

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TESE DE DOUTORADO**

**PAPEL IMUNOREGULADOR DAS DIETAS RICAS EM ÁCIDOS GRAXOS EM  
TECIDOS ADIPOSE E CARDÍACO DE CAMUNDONGOS INFETADOS PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

**Débora Maria Soares de Souza**

**Ouro Preto, MG  
2019**

**Débora Maria Soares de Souza**

**PAPEL IMUNOREGULADOR DAS DIETAS RICAS EM ÁCIDOS GRAXOS EM  
TECIDOS ADIPOSE E CARDÍACO DE CAMUNDONGOS INFETADOS PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

**Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.**

**Área de Concentração: Imunobiologia de protozoários**

**Orientador: Prof. André Talvani**

**Co-orientadores: Prof. Guilherme de Paula Costa**

**Prof. Kelerson M. de Castro Pinto**

**Ouro Preto**

**2019**

S895p

Souza, Débora Maria Soares de.

Papel imunoregulador de dietas ricas em ácidos graxos em tecidos adiposo e cardíaco de camundongos infetados pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Débora Maria Soares de Souza. - 2019.

81f.: il.: color; grafs; tabs..

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Kelerson Mauro de Castro Pinto.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Nutrição. 3. Inflamação. 4. Ácidos graxos  
I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Pinto, Kelerson Mauro de Castro.  
III. Costa, Guilherme de Paula. IV. Universidade Federal de Ouro Preto.  
V. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE DOUTORADO**

Aos 17 dias do mês de outubro do ano de 2019, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda **Debora Maria Soares de Souza**, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Joana Ferreira do Amaral (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira (Membro - Externo), pela Dra. Paula Melo de Abreu Vieira (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 45 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Papel Imunoregulador das Dietas Ricas em Ácidos Graxos em Tecidos Adiposo Cardíaco de Camundongos Infetados Pelo Trypanosoma Cruzi", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Mila Fernandes Moreira Madeira; segundo, Profa. Joana Ferreira do Amaral; terceiro, Profa. Paula Melo de Abreu Vieira; quarto, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara; quinto, Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 17 de outubro de 2019.

Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva

Presidente

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa  
Calsavara

Profa. Dra. Joana Ferreira do  
Amaral

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira  
Madeira

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Doutoranda

## DEDICATÓRIA

*Para minha filha Alice, que me mostra um novo caminho a cada dia.*

## **AGRADECIMENTOS**

Por muitos anos desejei continuar meus estudos para me tornar doutora, porém isso só foi possível devido a rede de apoio que se formou ao meu redor, principalmente após a descoberta da gravidez e a chegada da minha filha Alice.

Sendo assim, preciso agradecer:

ao professor André Talvani, por me receber no laboratório de imunobiologia da inflamação – Labiin - me apoiar, ser amigo e orientar nos diversos momentos da formação como mestre e doutora;

ao professor Kelerson, por aceitar a co-orientação e estar sempre disposto a colaborar;

ao professor Eduardo Bearzoti, por conversar sobre estatística, de uma forma tão didática;

ao Guilherme, também coorientador, mas também grande amigo, por compartilhar conhecimentos sobre parasitos, resposta imune, cervejas e assuntos aleatórios não comprovados cientificamente;

à Sílvia, por ter sido por 2 anos minha aluna de iniciação científica, ter me ajudado tanto no processo experimental;

à Ayla, Júlia e Sílvia, o trio mais improvável da UFOP, pelos momentos de descontração, desabafo e cuidados com a Alice;

aos amigos e colegas do labiin (Daniela, Ana Luísa, Washington, Luíza, Ana Menezes e Aline), de outros laboratórios (Sttefany e Eleonora), equipe de limpeza e portaria, que tornaram os dias de trabalho mais agradáveis;

aos que se preocuparam com o bem-estar da Alice e colaboraram para que eu pudesse concluir o doutorado;

a todos os pesquisadores que abriram as portas dos laboratórios para a execução do trabalho (João Santana Silva, Maria Cláudia da Silva, Daniela Caldeira Costa, Karine Pádua, Paula Mello e Nívea Carolina Nogueira) muito obrigada pelo conhecimento e recursos compartilhados;

aos meus pais Valter e Aparecida e irmãos, cunhados e sobrinha pelo apoio, amor e cuidado constante;

ao meu marido Bruno, por não ter deixado que eu desistisse nos momentos mais sombrios, me incentivar a ver a vida por outro ângulo, ser amigo, companheiro e um pai maravilhoso; e

à minha filha Alice, por ter chegado e ressignificado minha vida.

