constitutiva, ou seja, " $C_t = (C_t$ alvo - C_t controle endógeno). O gene de controle endógeno utilizado foi o hipoxantina fosforribosil transferase (HPRT). Os resultados foram expressos em $2^{-\Delta C_t}$. O número 2 que compõe a base da função exponencial denota que a amplificação dobra a quantidade de alvos a cada ciclo, isso em condições de reação onde a eficiência é de 100%.

Parâmetros bioquímicos

O sangue total foi coletado em tubos sem anticoagulante, processado para obtenção do soro. Este foi armazenado a -20°. Foram realizadas as determinações das concentrações séricas de glicose, albumina, triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL), por método automatizado, utilizando kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para calcular os níveis da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), foi utilizada a fórmula de Friedewald.

Análise histológica do tecido adiposo

Após a pesagem, foi retirada uma porção do tecido adiposo, que foi preservada em solução de formol a 10%. O tecido foi submetido ao procedimento histológico de rotina para fixação, desidratação, diafanização e parafinização. Após serem processados eles foram cortados (5µm) em micrótomo. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia óptica. Foi realizada a captura de 5 campos de cada lâmina, no aumento de 40X, através do programa computadorizado *AxioVision*. As medidas do diâmetro, de todos os adipócitos dos campos fotografados, foram realizadas no software de análise histomorfométrica de imagem do Instituto nacional de Saúde, *ImageJ*. Para medir o diâmetro foi padronizado a maior distância possível entre dois pontos na membrana celular dos adipócitos.

Determinação das concentrações séricas das adipocinas

Para determinar as concentrações séricas da adiponectina, foi utilizado um kit de ELISA sanduiche, produzido pela MyBioSource. A leptina foi dosada utilizando um kit de ELISA para rato, previamente validado (HUNG et al., 2009), produzido pela Enzo Life Science.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). Os pesos relativos dos órgãos e tecidos foi calculado, dividindo o peso do órgão ou tecido, pelo peso do animal no dia da eutanásia. Os resultados obtidos foram submetidos a teste de normalidade para a escolha de teste paramétrico ou não paramétrico. Os dados das amostras que apresentaram uma

distribuição normal, na comparação entre os grupos, foram analisados pelo teste *t de Student*. As que não apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Em comparações com mais de 2 grupos, foi feita a análise de variância (ANOVA 2way). Além disto, foram realizadas análises de correlações entre as variáveis pelo método de correlação de Spearman (*r*). Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL E DA PROGRESSÃO DA INFECÇÃO

Não foram identificados sinais clínicos aparentes da doença, como perda de pelo e/ou descamação ou ulcerações na pele dos animais infectados, eles apresentam emagrecimento, mas há a preservação do estado geral do animal. A evolução do peso corporal mostrou que os animais infectados, ganham menos peso que os animais controles. Além disso, a partir da 27 semana, os animais infectados começam a perder peso, apresentando emagrecimento. A média do peso dos animais controles (CTL) ($163,4\text{g} \pm 0,8273$), quando comparado, com os animais infectados (INF) ($142,7\text{g} \pm 1,724$), apresentou diferença estatisticamente significativa ($P\text{valor} < 0,0001$) (Figura 3).

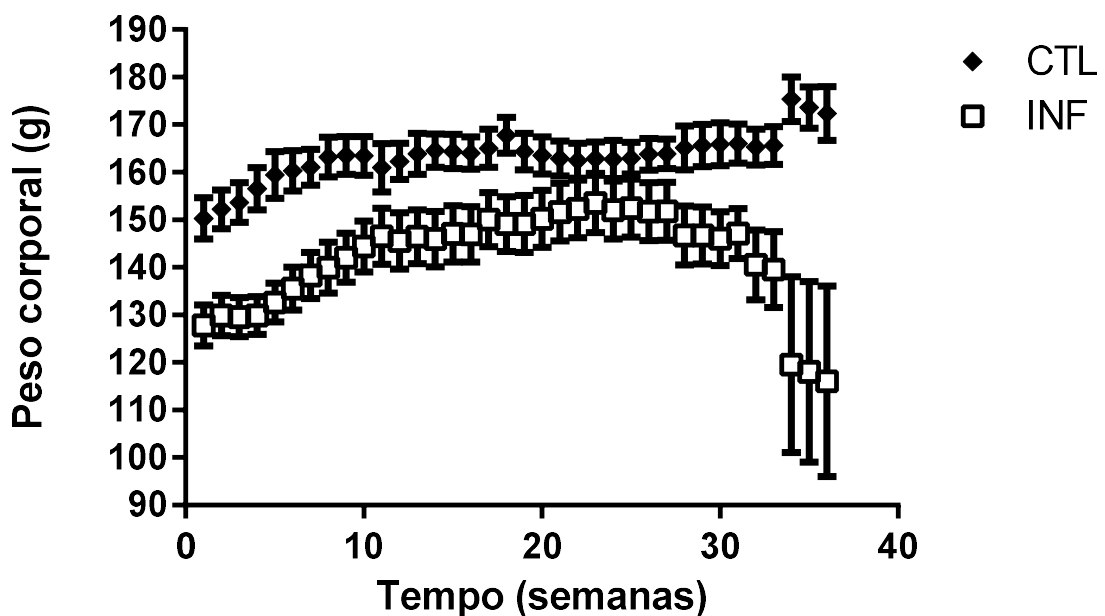


Figura 3. Evolução do peso corporal dos hamsters controle e infectado com *L. infantum*. Realizado teste t. Os valores apresentados correspondem a média e \pm o erro padrão da média.

O baço e o fígado dos animais infectados, não apresentaram diferença no peso relativo, após 4 meses de infecção. No entanto, o baço, após 8 meses de infecção,

apresentou um aumento significativo no peso relativo (Pvalor <0.001). Enquanto que o fígado, não apresentou alterações significativas (Figura 4 A e B).

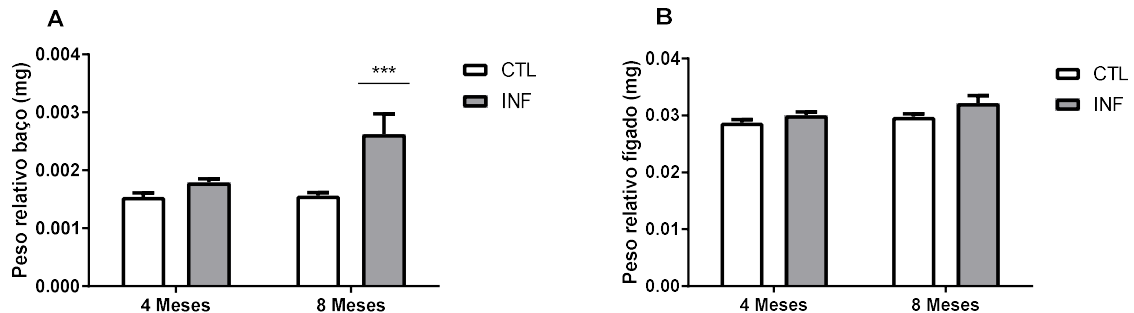


Figura 4. Peso relativo do baço e do fígado dos Hamsters controle e infectados com *L. infantum*. após 4 e 8 meses. O peso relativo foi obtido dividindo-se o peso do órgão (mg) pelo peso do animal (mg). **(A)** O peso relativo do baço dos animais controles (n= 7) e infectados (n=8), no tempo de 4 meses. Tempo de 8 meses, animais infectados (n=12) e controles (n=13) (***)P<0.001). **(B)** O peso relativo do fígado dos animais, tanto no tempo de 4 meses, quanto no tempo de 8 meses. Realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

Os animais apresentaram carga parasitária moderada tanto no baço, quanto no fígado. Não foram observadas diferenças na carga parasitária do baço nos tempos de 4 (9.117 ± 0.6541 n=8) e 8 (8.439 ± 0.3754 n=9) meses (Pvalor=0,3691). (Figura 5A). O mesmo ocorre no fígado nos 4 (8.592 ± 0.5001 , n=8) e 8 (8.571 ± 0.2502 , n= 9) meses pós infecção (Pvalor= 0,9691) (Figura 5B).