## RESUMO

A resposta imune do indivíduo infectado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é determinante para o curso clínico da doença cardíaca, sendo este quadro dependente de proteínas inflamatórias. Fatores exógenos, como a composição das dietas, têm se mostrado importantes na regulação/intensificação deste estado inflamatório do hospedeiro, principalmente relacionados às dietas ricas em ácidos graxos. Na presente proposta, camundongos C57BL/6 foram infectados, ou não, com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos a diferentes fontes de ácidos graxos: saturados (dieta com banha de porco - BP) e monoinsaturados (dieta com azeite de oliva - AO), sendo a resposta inflamatória sistêmica e cardíaca avaliadas na fase inicial (30 dias) e na fase crônica recente (100 dias) da infecção. Após a eutanásia dos animais, o sangue, coração, fígado, baço e tecido adiposo epididimal foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (CCL-2 e IL-10), para avaliação de marcadores de processos redox (catalase, superóxido dismutase, glutatona total, reduzida e oxidada, proteína carbonilada) e para quantificação relativa do RNA em tempo real - qPCR (*Foxp3*, *Irak-1*, *Smad's -2* e *-3*, *Ppar's -alfa* e *-gama*, *Stat-6*, *TLR -2*, *-4*, *-9*, além do parasitismo tecidual). Os resultados mostram que a “natureza lipídica” das dietas e a infecção alteram a massa do baço, do fígado e do tecido adiposo epididimal, mas não do coração. As dietas BP e AO favoreceram a permanência do parasito no tecido cardíaco, a inflamação no tecido adiposo e o aumento de gordura no fígado, principalmente aos 100 dias de infecção. Ambas as dietas induziram aumento de catalase e redução de superóxido dismutase nos órgãos avaliados, sendo a dieta AO responsável pela elevação das proteínas carboniladas, em associação ao *T. cruzi*, na fase aguda e a dieta BP mostrou esta ação na fase crônica recente. Além disso, a dieta AO, nas fases aguda e crônica recente da infecção, mostrou-se associada ao aumento de TLR-2, -4, -9, Irak-1, Ppar, Stat6 e Smads e Foxp3 no tecido cardíaco, enquanto a dieta BP induziu este perfil no tecido adiposo. Nossos resultados sugerem que o processo inflamatório induzido pelo *T. cruzi* é, em parte, dependente da fonte lipídica da dieta, o que sustenta a hipótese de uma relação direta entre a natureza das dietas lipídicas e o quadro imunopatológico induzido pelo *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Inflamação, *Trypanosoma cruzi*, ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados, tecido adiposo, tecido cardíaco.

## ABSTRACT

The host immune response against *Trypanosoma cruzi* is a determinant key for the cardiac clinical course and it appears to be dependent on the inflammatory mediators. Exogenous factors, such as diet composition, have been pointed to regulate immune response and, in this context, high fat diets have received highlight. In the present study, C57BL/6 mice were infected with the Colombian strain of the *T. cruzi* and submitted to different sources of fatty acids: saturated (diet with lard - DL); and monounsaturated (diet with olive oil - DOO). Systemic and cardiac inflammatory responses were studied during initial phase (30 days) and recent chronic phase (100 days) of the infection. After euthanasia of the animals, blood, heart, liver, spleen and epididymal adipose tissue were collected for immunoenzymatic assays (CCL-2 and IL-10), to evaluation of redox process markers (catalase, superoxide dismutase, total glutathione, reduced and oxidized, and carbonylated protein) and to the RNA quantification - qPCR (*Foxp3*, *Irak-1*, *Smad's -2 and -3*, *Ppar's -alpha and gamma*, *Stat-6*, *TLR -2, -4, -9*, and parasitism). The results show that the "lipid nature" of diets and the parasite increase the mass of the spleen, liver and epididymal fat, but not the heart. The diets DL and DOO favored the permanence of the parasite in the cardiac tissue, the inflammation in the adipose tissue and caused an increase of fat in the liver, especially at 100 days of infection. Both diets induced catalase increase and superoxide dismutase reduction in the evaluated organs. The DOO was related to the increase of the carbonylated proteins in association with the parasite in the acute phase while the DL diet showed this pattern in the recent chronic phase. In addition, the DOO during acute and chronic phases of infection was responsible for the increase of *TLR-2, -4, -9, Irak-1, Ppar, Stat-6, Smads* and *Foxp3* in the cardiac tissue, while DL induced this same profile in the adipose tissue. Our results suggest that the *T. cruzi*-induced inflammatory process is partly dependent on the dietary lipid source, which supports the hypothesis of a direct relationship between the nature of lipid diets and the *parasite*-induced immunopathology.

Keywords: Inflammation, *Trypanosoma cruzi*, saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, adipose tissue, cardiac tissue.