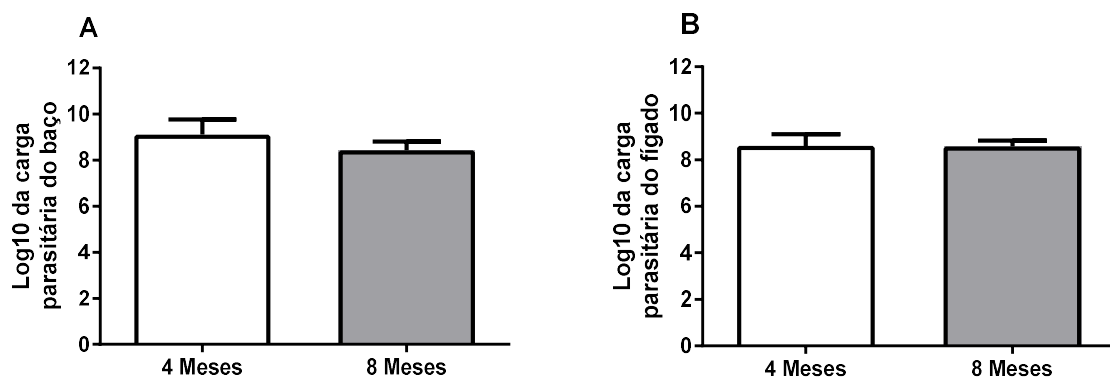


Figura 5. Carga parasitária do baço e do fígado de Hamsters infectados por *L. infantum*. A carga parasitária foi realizada pela técnica de diluição limitante. Os resultados de carga parasitária obtidos foram multiplicados pelo peso do órgão (mg). **(A)** Carga parasitária do baço, nos tempos de 4 e 8 meses (Pvalor= 0,3691). **(B)** Carga parasitária do fígado, nos tempos de 4 e 8 meses (Pvalor= 0,9691). Os dados foram comparados pelo teste t, os valores apresentados correspondem a média \pm o erro padrão da média).

EXPRESSÃO DAS CITOCINAS NO BAÇO

A expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, no baço não apresentou diferença nos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dos grupos controles e infectados, nos tempos de 4 e 8 meses (Figura 6A e B).

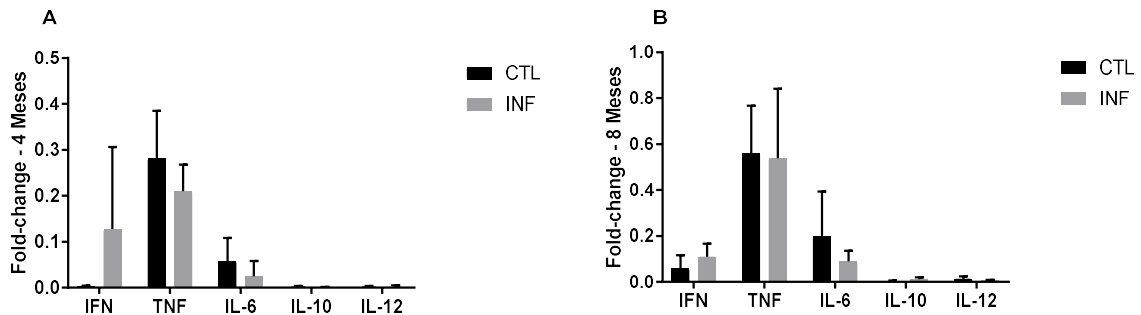


Figura 6. Expressão relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, no baço de hamsters controle e infectados por *L. infatum*. Os valores expressos no fold-change corresponde aos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **(A)** Expressão de citocinas dos animais eutanasiados no tempo de 4 meses. **(B)** Expressão de citocinas dos animais eutanasiados no tempo de 8 meses. Realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ANALISADOS

Foram determinadas as concentrações séricas de glicose, albumina (Figura 7A e B), triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) dos animais (Figura 8A, B, C, D e E). Os níveis séricos, desses parâmetros, nos animais controles e infectados, nos tempos de 4 e 8, meses não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos analisados.

Parâmetro	4 meses		8 meses	
	CTL (n=7)	INF (n=8)	CTL (n=12)	INF (n=11)
Glicose	54,429±6,094	58,87500±4,365	57,500±3,463	63,417±4,098
Albumina	3,157±0,184	3,125 ± 0,214	3,283±0,183	3,383±0,212
Triglicérides	129,714±9,863	142,000±9,333	139,000±17,035	153,091±19,225
Colesterol	77,571±5,652	79,875±6,616	88,000 ± 7,703	91,000 ± 7,332
HDL	47,143±6,088	37,375±6,874	44,917 ± 4,027	52,364 ± 4,405
LDL	6,571±1,445	14,625±3,359	15,250 ± 2,547	11,091 ± 2,360
VLDL	25,857±1,993	28,375±1,870	27,750 ± 3,403	30,636 ± 3,845,

Esses valores correspondem a média ± o erro padrão da média.

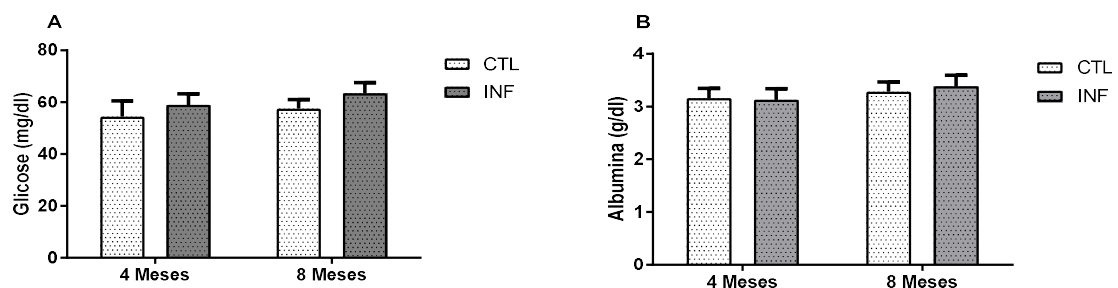


Figura 7. Concentrações séricas de glicose e albumina, dos hamsters controle e infectados com *L. infantum*, após 4 e 8 meses. (A) Concentrações séricas de glicose. (B) Concentrações séricas de albumina. Os valores apresentados correspondem a média e ± o erro padrão da média. Realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni e todos apresentaram P valor > 0,05.

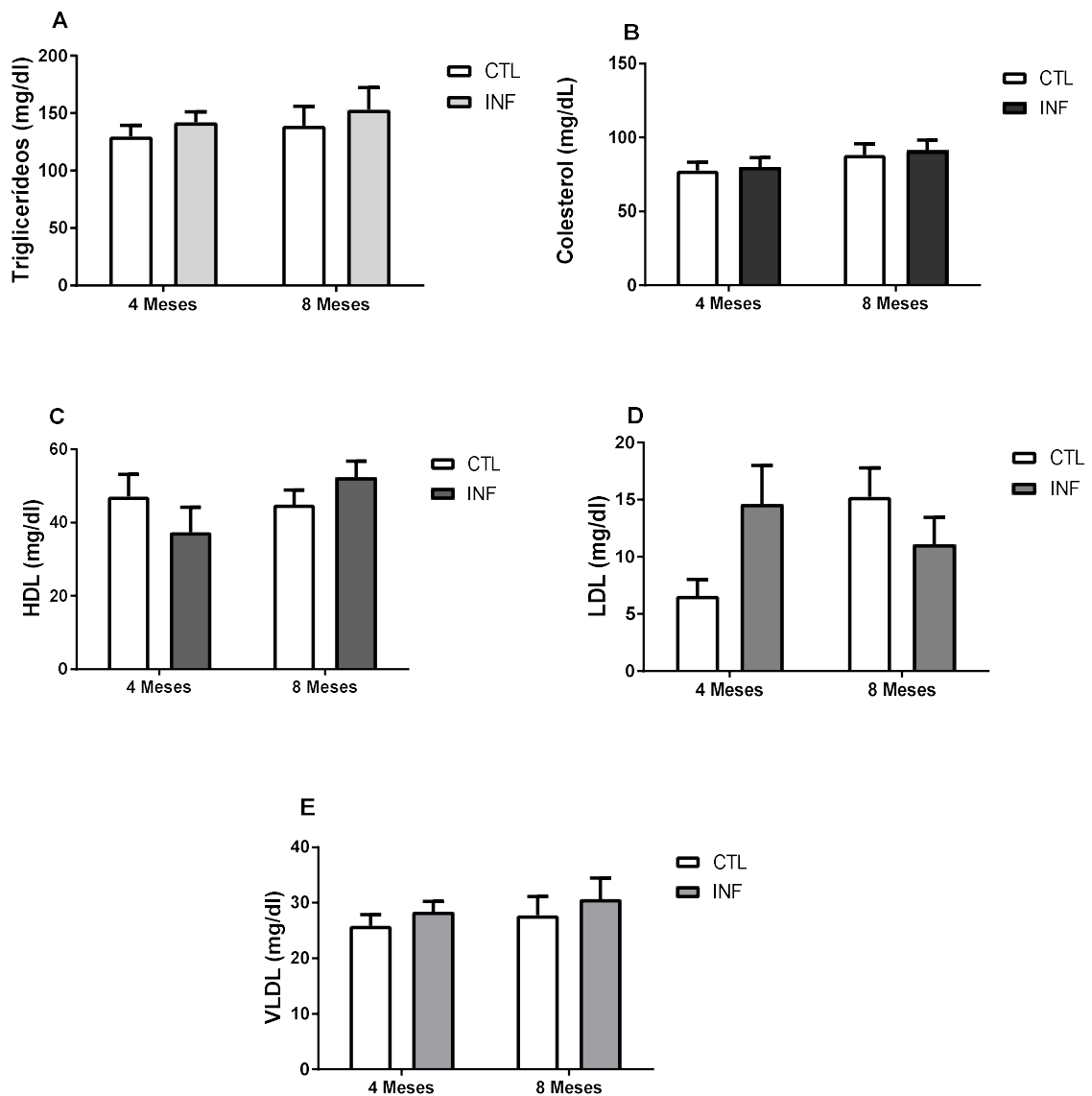


Figura 8. Concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e das lipoproteínas HDL, LDL e VLDL, dos Hamsters controle e infectados com *L. infantum*, após 4 e 8 meses. Os gráficos apresentam as concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo de Lipídios. **(A)** Triglicérides. **(B)** Colesterol. **(C)** HDL. **(D)** LDL e **(E)** Os níveis plasmáticos de VLDL. As dosagens foram realizadas por método automatizado, as concentrações de VLDL, foram calculadas pela fórmula de Friedewald. Realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni e todos apresentaram Pvalor > 0,05.

ANÁLISE DE CORRELAÇÃO - CARGA PARASITÁRIA

A análise de correlação da carga parasitária do baço apresentou correlação negativa com a Albumina ($r=-0.5686$) e com o colesterol total ($r=-0.5326$), e correlação positiva com o peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal ($r= 0.5221$). A carga parasitária do fígado também apresentou correlação negativa com os níveis séricos de albumina ($r= -0.6101$) (tabela 2).

Tabela 2. Correlações da carga parasitária do baço e do fígado com diferentes parâmetros clínicos da LV experimental.

	Carga Parasitária Baço		Carga Parasitária Fígado	
	r	p	r	P
Peso eutanásia	-0.1202	0.6437	-0,1239	0,6334
IFN- γ	0.4000	0.7500	0.4000	0.7500
TNF- α	---	---	---	---
IL-6	0.4000	0.7500	0.4000	0.7500
IL-10	0.0000	>0.9999	-0.1000	0.9500
IL-12	0.2000	0.7833	-0.1000	0.9500
Glicose	-0.3980	0.1141	-0.3084	0.2271
Albumina	-0.5686	0.0364	-0.6101	0.0107
Triglicérides	-0.0269	0.9209	0.0441	0.8686
Colesterol total	-0.5326	0.0431	-0.4270	0.0884
HDL	-0.3686	0.1454	-0.3661	0.1482
LDL	-0.0650	0.8035	0.1486	0.5668
VLDL	-0.0282	0.9152	0.0466	0.8591
TA Epididimal ^a	0.4608	0.0645	0.2475	0.3367
TA Epididimal ^b	0.1429	0.7825	0.8000	0.3333
TA Retroperitoneal ^a	0.5221	0.0336	0.3382	0.1842
TA Retroperitoneal ^b	0.3000	0.6833	-0.5000	>0.9999

^a peso relativo ^b média do diâmetro dos adipócitos r: coeficiente de correlação de Spearman

ANÁLISE DO TECIDO ADIPOSEO

O peso relativo do tecido adiposo epididimal dos animais controles e infectados, nos tempos de 4 ($0,014 \pm 0,001$, $n=7$ e $0,014 \pm 0,001$, $n=8$) e 8 ($0,012 \pm 0,001$, $n=13$ e $0,013 \pm 0,001$, $n=12$) meses, respectivamente, não apresentaram diferença quando comparado aos infectados (Figura 9A). O tecido adiposo retroperitoneal, também não apresentou diferença, tanto no tempo de 4 meses ($0,010 \pm 0,0009$, $n=7$ e $0,010 \pm 0,001$, $n=8$) quanto no tempo de 8 meses ($0,007 \pm 0,0007$, $n=13$ e $0,008 \pm 0,001$, $n=12$) (Figura 9B). Foram preparadas lâminas do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal para análise histopatológica. Foram analisadas 21 lâminas do tecido adiposo epididimal, das quais 9 lâminas dos animais controles e 4 dos animais infectados apresentaram aspecto histológico normal e 8 lâminas dos animais infectados, foram observadas inclusões intracitoplasmática basófilicas (Figura 10A e B). Das 17 lâminas do tecido adiposo retroperitoneal analisadas, 6 lâminas dos animais controles e 4 dos animais infectados, apresentaram aspecto histológico normal. Em 5 lâminas dos animais infectados, e em 1 dos animais controles foram observadas inclusões intracitoplasmática basófilicas (Figura 10C e D). Foi realizada a análise morfométrica dos adipócitos, onde foi medido o diâmetro das células, mas não houve diferença estatística entre os grupos em ambos os tecidos (Figura 11).

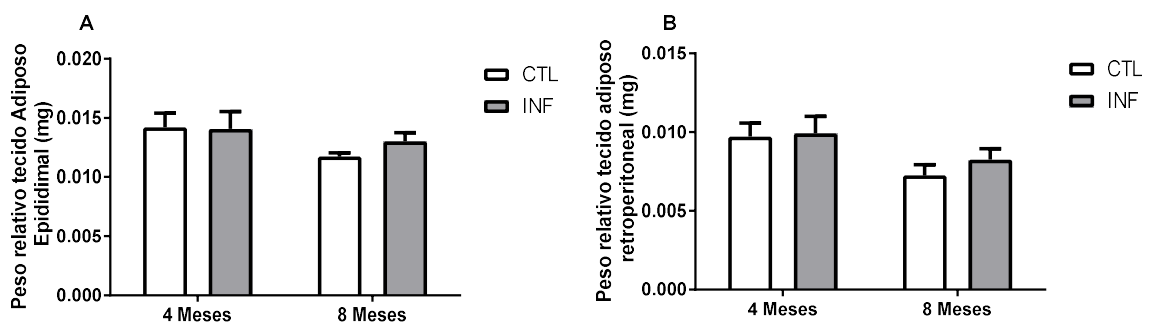


Figura 9. Peso relativo do tecido adiposo epididimal e do tecido adiposo retroperitoneal, dos Hamsters controle e infectados, após 4 e 8 meses. **(A)** O peso relativo do tecido adiposo epididimal dos animais controles e infectados, nos tempos de 4 ($n=15$) e 8 ($n=25$) meses. **(B)** O peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal dos animais, de 4 ($n=15$) e 8 ($n=25$) meses. Foi realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni, $P_{valor} > 0,005$, valores apresentados correspondem a média \pm erro padrão da média.