## LISTA DE ABREVIACES

- AA – cido araquidônico  
ABS - Absorbncia  
AIN93M - American Institute of Nutrition Rodent Diets  
ALA - cido alfa-linolnico  
BHT - Hidroxitolueno butilado  
CAT - Catalase  
CEUA - Comit de Ética em Pesquisa com Animais  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal  
COX - Ciclooxigenase  
DHA - cido docosaexaenoico  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DTU - *Discrete Typing Units*  
EPA - cido eicosapentaenoico  
ERO - Espécie reativa de oxigênio  
GPx - Glutaciona  
GSH – Glutaciona reduzida  
GSSH – Glutaciona oxidada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HE – Hematoxilina/ eosina  
IFN- – Interferon gama  
IL-1 – Interleucina-1 beta  
IL-6 – Interleucina-6  
IL-8 – Interleucina-8  
LDL - *Low Density Lipoproteins*  
LDLr – Receptor de LDL  
LDL-oxi -LDL oxidada  
LPS - Lipopolissacarídeos  
MUFA – Gordura monoinsaturada  
NO – xido nítrico  
NRs – Receptores nucleares  
PCR – Reação em cadeia polimerase

PPARs - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PPAR- $\alpha$  - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa

PPAR- $\gamma$  - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama

PUFA – Gorduras poli-insaturadas

R-SMAD – Receptor de proteínas mãe homólogas de ação contra complexo decapentaplégico

SMAD - Proteínas mãe homólogas de ação contra complexo decapentaplégico

SOD – Superóxido dismutase

STAT - Moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição

STAT-4 - Moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição -4

STAT-6 - Moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição- 6

TGF- $\beta$  – Fator transformador de crescimento beta

TNF – Fator de necrose tumoral

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento do estudo.....	23
Figura 2. Distribuição dos animais nos grupos.....	24
Figura 3. Curva de massa corporal de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> em fases aguda e crônica. .....	39
Figura 4. Curva de parasitemia dos camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.....	43
Figura 5. Dados de sobrevivência dos camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos..	44
Figura 6. Parasitismo no tecido cardíaco dos camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos..	45
Figura 7. Parasitismo tecido adiposo dos camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. ....	45
Figura 8. Percentual de gordura no fígado dos camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos..	46
Figura 9. Fotomicrografias de cortes histológicos de coração de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e submetidos à dieta banha de porco e azeite de oliva aos 30 e 100 dias de infecção. ....	47
Figura 10. Análise qualitativa da histologia do tecido cardíaco.....	48
Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e submetidos à banha de porco e azeite de oliva aos 30 e 100 dias de infecção..	48
Figura 12. Análise qualitativa da histologia do tecido adiposo. ....	49
Figura 13. Dosagem de marcadores de status redox..	51
Figura 14. Produção de CCl-2 no tecido cardíaco. ....	52
Figura 15. Produção de CCl-2 no tecido adiposo.....	53
Figura 16. Produção de IL-10 no tecido cardíaco. ....	53
Figura 17. Produção de IL-10 no tecido adiposo. ....	54
Figura 18. Expressão de receptores do tipo <i>Toll</i> no tecido cardíaco. ....	55
Figura 19. Expressão de receptores do tipo <i>Toll</i> no tecido adiposo. ....	57
Figura 20. Expressão de <i>Foxp3</i> no tecido cardíaco. ....	58
Figura 21. Expressão de <i>Foxp3</i> no tecido adiposo.....	59
Figura 22. Expressão de <i>Irak-1</i> no tecido cardíaco. ....	60
Figura 23. Expressão de <i>Irak-1</i> no tecido adiposo. ....	60
Figura 24. Expressão dos Ppar's alfa e gama no tecido cardíaco.....	62
Figura 25. Expressão dos Ppar's alfa e gama no tecido adiposo.....	63
Figura 26. Expressão das Smad's 2 e 3 no tecido cardíaco.....	64
Figura 27. Expressão das Smad's 2 e 3 no tecido adiposo.....	65
Figura 28. Expressão de Stat-6 no tecido cardíaco.....	66
Figura 29. Expressão de Stat-6 no tecido adiposo.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas (1000g).....	25
Tabela 2. Diluição das amostras para dosagem de superóxido dismutase .....	29
Tabela 3. Distribuição de reagentes para dosagem de glutaciona total.....	30
Tabela 4. Concentrações para curva de calibração da glutaciona total.....	30
Tabela 5. Distribuição de reagentes para dosagem de glutaciona oxidada. ....	31
Tabela 6. Distribuição dos reagentes na placa de 96 poços para dosagem de glutaciona oxidada. ....	31
Tabela 7. Concentrações para curva de calibração da glutaciona oxidada. ....	32
Tabela 8. Sequência de primers baseadas nas sequências de nucleotídeos da Gen Bank Database.....	36
Tabela 9. Medidas de comprimento naso-anal dos animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.. ....	40
Tabela 10. Massa do coração de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. i.....	40
Tabela 11. Massa do baço em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. ....	41
Tabela 12. Massa hepática em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.....	42
Tabela 13. Massa do tecido adiposo epididimal em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.). ....	42
Tabela 14. Dados parasitológicos de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos . ....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1. <i>A infecção pelo Trypanosoma cruzi e mecanismos de resposta imune</i>	13
1.2. <i>Consumo alimentar e metabolismo de lipídeos frente à infecção pelo T. cruzi</i>	17
1.3. <i>Resposta antioxidante, homeostase tecidual e infecção pelo T. cruzi</i>	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	22
3.1. <i>Objetivo geral</i>	22
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	22
<b>4. METODOLOGIA</b>	23
4.1. <i>Cuidados éticos</i>	23
4.2. <i>Delineamento do estudo</i>	23
4.3. <i>Animais</i>	24
4.4. <i>Dietas e controle do peso</i>	25
4.5. <i>Infecção e parasitemia</i>	26
4.6. <i>Eutanásia dos animais</i>	26
4.7. <i>Dosagem de lipídeos totais hepáticos</i>	26
4.8. <i>Histologia</i>	27
4.7.1 <i>Histologia convencional:</i>	27
4.9. <i>Biomarcadores de processos redox</i>	28
4.9.1. <i>Proteínas totais</i>	28
4.9.2. <i>Catalase</i>	28
4.9.3. <i>Superóxido dismutase</i>	29
4.9.4. <i>Glutationa total</i>	30
4.9.5. <i>Glutationa oxidada (GSSG)</i>	31
4.9.6. <i>Proteína carbonilada</i>	32
4.10. <i>Ensaio imunoenzimático</i>	33
4.11. <i>Reações de PCR em tempo real</i>	34
4.11.1. <i>Extração de DNA genômico total e reação de PCR</i>	34
4.11.2. <i>Extração de RNA e quantificação de mensagem por PCR em tempo real</i>	34
4.12. <i>Análise estatística</i>	38
<b>5. RESULTADOS</b>	39
5.1. <i>Influência da composição das dietas nos dados biométricos dos animais:</i>	39
5.2. <i>Influência da composição das dietas na mortalidade e replicação de parasitos</i>	43
5.3. <i>Interferência da composição das dietas ricas em ácido graxo nos tecidos hepático, cardíaco e adiposo de animais infectados pelo T. cruzi.</i>	45
5.3.1. <i>Interferência da dieta no acúmulo de lipídios no fígado</i>	46

5.3.2.	Interferência da dieta no infiltrado inflamatório nos tecidos cardíaco e adiposo	46
5.4.	<i>Interferência da dieta no status redox durante a infecção pelo T. cruzi</i>	49
5.5.	<i>Interferência da dieta hiperlipídica na produção de CCL2 e IL-10 frente à infecção pelo Trypanosoma cruzi os tecidos adiposo e cardíaco</i>	52
5.5.1.	<i>Produção de CCL-2</i>	52
5.5.2.	<i>Produção de IL-10</i>	53
5.6.	<i>Ação da dieta rica em ácidos graxos na expressão de genes envolvidos nas vias inflamatórias intracelulares</i>	54
5.6.1.	Receptores do tipo <i>Toll</i> 2, 4 e 9	54
5.6.2.	Expressão de <i>Foxp3</i>	58
5.6.4.	Expressão de <i>Ppar-alfa</i> e <i>Ppar-gama</i>	61
5.6.5.	Expressão das <i>Smads</i> 2 e 3	63
5.6.6.	Expressão da <i>Stat-6</i>	65
6.	<b>DISCUSSÃO</b>	67
7.	<b>CONCLUSÃO</b>	73
8.	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e mecanismos de resposta imune

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário conhecido por ser o agente etiológico da doença de Chagas e por ocasionar intensa resposta inflamatória em tecidos de hospedeiro mamífero infectados. Desde a descoberta e descrição clínica da doença, por Carlos Chagas em 1909, as características do parasita (tropismo tecidual, morfologia, virulência e patogenicidade) estiveram relacionadas às formas clínicas da referida doença (Brenner 1973).

Durante anos, pesquisadores trabalharam na caracterização das populações do *T. cruzi*, para agrupamento, respeitando as características fenotípicas, moleculares e genéticas. Dessa forma, estas populações foram agrupadas nas unidades de tipagem (*Discrete Typing Units – DTU*) TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Zingales et al. 2012). Dentre as seis DTUs, a TcI e TcII são consideradas mais abrangentes, sendo a TcI mais prevalente na América Central e na região norte do Brasil e a TcII encontrada predominantemente na América do Sul (Zingales et al. 2009). De modo geral, as infecções com o *T. cruzi* (TcI) e (TcII) estão relacionadas com casos de cardiomiopatia chagásica crônica, sendo o TcI resistente e o TcII parcialmente susceptível ao único fármaco disponível no Brasil para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol (Zingales et al. 2012).