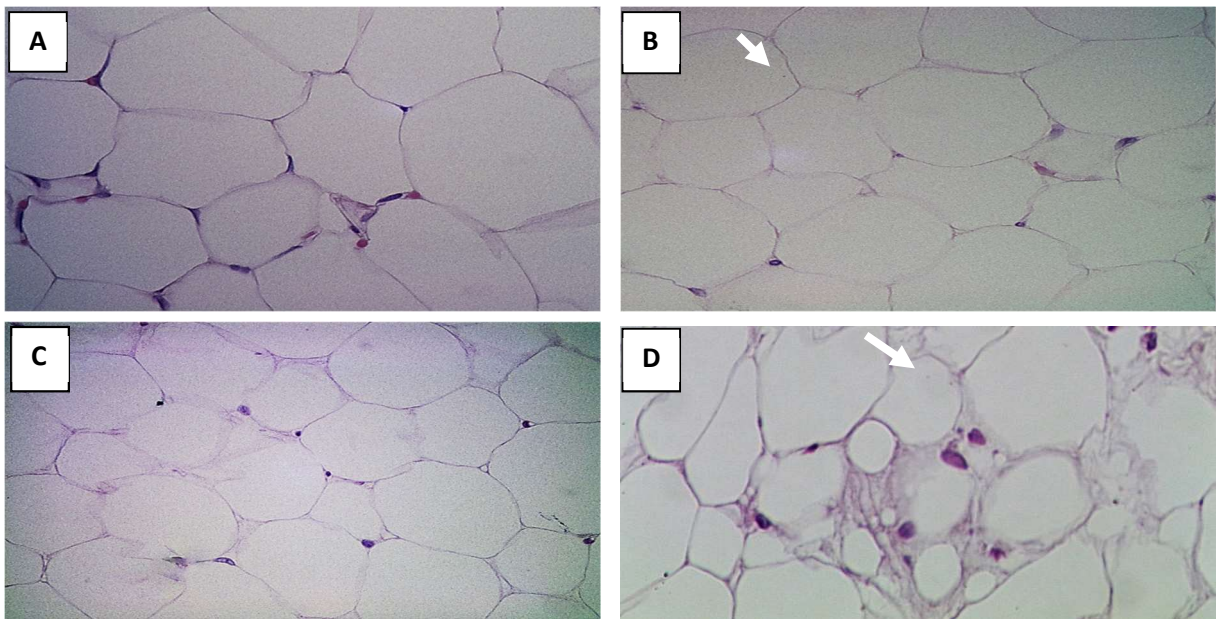


Figura 10. Foto representativa do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos Hamsters controle e infectados com *L. infantum*, coradas com HE, no aumento de 40x. **(A)** Tecido adiposo epididimal de animal controle, com aspecto histológico normal. **(B)** Tecido adiposo epididimal de animal infectado com a presença de inclusões intracitoplasmáticas basofílicas (indicada pela seta). **(C)** Tecido adiposo retroperitoneal de animal controle, com aspecto histológico normal. **(D)** Tecido adiposo retroperitoneal de animal infectado, com a presença de inclusões intracitoplasmáticas basofílicas (indicada pela seta).

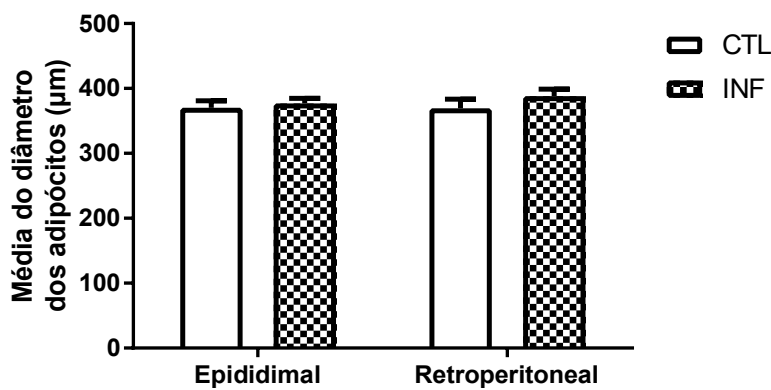


FIGURA 11. Média do diâmetro dos adipócitos do tecido Epididimal e Retroperitônio, dos hamsters controle e infectados. Os dados foram comparados pelo teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni t, os valores correspondem a média \pm o erro padrão da média.

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS ADIPOCINAS

As concentrações séricas das adipocinas, adiponectina e leptina, nos animais controles e infectados, não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos tempos de 4 e 8 meses (Figura 7B).

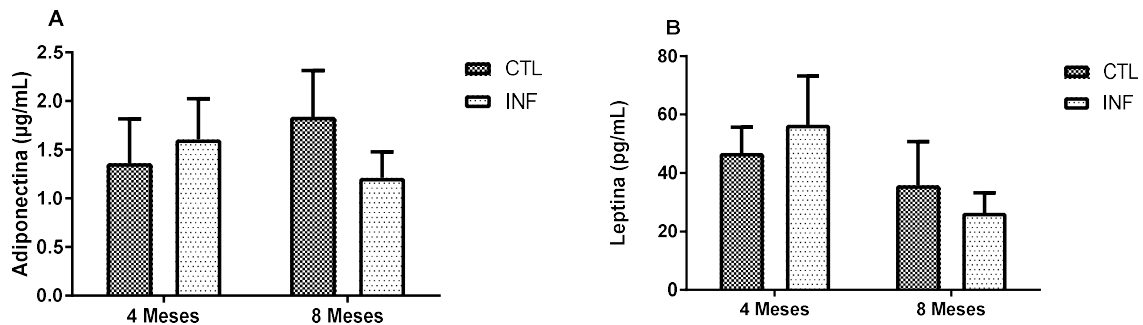


Figura 12. Concentrações séricas das adipocinas nos hamsters controle e infectados com *L. infantum*, após 4 e 8 meses. (A) Concentrações séricas de adiponectina ($\mu\text{g/ml}$). (B) Concentrações séricas de leptina (pg/ml). Os valores apresentados correspondem a média e \pm o erro padrão da média. Realizado o teste 2way ANOVA e pós teste de Bonferroni e todos apresentaram Pvalor > 0,05.

ANÁLISE DE CORRELAÇÃO – ADIPONECTINA E LEPTINA

A análise de correlação das adipocinas mostrou que, a adiponectina se correlaciona negativamente com os níveis de glicose ($r=-0.6140$) e de albumina ($r=-0.6290$) nos animais controles, mas isso não ocorre nos animais infectados (Tabela 3). A leptina apresenta uma maior número de correlações. Nos animais controle, ela está correlacionada positivamente com as concentrações séricas de triglicérides ($r=0.7484$) e VLDL ($r=0.7012$) e está correlacionada negativamente com o peso relativo do baço ($r= -0.6530$). No grupo de animais infectados, a leptina apresentou correlação positiva com a carga parasitária do baço ($r=0.7000$), com o peso relativo do tecido adiposo epididimal ($r=0.7040$) e retroperitoneal (0.6620) e com as concentrações séricas de triglicérides ($r= 0.6690$) e VLDL ($r= 0.6690$). Já as concentrações de HDL ($r= -0.7461$) estão correlacionadas negativamente com os níveis de leptina, na LV experimental (Tabela 4).

Tabela 3. Correlação das concentrações séricas da adiponectina com diferentes parâmetros clínicos dos hamsters controles e infectados com *L. infantum*

	Adiponectina		Adiponectina	
	Controle		Infectado	
	r	p	r	P
Variação de peso ^a	0.3462	0.2670	-0.2351	0.4590
Peso eutanásia	-0.1213	0.7043	0.0857	0.7875
Carga parasitária baço	---	---	-0.3939	0.2632
Carga parasitária Fígado	---	---	-0.01515	0.6821
Baço ^b	-0.3368	0.2826	-0.1119	0.7329
Fígado ^b	-0.2316	0.4661	0.1399	0.6673
TA Epididimal ^b	0.8286	0.0583	-0.0909	0.7830
TA Retroperitoneal ^b	-0.2162	0.6357	-0.0559	0.8692
Glicose	-0.6140	0.0371	0.1193	0.7111
Albumina	-0.6290	0.0315	0.3316	0.2903
Triglicerídes	0.1582	0.6196	0.2098	0.5137
Colesterol Total	-0.3820	0.2185	0.3439	0.2720
HDL	-0.3480	0.2648	-0.2561	0.4186
LDL	0.4261	0.1667	0.3776	0.2276
VLDL	0.1272	0.6903	0.1856	0.5614

^a peso final – peso inicial

^b peso relativo

r: coeficiente de correlação de Spearman

Tabela 4. Correlação das concentrações séricas da leptina com diferentes parâmetros clínicos dos hamsters controles e infectados com *L. infatum*.

	Leptina		Leptina	
	Controle		Infectado	
	r	p	r	P
Variação de peso ^a	-0.1187	0.7261	0.3497	0.2623
Peso eutanásia	-0.0277	0.9217	0.0105	0.9758
Carga parasitária baço	---	---	0.7000	0.0433
Carga parasitária Fígado	---	---	0.6333	0.0760
Baço ^b	-0.6530	0.0099	0.2592	0.4170
Fígado ^b	0.1091	0.6971	0.3993	0.1979
TA Epididimal ^b	0.1786	0.7131	0.7040	0.0130
TA Retroperitoneal ^b	-0.1081	0.8222	0.6620	0.0221
Glicose	-0.1670	0.5493	-0.2070	0.5147
Albumina	0.0271	0.9238	-0.4519	0.1408
Triglicérides	0.7484	0.0019	0.6690	0.0203
Colesterol Total	-0.1175	0.6737	-0.1684	0.5974
HDL	-0.1900	0.4936	-0.7461	0.0070
LDL	0.0511	0.8555	0.5194	0.0857
VLDL	0.7012	0.0046	0.6690	0.0203

^a peso final – peso inicial

^b peso relativo

r: coeficiente de correlação de Spearman

DISCUSSÃO

A utilização do Hamster como modelo experimental tem importante papel no estudo das leishmanioses, uma vez que, vários trabalhos têm demonstrado a elevada susceptibilidade deste modelo à infecção por espécies visceralizantes de leishmania, como a *L. donovani* (DASGUPTA et al., 1999; GIFAWESEN; FARRELL, 1989), responsável pela LV no Velho Mundo, ou a *L. infantum* (Bories et al., 1998; Requena et al., 2000) agente tiológico da LV no Novo Mundo. O hamster apresenta uma associação característica entre parasitismo, títulos elevados de anticorpos e ausência de respostas linfoproliferativas (MELBY et al., 2001b; PEARSON et al., 1990; REQUENA et al., 2000; RIÇA-CAPELA et al., 2003), com perfis muito semelhantes aos observados na LV humana e canina. Isso torna o hamster um excelente modelo experimental para LV, pois ele reproduz diversos aspectos clínico-patológicos da doença humana e canina (HANDMAN, 2001; MELBY et al., 1998a, 2001a; MOREIRA et al., 2012; PAL et al., 1995).