Além da resistência ao fármaco de tratamento, o controle da resposta inflamatória parece ser decisivo no prognóstico clínico da doença cardíaca gerada pela infecção com este parasito, pois uma vez ausente ou controlada, propiciaria replicação excessiva do *T. cruzi* durante a fase aguda. Por outro lado, a ausência de mecanismos de controle da inflamação, associado a características biológicas intrínsecas de algumas populações do parasito, pode causar maior ou menor dano tecidual e até mesmo a morte do hospedeiro mamífero (Teixeira, Gazzinelli, and Silva 2002). As principais alterações consequentes à infecção e à inflamação estão relacionadas ao dano às células cardíacas, porém o indivíduo acometido pode apresentar também alterações nos sistemas nervoso e digestório (Rocha, Teixeira, and Ribeiro 2007).

Todo o processo que leva ao desenvolvimento da doença e, consequente à infecção pelo *T. cruzi*, ocorre após estimulação das vias de sinalização intracelular do hospedeiro por intermédio das proteínas de superfície celular do parasito (ex. glicofosfatidilinositol). Para melhor compreensão da evolução da patologia gerada pelo *T. cruzi*, a infecção é dividida em fase aguda e fase crônica. Durante a fase aguda da infecção, há intensa replicação dos parasitos

nas células do hospedeiro culminando na produção de inúmeros mediadores inflamatórios para o controle parasitário (Dutra et al. 2014b). Neste momento há estímulos para a produção de citocinas como o IFN-gama (IFN- $\gamma$ ), o Fator de Necrose Tumoral (TNF), a Interleucina-12 (IL-12) e as quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-5, dentre outras, responsáveis pelo recrutamento leucocitário para o sítio inflamatório, além de componentes lipídicos como o fator ativador de plaquetas (PAF) e o Leucotrieno B4 (LTB4) (Teixeira, Gazzinelli, and Silva 2002; Talvani and Teixeira 2011) que, de forma individual ou integrada, ativam e recrutam leucócitos para o sítio inflamatório e promovem a liberação de moléculas capazes de eliminar e/ou controlar o parasito.

Neste momento da infecção, a maioria dos indivíduos são assintomáticos ou apresentam sintomas brandos da doença que podem ser confundidos com outras patologias, porém, ocorre, em alguns casos, sinais denominados de “porta de entrada”, como: o sinal de Romanã, evidenciado pela entrada de parasitos na conjuntiva ocular (Romanã 1935) e o chagoma de inoculação que se desenvolve semanas após a picada inicial do triatomíneo, caracterizado por um inchaço endurecido e avermelhado no local da inoculação (Hemmige, Tanowitz, and Sethi 2012). Em raros casos, pode ainda ocorrer erupção cutânea, alterações da função hepática, miocardite aguda, derrame pericárdico, insuficiência cardíaca aguda e/ou meningoencefalite, particularmente em crianças e imunodeprimidos (Tanowitz et al. 2015).

Por outro lado, em paralelo ocorre também a produção de proteínas apresentando um caráter regulatório, a exemplo da IL-10, da IL-22 e do Fator Transformador de Crescimento-beta (TGF- $\beta$ ), que possuem um papel importante no curso da infecção (Dutra et al. 2014b; Sousa et al. 2014).

Já, durante a fase crônica da infecção, o hospedeiro pode apresentar ausência de sintomas com elevada atividade de células regulatórias, com expressão de FOXP3 e alta produção de IL-10, sendo caracterizado como forma indeterminada (Dutra et al. 2014a; FIOCRUZ 2011). Porém, o indivíduo crônico também pode evoluir para as formas cardíacas, digestiva ou mista, sendo a forma cardíaca a mais relevante e determinante para a gravidade do prognóstico clínico do indivíduo (Andrade, Gollob, and Dutra 2014). Neste momento, ocorre alta atividade de mediadores pró-inflamatórios, quadros de necrose e fibrose teciduais e, maior morbidade e mortalidade dos indivíduos (Medeiros, Gomes, and Correa-Oliveira 2017).

Apesar de não haver intensa replicação parasitária na fase crônica da doença, o parasito encontra-se presente, principalmente, nas formas amastigotas em células musculares. Tal presença, quando presente no coração, pode levar à destruição de cardiomiócitos e feixes



nervosos com consequente perda da motilidade do músculo cardíaco e prejuízo indireto a outros órgãos como pulmões e encéfalo (Andrade and Andrade 1979).

Portanto, fica evidenciado que o sistema imune do hospedeiro age no controle do parasito desde o momento em que ocorre o contato com o hospedeiro mamífero. Um dos mecanismos iniciais relacionados a este controle é centrado nos receptores do tipo *Toll* (TLR), presentes nas células mononucleares e que reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos - PAMPS (Campos and Gazzinelli 2004). Estes receptores do tipo *Toll* são glicoproteínas transmembrana caracterizados por uma repetição extracelular rica em leucina (LPRs) e um domínio de sinalização de receptor *Toll/IL-1* (Zhu and Mohan 2010). Existem cerca de 10 TLR descritos para seres humanos e 12 para camundongos, dentre eles, os TLR2, 4 e 9 encontram-se relacionados à resposta inflamatória induzida pelo *T. cruzi*. Estes TLR estão relacionados à ativação de macrófagos na imunidade inata, à resistência do hospedeiro e ao controle da parasitemia (TLR-2), além de participarem do processo de produção de quimiocinas (TLR-4) e da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por meio do estímulo da via NF- $\kappa$ B (TLR-9) (Zhu and Mohan 2010; Talvani and Teixeira 2011; Gravina et al. 2013).