A LV experimental é marcada pelo desenvolvimento de uma resposta imune órgão específica, sendo o baço e o fígado os principais órgãos alvos atingidos. O baço desempenha um papel central na LV, pois é o sítio inicial da geração de resposta imune específica contra o parasito mediada por células, podendo se tornar também um local de persistência do mesmo apresentando inúmeras alterações imunopatológicas (ENGWERDA; ATO; KAYE, 2004). O fígado é o local onde a resolução da infecção aguda está associada ao desenvolvimento de granulomas hepáticos intralobulares tipicamente inflamatórios em torno das células de Kupffer (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Em hamsters com LV, as alterações hepáticas em geral são resultado da presença de um infiltrado inflamatório e da formação de granulomas (WILSON et al., 1987).

Não foram observadas manifestações clínicas aparentes da doença como: perda de pelo, lesões ou descamação da pele e caquexia. Os animais com maior tempo de infecção apresentaram emagrecimento, mas mantiveram um bom padrão geral. Além disso, os animais com maior tempo de infecção desenvolveram esplenomegalia, sinal clássico da LV, e apresentaram carga parasitária tanto no baço, quanto no fígado, nos tempos de 4 e 8 meses. Não foi observada a presença de hepatomegalia, uma

vez que, não houve o aumento no peso relativo do fígado dos animais infectados, mesmo no grupo que foi eutanasiado 8 meses após a infecção. No entanto, hepatomegalia nem sempre é observada, ou aparece em menor frequência em modelos de LV experimental (MOREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011)

O emagrecimento e a esplenomegalia apresentados pelos hamsters, após 8 meses de infecção, foram descritos por outros pesquisadores (DEA-AYUELA et al., 2007; MELBY et al., 2001b; NIETO et al., 2011; REQUENA et al., 2000; RIÇA-CAPELA et al., 2003). Embora a frequência desses sinais tenha variado nos diversos trabalhos, a ocorrência dos mesmos, está de acordo com nossos resultados. As manifestações clínicas da LV, em modelos experimentais, depende de alguns fatores como a imunocompetência do hospedeiro, o tamanho do inóculo, a rota de infecção utilizada e a virulência da cepa (DEA-AYUELA et al., 2007; MELBY et al., 2001a; MOREIRA et al., 2012, 2016; PAL et al., 1995; REQUENA et al., 2000; TRAVI et al., 2002). As vias de infecção mais utilizadas são a intracardíaca e a intraperitoneal. No entanto, as rotas que melhor mimetizam a infecção natural são a subcutânea e a intradérmica (HANDMAN, 2001; MOREIRA et al., 2012; WILSON et al., 1987). Nesse trabalho utilizamos a rota de infecção intradérmica e o inóculo de 1×10^5 promastigotas de *L. infantum*.

A via intradérmica está associada com o aparecimento mais tardio e menos frequente de sinais clínicos da LV. Em trabalho realizado por Wilson et al (1987), no qual ele utilizou a mesma via e tamanho de inóculo que foram utilizadas no presente trabalho, os sinais clínicos da LV só apareceram a partir de 10 meses após infecção experimental. Além disso, Moreira et al. (2012), também demonstrou que a via intradérmica está associada com o aparecimento tardio de sinais e sintomas clínicos da LV em hamsters.

A via intracardíaca tem a capacidade de gerar um quadro de LV mais grave em menos tempo. Alguns trabalhos realizados com Hamsters, infectados por essa via, relataram que os animais desenvolvem lesões cutaneomucosas, acompanhada por úlceras localizadas no focinho bem como, edema nas patas dos animais (MOREIRA et al., 2012; NIETO et al., 2011). No entanto, em um trabalho que avaliou os parâmetros clínicos da infecção experimental em hamsters, com diferentes tamanhos de inóculos (10^3 , 10^4 e 10^5 formas promastigotas de *L. Infantum*), utilizando a via intracardíaca,

demonstrou que a sintomatologia do animal é dependente do tamanho do inóculo. Ele observou dois tipos de infecções: sintomáticos e assintomáticos. Os animais tidos como assintomáticos, eram aqueles que não apresentavam sinais clínicos da infecção, ou que não apresentavam sinais aparentes da doença, mas tinha algum sinal interno como esplenomegalia e moderada carga parasitária no baço e no fígado, esses foram considerados oligossintomáticos (REQUENA et al., 2000). Estas diferenças, bem como acontece com outras alterações, provavelmente são inerentes a complexidade das interações do parasito com o hospedeiro.

A quantificação da carga parasitária é de fundamental importância para um melhor entendimento das manifestações clínico-patológicas da infecção. Neste trabalho a quantificação da carga parasitária do baço e do fígado foi realizada utilizando a técnica de diluição limitante, e os valores obtidos foram multiplicados pelo peso do órgão. Foi observado que ambos, baço e fígado, apresentam valor de carga parasitária semelhante, tanto nos animais com 4 meses, quanto nos animais com 8 meses de infecção. O maior parasitismo no baço tem sido demonstrado, por diversos pesquisadores, em estudos de infecção experimental em hamsters por diferentes espécies de *Leishmania*, formas (amastigotas e promastigotas) e vias de inóculo (DEA-AYUELA et al., 2007; MELBY et al., 2001b; OTT; HANSON; STAUBER, 1967; REQUENA et al., 2000; RIÇA-CAPELA et al., 2003). Segundo Ott, (1967) a parasitemia no baço é mais consistente em relação ao fígado, uma vez que, existe grande diferença de tamanho e peso entre os mesmos. A diferença do resultado encontrado nesse trabalho pode ser explicada porque muitos desses autores não incluíram o peso do órgão na quantificação da carga parasitária.

Dessa forma, mesmo que os animais não tenham apresentado quadro grave de LV com manifestações clínicas aparentes da doença. Após 8 meses de infecção eles apresentaram perda de peso e esplenomegalia. Além disso, os hamsters apresentaram carga parasitária tanto no baço, quanto no fígado, nos tempos de 4 e 8 meses. Isto demonstra que apesar dos animais não terem apresentado sinais clínicos evidentes durante o período avaliado, eles apresentavam o parasito viável no baço e no fígado, demonstrando que a *leishmania* teve a capacidade de se desenvolver e se multiplicar, estabelecendo a infecção.

O perfil de citocinas inicialmente liberado em resposta a infecção por leishmania, é o ponto chave para determinar se o hospedeiro será resistente ou susceptível. Quando citocinas que promovem a expansão das células Th1 (IL-2, IFN- γ e IL-12) e contribuem com a ativação dos macrófagos, como IFN- γ e TNF- α , estão sendo mais expressas o hospedeiro é resistente. Em contrapartida, quando há a alta expressão de citocinas que promovem a expansão de células Th2, como IL-4 e IL-10, ou suprimem a ativação dos macrófagos, como IL-4, IL-10 e TGF- β , o hospedeiro torna-se susceptível a infecção pelas formas visceralizantes de Leishmania (MELBY et al., 2001a).

A infecção no baço ocorre de forma persistente, onde o número de parasitas aumenta lentamente e persiste durante a vida do animal (ENGWERDA et al., 1998). A resposta imune protetora no baço é iniciada pelas CDs que foram expostas aos produtos antigênicos da leishmania. Elas secretam IL-12, que leva a diferenciação das células Th1 que vão produzir IFN- γ e TNF. Em paralelo, as células T CD8 virgens são ativadas pelas CDs, que na presença de IL-12 e IFN, diferenciam-se em células efetoras, que potencializam a resposta protetora, devido a produção de IFN- γ e TNF (RODRIGUES et al., 2016). Níveis elevados de TNF no baço estão associados com a indução de IL-10, o que contribui de forma significativa para o estabelecimento da infecção (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Esses dados foram obtidos com camundongos, são poucas as informações referentes ao hamster.

A citocina IFN- γ possui um papel chave no controle da infecção por leishmania, pois ela é um dos principais ativadores de macrófagos, através da ativação iNOS e consequentemente produção de óxido nítrico, que são mecanismos efetores críticos envolvidos no controle da replicação do parasito (LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2008; MELBY et al., 1998b, 2001b). A citocina IL-6 é produzida por diferentes tipos celulares, incluindo os macrófagos e as células dendríticas. Ela pode inibir diretamente a produção de TNF- α e também suprimir a resposta Th1 ou induzir a respostas Th2 (DIEHL; RINCÓN, 2002). Na LV humana, foi evidenciado que altas concentrações de IL-6 e IFN- γ , são preditores de morte (COSTA et al., 2013). A associação da IL-6 com a letalidade da infecção, também foi observada em estudos recentes (DOS SANTOS et al., 2016).

Neste trabalho a expressão do mRNA das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, no baço de hamsters controle e infectados por *L. infantum*, por RT-PCR quantitativa

em tempo Real (qRT-PCR), foi semelhante nos animais controles e infectados. Houve uma expressão de mínima de IL-10 e IL-12 e uma expressão muito discreta de IL-6 e IFN- γ . A citocina que apresentou uma expressão um pouco mais significativa foi a TNF- α . A literatura dispõe de poucos dados acerca da expressão de citocinas em modelo experimental de hamster. Melby et al (1998), observou que a expressão de IL-12 e TNF- α são moderadas no início da infecção. Em 2001, o mesmo autor demonstrou que há aumento na expressão de IFN- γ , bem como de TGF- β e IL-10 no baço de hamsters experimentalmente infectados por *L.donovani*. No entanto, o hamster mesmo expressando citocinas Th1 no baço, no fígado e na medula óssea, não é capaz de controlar a replicação da leishmania, devido a falhas nos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (PEREZ et al., 2006).

Alguns trabalhos têm evidenciado que a LV ativa pode alterar alguns parâmetros bioquímicos. A avaliação bioquímica representa uma importante área de estudo da leishmaniose visceral, seja humana ou canina, como fonte de monitoração da evolução do quadro clínico, bem como na identificação de formas graves da doença. Alterações nos parâmetros bioquímicos podem ocorrer devido a lesão celular ou disfunção orgânica (MOREIRA et al., 2016).

Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de glicose, albumina, triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL, nos hamsters infectados com *L. infantum*. No entanto, a carga parasitária do baço apresentou correlação negativa com os níveis de colesterol total. A correlação negativa da carga parasitária com as concentrações de albumina também foi descrita por Carrilo et al. (2014). Ele observou que a infecção com *L. Infantum*, em hamsters, está associada a redução dos níveis de albumina. No que se refere a LV humana, Crianças com que apresentam concentrações elevadas de albumina, tem maior probabilidade de desenvolver uma infecção assintomática, o que sugeri um possível efeito protetor da albumina (LIMA MACIEL et al., 2008). Esses dados sugerem que o parasita apresenta o mesmo tipo de associação com os níveis de albumina, tanto na LV experimental quanto na LV humana.

O metabolismo de lipídios na LV humana sofre diversas alterações. Em pacientes adultos há o aumento dos níveis de triglicérides (BEKAERT et al., 1989; LAL et al., 2015) e VLDL e níveis reduzidos de colesterol total, LDL e HDL circulantes (BEKAERT et al., 1989; LIBEROPOULOS et al., 2002; SOARES et al., 2010). Pacientes

pediátricos apresentam quadro similar aos adultos, com aumento dos níveis de triglicéride e VLDL, diminuição dos níveis de colesterol total e LDL (LAL et al., 2007).

O metabolismo de lipídios em cães também é alterado pela infecção com *L. infantum*, eles apresentam elevação dos níveis de triglicérides, colesterol e LDL e diminuição nos níveis de HDL (NIETO et al., 1992). Em modelo de camundongo infectado com *L. donovani*, não foram observadas alterações nos níveis de glicose, mas os níveis de colesterol estavam diminuídos nos animais infectados (MAURYA et al., 2016).

A LV não causou alterações nos níveis de triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL dos hamsters infectados com *L. infantum*, mas as análise de correlação, mostraram que a carga parasitária do baço está associada negativamente com os níveis de colesterol total. Isso também é observado na LV humana, onde as concentrações de colesterol total em adultos, tem uma diminuição significativa com o aumento da carga parasitária (GHOSH et al., 2011; LAL et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado a importância do tecido adiposo e das adipocinas na regulação da resposta imunológica durante infecções. Nas doenças parasitárias, o papel do tecido adiposo tem sido investigado na doença de Chagas. Foi observada a presença de *T. cruzi* em adipócitos de camundongos (ANDRADE; SILVA, 1995). Trabalhos recentes mostraram que o tecido adiposo é facilmente infectado pelo *T. cruzi* (COMBS et al., 2005; NAGAJYOTHI et al., 2008), e que ele também infecta os adipócitos humanos (FERREIRA et al., 2011). Em cultura de adipócitos infectados com *T. cruzi*, foi possível observar ainda, que o parasita causa alterações na expressão de diferentes proteínas produzidas e secretadas pelos adipócitos. Uma das adipocinas que tem a sua expressão diminuída devido a infecção pelo *T. cruzi* é a adiponectina (COMBS et al., 2005). Isso leva a crer, que os adipócitos e o tecido adiposo sirvam como um reservatório de parasitas, que podem causar a enfermidade décadas após a infecção (COMBS et al., 2005; NAGAJYOTHI et al., 2011, 2012).

A infecção de camundongos por *T. cruzi* leva a diminuição do tamanho do adipócito e do conteúdo de lipídico. Além disso, a carga parasitária do tecido adiposo é maior que a carga parasitária do coração e do baço desses animais (NAGAJYOTHI et al., 2012). No presente trabalho, comparamos o peso relativo do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos hamsters controles e infectados com *L. infantum*, mas não foram

observadas diferença. O tamanho dos adipócitos desses tecidos também não demonstrou alterações significativas. No entanto, a análise histopatológica desses tecidos, evidenciou a presença de inclusões intracitoplasmáticas basofílicas na lâmina dos animais infectados, esse achado é inespecífico e precisa ser melhor investigado, pois até o presente momento não há nenhum dado publicado que descreva a relação do tecido adiposo e das adipocinas com a LV em hamsters.

Alguns estudos têm mostrado que os níveis de algumas adipocinas estão alterados durante infecções, tais como infecção por HPV, tuberculose, malária e doença de Chagas. A deficiência de leptina, por exemplo, tem sido associada com o aumento da susceptibilidade a várias doenças infecciosas, devido a desregulação da produção de citocinas ou por imunossupressão (FAGGIONI; FEINGOLD; GRUNFELD, 2001).

No HPV persistente, os níveis da adipocina resistina e da citocina TNF- α estão elevados, e não há alteração nas concentrações plasmáticas de adiponectina e leptina (BAKER et al., 2011). Em paciente com tuberculose pulmonar foi observado a diminuição nos níveis plasmáticos de leptina (BUYUKOGLAN et al., 2007; VAN CREVEL et al., 2002). No entanto, em pacientes com tuberculose pulmonar, mal nutridos, os níveis de leptina estavam normais, mas os níveis de grelina estavam reduzidos (KIM et al., 2010). Em pacientes com a tuberculose ativa, os níveis de leptina estão mais baixos que nos pacientes assintomáticos. Níveis aumentados de adiponectina e diminuídos de leptina, estão associados com a presença de grandes infiltrados inflamatórios, independente do índice de massa corpórea dos pacientes (KEICHO et al., 2012). Em modelo animal de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, foi demonstrado que a leptina tem papel no desenvolvimento da resposta imunológica inicial a tuberculose (WIELAND et al., 2005). Na malária placentar foi observado que ocorre redução nos níveis de leptina nas pacientes e no cordão umbilical, e que esses níveis estão correlacionados com o peso dos bebês ao nascer (KABYEMELA et al., 2008a, 2008b). Pacientes com a doença de Chagas, apresentam redução dos níveis plasmáticos de Leptina (FERNANDES et al., 2007).

As doenças infecciosas em que há alteração das adipocinas como, a tuberculose, tem em comum com a LV a cronicidade da infecção e a perda de peso associada ao estabelecimento da doença. A LV afeta principalmente os países em desenvolvimento, onde muitas vezes coexiste com a desnutrição crônica que é um

dos principais fatores de risco para o estabelecimento da doença. Um estudo que avaliou a influência da desnutrição proteica sobre o desenvolvimento da LV, em hamsters adultos infectados com *L. infantum*, mostrou que os animais que eram alimentados com dieta hipoprotéica, apresentavam quadro mais grave e resposta imunológica deficiente (CARRILLO et al., 2014).