Após a ativação dos TLR por moléculas do *T. cruzi*, há a ativação da via de sinalização MyD88 e IRAK 1 e 4, estruturas-chave na transcrição de genes como IL-6, IL-8, IL-12 e TNF, cujos produtos atuam contra as infecções por protozoários (Zhu and Mohan 2010). Em contrapartida, é necessária também a ação de moléculas que atuem, paralelamente, no controle desta cascata inflamatória. Moléculas como a IRAK-M são reguladoras que inibem a dissociação das IRAKs pela ação da Myd88 inibindo, assim, a cascata de sinalização pró inflamatória e atuando na manutenção da homeostase do sistema imune (Zhou et al. 2013). Dentre as formas das IRAK's, é importante destacar que a IRAK-1 tem recebido destaque pelos efeitos celulares provocados pela ativação do TLR4 induzido por lipopolissacarídeos (LPS), com possível supressão de enzimas antioxidantes tais como glutathione peroxidase e catalase em macrófagos (Singh and Li 2012).

Para que os sinais desencadeados pelas moléculas de superfície atinjam o núcleo celular, são necessários outros componentes intracelulares para intermediar este processo sinalizador, a exemplo dos receptores nucleares (NRs). Dentre os NRs, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) merecem destaque por sua ativação pelos ácidos graxos e derivados, criando uma rede de sinalização entre a superfície da célula e o seu núcleo (Wahli and Michalik 2012).

Os PPARs formam uma família de moléculas que tem como função primária regular a resposta imune, porém existem outros isotipos, com estruturas homólogas, e apresentando vias e funções diferentes (Hovsepian et al. 2012). O PPAR- $\alpha$  está envolvido no metabolismo da acetilcolina, neurotransmissão e na proteção ao estresse oxidativo. Esta isoforma também regula o metabolismo lipídico e a homeostase energética através do estímulo da quebra de ácidos graxos em colesterol por intermédio da gliconeogênese e da redução dos níveis de triglicerídeos (Bright et al. 2008; Haluzik and Haluzik 2006). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o PPAR- $\alpha$  inibe a secreção de IL-6 de maneira dose dependente através da inibição da atividade transcricional do NF- $\kappa$ B (Nagajyothi, Desruisseaux, Jelicks, et al. 2009). Por outro lado, o PPAR- $\gamma$  atua como regulador da diferenciação de adipócitos, melhorando os parâmetros de insulina e glicose e aumentando a sensibilidade à insulina (Janani and Kumari 2015; Bright et al. 2008; Hovsepian et al. 2012; Marion-Letellier, Savoye, and Ghosh 2016). Ele também atua na redução da inflamação e no número de linfócitos e neutrófilos circulantes e, juntos, induzem a ativação de macrófagos do tipo Th2 (Nagajyothi, Desruisseaux, Jelicks, et al. 2009). Esta ativação/polarização tem sido associada a estudos envolvendo desordens metabólicas e infecções pelo *T. cruzi*. Em experimento com infecção este protozoário, Penas e colaboradores (Penas et al. 2015) mostraram que tanto o Ppar- $\gamma$  quanto o Ppar- $\alpha$  induziram menores expressões de espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias, assim como o aumento e marcadores anti-inflamatórios, como o TGF- $\beta$ , sendo então a modulação da resposta inflamatória pelos Ppar's facilitada pela mudança no perfil dos macrófagos.

A família das proteínas mãe homólogas de ação contra complexo decapentaplégico (SMADs), cuja abreviatura refere-se às homologias para a família de genes SMA de *Caenorhabditis elegans* ("*Small*") e *Drosophila* MAD ("*Mothers Against Decapentaplegic*"), é outro exemplo de moléculas mensageiras (Akhurst and Hata 2012). As SMADS são os principais intermediários de sinalização do fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) e podem ser divididas em três subgrupos distintos: Smads regulados pelos receptores (R-Smads) 1, 2, 3, 5 e 8, Smad4 comum e Smads inibitórias 6 e 7. A sinalização do TGF- $\beta$ , utilizando a via de Smad, envolve interações de fosforilação, ubiquitinação e acetilação de quinases ativadas por mitógenos e PI3K (Zhang et al. 2015). Ressalta-se que o TGF- $\beta$  controla diferentes processos biológicos tais como a transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular, a diferenciação, morte, adesão e progressão de células oncogênicas, entre outros efeitos (Macias, Martin-Malpartida, and Massagué 2015; Akhurst and Hata 2012; Hata and Chen 2016). Além disso, o TGF- $\beta$  também possui atividade supressora de crescimento de precursores da maioria

de células do sistema imune, particularmente células T e células B, através da supressão da proliferação de células T e indução de apoptose de células B (Akhurst and Hata 2012).

## 1.2. Consumo alimentar e metabolismo de lipídeos frente à infecção pelo *T. cruzi*

Desde a década de 1990, têm-se discutido que o estado nutricional e a qualidade da dieta ingerida pelo hospedeiro infectado com o *T. cruzi* parecem atuar na regulação do curso da infecção (Cunningham-Rundles 1993). Estudos mais recentes mostraram que os ácidos graxos de cadeia longa favorecem o aumento do tecido adiposo que, por sua vez, atuam na resposta inflamatória estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Velloso 2009; Zeyda and Stulnig 2009). Dessa forma, a produção exacerbada destes mediadores intensificaria a resposta inflamatória no hospedeiro ocasionando maiores danos, principalmente, ao sistema cardiovascular.

Existem moléculas de sinalização intracelular que podem ser associadas ao dano cardiovascular, induzidas tanto pelo consumo alimentar quanto pela infecção pelo *T. cruzi*, independentemente, a exemplo das moléculas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs). Neste sentido, em uma situação de resposta do tipo Th1, a STAT4 possui íntima relação com a formação de placas aterogênicas nos médios e grandes vasos sanguíneos, devido à relação com a produção elevada de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Dobrian et al. 2015). Além disso, a STAT4 é expressa em adipócitos e células do sistema imune como macrófagos e contribui para a inflamação do tecido adiposo e para a resistência à insulina na obesidade (Taghavi-Moghadam et al. 2015). Já numa situação de resposta do tipo Th2, a STAT6 possui papel regulador do metabolismo de lipídeos inibindo adipogênese e ativando a lipólise (Shea-Donohue, Qin, and Smith 2017). Estudos sugerem que as células T do tipo 1 são necessárias para o desenvolvimento do controle imune ao *T. cruzi*, mas que as células T do tipo 2 contribuem para a persistência do parasito e aumento da gravidade da doença (Tarleton, Grusby, and Zhang 2000).

Por outro lado, alguns estudos mostraram que a manutenção do estado inflamatório pelo tecido adiposo pode também fornecer um ambiente favorável para a replicação do *T. cruzi* (Tanowitz et al. 2017; Nagajyothi, Desruisseaux, Weiss, Chua, Albanese, Machado, Esper, Lisanti, Teixeira, and Scherer 2009; Miao and Ndao 2014). Neste sentido, níveis elevados de TNF, TGF- $\beta$  e IL1- $\beta$  levam a um aumento na transcrição de receptores de LDL (LDLr), molécula fundamental ao metabolismo do colesterol e ao processo de invasão celular pelo parasito (Miao and Ndao 2014; Ruan et al. 1998). Além disso, a dieta e o estado nutricional de

um indivíduo interferem em sua adiposidade corporal sendo o tecido adiposo resultante, um potencial reservatório do parasito e fonte de reativação da infecção, em casos de imunossupressão (Nagajyothi, Desruisseaux, Jelicks, et al. 2009).

Em particular, no âmbito da dieta rica em ácidos graxos, ela pode disponibilizar três tipos de ácidos graxos: (i) saturados, (ii) monoinsaturados (MUFA) e (iii) poli-insaturados (PUFA) (Svahn et al. 2016). Os ácidos graxos saturados e insaturados são componentes essenciais das membranas celulares e desempenham inúmeras funções estruturais e metabólicas (Park et al. 2016; Svahn et al. 2016). Os principais ácidos graxos saturados são conhecidos como ácido láurico (12:0), ácido palmítico (16:0), e ácido esteárico (18:0); os ácidos graxos monoinsaturados são representados principalmente pelo ácido oleico (18:1, n-9); e por fim, os ácidos graxos poli-insaturados são representados pelos ácidos linoleico (18:2, n-6/ ômega-6) e alfa-linolênico (18:3, n-3/ ômega-3) (Vasconcelos Costa, Bressan, and Sabarense 2006). Os PUFA de ômega-3, são compostos por ácidos alfa-linolênicos (ALA) presente em plantas, ácidos eicosapentaenoicos (EPA) e ácidos docosaexaenoicos (DHA) presentes principalmente em peixes e mariscos. Os PUFA de ômega-6 são compostos principalmente pelo ácido araquidônico (AA) e pelo ácido linoleico (AL), que são encontrados em alguns vegetais e em óleos vegetais. Suas principais fontes naturais são óleos de abacate, oliva, palma e uva (Asif 2011; Sundram et al. 2016).