Em 2011, Dayakar et al. Publicou a hipótese que as concentrações plasmáticas de leptina poderiam estar diminuídas em pacientes com LV, devido à má nutrição e que esta diminuição contribuiria para o aumento das respostas Th2, e assim favoreceria a progressão da infecção. O papel imunomodulador da leptina foi avaliado em camundongos infectados com *L. donovani*. Esse estudo mostrou que os animais infectados tratados com leptina recombinante apresentaram carga parasitária no baço menor que os animais infectados não-tratados. Em adição, os camundongos deficientes de leptina apresentaram maior carga parasitária no baço e no fígado, quando comparados com os camundongos infectados normais (MAURYA et al., 2016). Em cultura de células murinas, infectadas com *L. major*, a leptina aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos (GAINSFORD et al., 1996). Em culturas de células humanas, infectadas com *L. donovani*, a leptina foi capaz de ativar os macrófagos e estimular a capacidade fagocítica, através do aumento da produção de ROS intracelular, o que contribuiu para a eliminação do parasita (DAYAKAR et al., 2016).

As concentrações séricas da adiponectina e da leptina nos hamsters infectados com *L. infantum*, não apresentaram diferença quando comparadas ao grupo controle. Corroborando com esse resultado, camundongos infectados com *L. donovani* também não apresentam alteração nos níveis de leptina (MAURYA et al., 2016). Análise de correlação das adipocinas forneceu dados importantes e inéditos sobre a atuação das adipocinas em modelo experimental de hamster infectado com *L. infantum*. No grupo dos animais infectados, a adiponectina não apresentou correlação com nenhum parâmetro. Contudo, no grupo dos animais controle a adiponectina está correlacionada negativamente com as concentrações de glicose e albumina. A adiponectina tem como principais funções: estimular a oxidação de ácidos graxos, diminuir os níveis de triglicérides plasmáticos e melhorar o metabolismo da glicose, aumentando a sensibilidade à insulina (BEŁTOWSKI, 2003). Assim, esses dados

evidenciam que a adiponectina atua no metabolismo da glicose em hamsters, e que a infecção interfere no papel dessa adipocina.

A leptina é produzida principalmente pelos adipócitos, ela possui papel central na regulação do metabolismo energético (FERNANDES et al., 2007). Ela tem um papel importante na regulação do peso corporal, sendo os seus níveis plasmáticos correlacionados com o índice de massa corpórea em roedores e em humanos obesos (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). A leptina apresentou correlação negativa com o peso relativo do baço no grupo dos animais controle e correlação positiva com as concentrações séricas de triglicérides e VLDL, em ambos os grupos. Adicionalmente, a leptina apresentou correlação positiva com a carga parasitária do baço e com o peso relativo do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Já as concentrações de HDL estão correlacionadas negativamente com os níveis de leptina, em hamster infectados com *L. infantum*.

Um trabalho em modelo experimental de camundongo infectado com *L. donovani*, os animais que recebiam leptina exógena apresentaram menor carga parasitária no baço que os animais não tratados. Além disso, os animais deficientes de leptina, apresentaram maior carga parasitária no baço e no fígado, quando comparados com os animais normais (MAURYA et al., 2016). Esses dados sugerem que há uma associação negativa entres os níveis de leptina e a carga parasitária. No entanto, nossos resultados apontam uma correlação positiva entre a carga parasitária do baço e as concentrações séricas de leptina em hamster com LV, e correlações entre a leptina e os parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo de lipídios. É importante lembrar que a o hamster é um modelo que melhor mimetiza a infecção em humanos, o que não acontece com os camundongos, que apresentam resistência a doença. Assim, nossos resultados sugerem que a leptina tem um papel importante no estabelecimento da LV em hamster. E a relação do tecido adiposo com a infecção precisa ser melhor estudado.

CONCLUSÕES

- Os animais com maior tempo de infecção apresentaram emagrecimento e esplenomegalia, mas mantiveram um bom padrão geral. Foi observado que ambos, baço e fígado, apresentam valor de carga parasitária semelhante tanto no tempo de 4 meses, quanto no tempo de 8 meses após a infecção.
- Não houve diferença na expressão do mRNA das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, no baço dos animais controle e infectados.
- Os hamsters infectados com *L. infantum*, não apresentaram diferença nas concentrações séricas de glicose, albumina, triglicérides, colesterol, HDL, LDL e VLDL, quando comparados aos controles.
- A carga parasitária do baço e do fígado apresenta correlação negativa com os níveis séricos de albumina. A carga parasitária do baço apresentou correlação negativa com os níveis séricos do colesterol total.
- As concentrações séricas de adiponectina e de leptina, o peso relativo do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal e o tamanho dos adipócitos desses tecidos, não foi alterado pela infecção.
- A leptina apresentou correlação negativa com os níveis de HDL dos hamsters infectados e correlação positiva com as concentrações séricas de triglicérides e VLDL, em ambos os grupos.
- A leptina apresentou correlação positiva com a carga parasitária do baço e com o peso relativo do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, dos animais infectados.

Esses resultados sugerem que as adipocinas, em especial a leptina, apresentam importantes correlações com os parâmetros bioquímicos e com a carga parasitária, dos animais infectados com *L. infantum*, e abrem perspectivas interessantes de investigação sobre a relação do tecido adiposo e das adipocinas com parâmetros bioquímicos da leishmaniose visceral experimental.

REFERÊNCIAS:

- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 2993–3002, 1999.
- ALVAREZ-LLAMAS, G. et al. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 6, n. 4, p. 589–600, 2007.
- ANDRADE, B. B. et al. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 2007.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, H. R. R. Parasitism of adipocytes by Trypanosoma Cruzi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 4, p. 521–522, 1995.
- AYE, P. A. U. L. M. K. An in Vivo Analysis of Cytokine Production during Leishmania donovani Infection in scid Mice. **Experimental parasitology**, v. 202, p. 195–202, 1996.
- BADO, A. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, n. 6695, p. 790–793, 1998.
- BAKER, R. et al. Increased plasma levels of adipokines and inflammatory markers in older women with persistent HPV infection. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 282–285, 2011.
- BEKAERT, E. D. et al. Plasma lipoproteins in infantile visceral leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins A-I and A-II. **Clin Chim Acta**, v. 184, n. 2, p. 181–191, 1989.
- BEŁTOWSKI, J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 9, n. 2, p. RA55-A61, 2003.
- BIRSOY, K.; FESTUCCIA, W. T.; LAPLANTE, M. A comparative perspective on lipid storage in animals. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 7, p. 1541–1552, 2013.
- BRASIL- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. BRASIL: 2014, 2014.
- BUYUKOGLAN, H. et al. Leptin levels in various manifestations of pulmonary tuberculosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, 2007.
- CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CARRILLO, E. et al. Protein malnutrition impairs the immune response and

influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON, W. D. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: Reversible immunosuppression during acute infection. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 2, p. 498–502, 1981.

CHANG, K.; CHAUDHURI, G. Molecular Determinants of Leishmania Virulence. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 499–529, 1990.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 5, n. 1740–1534 (Electronic), p. 873–882, 2007.

CHARRIÈRE, G. et al. Preadipocyte conversion to macrophage: Evidence of plasticity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9850–9855, 2003.

CINTI, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 319–328, 2001.

COMBS, T. P. et al. The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24085–24094, 2005.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–141, 2002.

DANTAS-TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi : do not forget the law of priority. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. February, p. 117–118, 2006.

DASGUPTA, S. et al. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis: An evaluation of the role of nitric oxide toward impairment of the lymphoproliferative response. **Parasitology Research**, v. 85, n. 7, p. 594–596, 1999.

DAYAKAR, A. et al. Role of leptin in human visceral leishmaniasis? **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 3, p. 416–418, 2011.

DAYAKAR, A. et al. Leptin induces the phagocytosis and protective immune response in Leishmania donovani infected THP-1 cell line and human PBMCs. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 54–59, 2016.

DEA-AYUELA, M. A. et al. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for In Vivo testing of antileishmanial compounds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 6, p. 703–717, 2007.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DESRUISSEAU, M. S. et al. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 3, p. 1066–1078, 2007.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1 / Th2 differentiation. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 531–536, 2002.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2016.

ENGWERDA, C. R. et al. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 669–680, 1998.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages , pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 11, 2004.

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 14, p. 2565–71, 2001.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911–920, 2005.

FERNANDES, F. et al. Leptin levels in different forms of Chagas' disease. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 40, n. 12, p. 1631–6, 2007.

FERREIRA, A. V. M. et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 12–13, p. 1002–5, 2011.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.

FRÜHBECK, G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. **Methods Mol Biol.**, v. 16, p. 456:1-22, 2008.

GAINSFORD, T. et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. December, p. 14564–8, 1996.

GHOSH, J. et al. Human visceral leishmaniasis: decrease in serum cholesterol as a function of splenic parasite load. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 105, n. 3, p. 267–271, 2011.

GHOSH, S. et al. Metabolic fingerprints of serum, brain, and liver are distinct for mice with cerebral and noncerebral malaria: a ¹H NMR spectroscopy-based metabonomic study. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 10, p. 4992–5004, 5 out. 2012.

GIFAWESEN, C.; FARRELL, J. P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 10, p. 3091–3096, 1989.

GÓMEZ, R. et al. Adipocytokines: emerging mediators of the immune response and inflammation. **Reumatología clínica**, v. 5 Suppl 1, n. 12, p. 6–12, 2009.

GRIMALDI JUNIOR G., T. R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GUENGERICH, F. P. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, p. 827–847, 2001.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. Influence of Parasite Load on the Ability of Type 1 T Cells To Control *Leishmania major* Infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 498–503, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HUH, J. Y. et al. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. **Molecules and cells**, v. 37, n. 5, p. 365–71, 2014.

HUNG, S.-C. et al. Dietary fiber improves lipid homeostasis and modulates adipocytokines in hamsters. **Journal of diabetes**, v. 1, n. 3, p. 194–206, 2009.

KABYEMELA, E. R. et al. Maternal peripheral blood level of IL-10 as a marker for inflammatory placental malaria. **Malaria journal**, v. 7, p. 26, 2008a.

KABYEMELA, E. R. et al. Fetal responses during placental malaria modify the risk of low birth weight. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1527–1534, 2008b.

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

KEICHO, N. et al. Circulating levels of adiponectin, leptin, fetuin-A and retinol-binding protein in patients with tuberculosis: Markers of metabolism and inflammation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 2–9, 2012.

KERN, P. A et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 5, p. 2111–2119, 1995a.

- KERN, P. A et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of clinical investigation**, v. 82, n. 12, p. 4196–4200, 1995b.
- KIM, J. H. et al. Relation of ghrelin, leptin and inflammatory markers to nutritional status in active pulmonary tuberculosis. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 512–518, 2010.
- LA CAVA, A. et al. The weight of leptin in immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 5, p. 371–9, 2004.
- LAISON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595–600, 1978.
- LAL, C. S. et al. Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. **Clinica Chimica Acta**, v. 382, n. 1–2, p. 151–153, 2007.
- LAL, C. S. et al. Total serum cholesterol determination can provide understanding of parasite burden in patients with visceral leishmaniasis infection. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 2112–2113, 2010.
- LAL, C. S. et al. Hypertriglyceridemia: a possible diagnostic marker of disease severity in visceral leishmaniasis. **Infection**, v. 44, n. 1, p. 39–45, 2015.
- LAM, K. I. T. S. et al. Raised Serum Levels Of Tumor Necrosis Factor in Parasitic Infections. **The Lancet**, p. 1364–1365, 1986.
- LIBEROPOULOS, E. et al. Severe hypocholesterolemia with reduced serum Lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 32, n. 3, p. 305–308, 2002.
- LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against Leishmania parasites. **Immunobiology**, v. 213, p. 377–387, 2008.
- LIMA MACIEL, B. L. et al. Association of nutritional status with the response to infection with Leishmania chagasi. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 591–598, 2008.
- LOUIS, J. T-Cell Responses and Immunity to experimental infection With Leishmania Major. **Ann. Rev. Immunol**, v. 7, n. 4, p. 561–578, 1989.
- MANJU C, PILLIPS SA, THEODORE C, H. R. Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2442–2450, 2003.
- MASAKI, T. et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-?? in KK-Ay obese mice. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 177–184, 2004.
- MASUZAKI, H. et al. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature medicine**, v. 3, n. 9, p. 1029–1033, 1997.
- MAURYA, R. et al. Differential Role of Leptin as an Immunomodulator in Controlling

Visceral Leishmaniasis in Normal and Leptin-Deficient Mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 109–119, 2016.

MELBY, P. C. et al. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998a.

MELBY, P. C. et al. Cloning of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in Experimental Visceral Leishmaniasis Cloning of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998b.

MELBY, P. C. et al. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 2001a.

MELBY, P. C. et al. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, 2001b.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. v. 82, n. 12, p. 4196–4200, 1997.

MOREIRA, N. DAS D. et al. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

MOREIRA, N. DAS D. et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 181, 2016.

MURANO, I. et al. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 1, p. 171–178, 2009.

MURANO, I.; ZINGARETTI, C. M.; CINTI, S. The adipose organ of Sv129 mice contains a prevalence of brown adipocytes and shows plasticity after cold exposure. **Adipocytes**, v. 1, n. May, p. 121–130, 2005.

MURRAY, B. H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo : Reactive. **Differences**, v. 189, n. 4, p. 741–746, 1999.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

NAGAJYOTHI, F. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection of Cultured Adipocytes Results in an Inflammatory Phenotype. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 9, p. 1992–1997, 2008.

NAGAJYOTHI, F. et al. NIH Public Access. **J Infect Dis**, v. 202, n. 7, p. 1104–1113,

2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. Response of adipose tissue to early infection with trypanosoma cruzi (Brazil Strain). **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 830–840, 2012.

NIETO, A. et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NIETO, C. G. et al. Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with Leishmania infantum. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 3–4, p. 175–182, 1992.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of Leishmania infantum: Correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 117–130, 1999.

OLIVEIRA, E. et al. Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with Leishmania sp . **Rev. Bras. Parasitol.**, v. 2961, p. 97–102, 2011.

OPAS, O. P.-A. DA S. Informe Epidemiológico das Américas - Leishmaniose. **Opas**, n. 3, p. 3–7, 2015.

OTT, K. J.; HANSON, W. L.; STAUBER, L. A. Course of infection Leishmania donovani in Hamsters inoculated by the Intraperitoneal route. **The Journal of Parasitology**, v. 53, n. 3, p. 641–645, 1967.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PAL, A. et al. Alterations in the immune response of golden hamsters during the course of Leishmania cionovani infection and after treatment with sodium stibogluconate. **Serondiagn. Imumunother. Infect. Disease**, v. 7, p. 115–120, 1995.

PEARSON, R. D. et al. Wasting and Macrophage Production of Tumor-Necrosis-Factor Cachectin and Interleukin-1 in Experimental Visceral Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 6, p. 640–649, 1990.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, p. 1–14, 2016.

PEREZ, L. E. et al. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 9, p. 5519–5528, 2006.

- PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 2, p. 507–514, 2006.
- REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549–1564, 2014.
- REQUENA, J. M. et al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 269–281, 2000.
- RIÇA-CAPELA, M. J. et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology research**, v. 89, n. 3, p. 163–169, 2003.
- RICHARD, J. A.; STEPHENS, J. M. The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function Allison. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1842, n. 3, p. 431–439, 2014.
- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–275, 1990.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 2016.
- SESAB. SUVISA-DIVEP. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DA BAHIA. **Coordenação Técnica - GT Leishmanioses/CODTV**, p. 2014, 2014.
- SIMPSON, L. et al. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p. 6182–6196, 1987.
- SOARES, N. M. et al. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 4, p. 259–266, 2010.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.
- TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263–1271, 1995.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in

fibroblasts by PPAR γ , a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147–1156, 1994.

TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

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.

VAN CREVEL, R. et al. Decreased plasma leptin concentrations in tuberculosis patients are associated with wasting and inflammation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 2, p. 758–763, 2002.

VASCONCELOS, A. W. et al. Potential Role for Interleukin-10 in the Immunosuppression Associated with Kala Azar. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. December, p. 2626–2632, 1993.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WIELAND, C. W. et al. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. **International Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1399–1408, 2005.

WILSON, M. E. et al. Early Histopathology of Experimental Infection with *Leishmania donovani* in Hamsters. **The Journal of Parasitology**, v. 73, n. 1, p. 55–63, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.

YOKOTA, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood Journal**, v. 96, n. 5, p. 1723–1733, 2000.

ZHANG, F. ET AL. et al. **Crystal structure of the obese protein leptin-E100.** **Nature**, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144295>>

ZHANG, Y. et al. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** **Nature**, 1994. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/372425a0>>