Os ômega-3 e ômega-6 atuam desde a produção de mediadores lipídicos de processos como ativação celular, metabolismo, migração, proliferação, morte celular e são capazes de induzir ou inibir a produção de TNF e de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados com o *T. cruzi* (Talvani et al. 2002; Bozza et al. 2011).

A partir destes ácidos graxos, os eicosanoides são produzidos e subdivididos em três classes: os prostanóides, os leucotrienos e as lipoxinas (Bozza et al. 2011). Os prostanóides são sintetizados pela via da ciclooxigenase (COX), por intermédio da cascata do ácido araquidônico e são compostos pelas prostaglandinas, que atuam na mediação do processo inflamatório, pelas prostaciclinas, potente vasodilatadores e inibidores de agregação plaquetária e pelos tromboxanos, que atuam na vasoconstrição (González-Pérez and Clària 2010; Machado et al. 2011).

Já os leucotrienos são sintetizados pela via da lipooxigenase-5, também derivados da cascata do ácido araquidônico. Estes são predominantemente produzidos por células inflamatórias, incluindo leucócitos, macrófagos e mastócitos (Freire and Van Dyke 2013). Inclusive, os leucotrienos já foram descritos na infecção pelo *T. cruzi* em associação com o

aumento da parasitemia e a menor sobrevivência de camundongos (Talvani and Teixeira 2011). Já as lipoxinas podem ser sintetizadas pela ação coordenada da lipoxigenase-5 conjuntamente com as lipoxigenases-12 e 15, à partir da cascata do ácido araquidônico e atuam na regulação da resposta inflamatória (Freire and Van Dyke 2013; Capra et al. 2015).

Além do ácido araquidônico, ácidos graxos essenciais derivados do ômega-3, como o ácido eicosapentanoico (EPA; 20: 5, n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6, n-3), são metabolizados por lipoxigenases para produzir mediadores lipídicos pró-resolutivos denominados resolvinas. Estas reduzem a transmigração de neutrófilos, bem como a inflamação, ativando o processo de resolução da inflamação (Capra et al. 2015). Em estudo com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), as resolvinas RvD1 desencadeadas pela ação da aspirina (AT-RvD1) mostraram ação na diminuição do percentual de células necróticas, dado que demonstra que a AT-RvD1 modula a resposta imune em pacientes com doença de Chagas, apresentando promissora atividade em minimizar os danos cardíacos (Ogata et al. 2016). Por outro lado, foi descoberto recentemente que o *T. cruzi* também é capaz de sintetizar mediadores pró-resolvinas, além de eicosanóides pró-inflamatórios como o tromboxano A<sub>2</sub> e, a partir disso, modular o microambiente para sua própria sobrevivência (Colas et al. 2018).

Por fim, o ômega-9 também é outro importante componente das membranas plasmáticas em mamíferos e em trypanosomatídeos (Previato et al. 2004). O *T. cruzi* possui a capacidade de converter o ácido oleico disponível no ambiente, em linoleico através da ação da enzima oleato desnaturase (Maldonado et al. 2006), fato que favorece a manutenção do parasito, a partir da transformação de um ambiente inflamatório menos hostil em seu hospedeiro.

### 1.3. Resposta antioxidante, homeostase tecidual e infecção pelo *T. cruzi*

Outro ponto importante na tentativa de o organismo manter sua homeostase tecidual envolve moléculas/enzimas responsáveis pelo controle do estresse oxidativo. Estas moléculas/enzimas respondem tanto a fatores relativos a agentes infecciosos quanto a fatores relativos à dieta e à composição corporal do indivíduo (Wonisch et al. 2012; Tieghi et al. 2017; Griffiths et al. 2016).

Com relação aos antioxidantes produzidos pelas células de mamíferos, eles podem ser intra- ou extracelulares, dentre eles, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GPx), que constituem parte importante do sistema de defesa. Por outro lado, os fornecidos pela dieta são as vitaminas, os minerais e os compostos fenólicos (Barbosa et al.

2010). O equilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio é crucial para a manutenção da homeostase do organismo. Outra causa de estresse oxidativo se dá quando as defesas antioxidantes estão insuficientes, ou seja, quando o organismo apresenta baixas quantidades de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Zimmermann and Kirsten 2016).

Em relação à SOD, existem três tipos diferentes, uma mitocondrial, uma intracelular e uma extracelular, que possuem propriedades diferentes, porém catalisam a mesma reação. A superóxido dismutase presente no citosol da célula possui  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  como centro redox, ao passo que a SOD mitocondrial contém  $\text{Mn}^{2+}$ . É válido ressaltar que a atividade da SOD presente no citosol não é alterada pelo estresse oxidativo, enquanto a SOD presente na mitocôndria tem sua atividade aumentada com o estresse oxidativo (Barreiros, David, and David 2006).

Nos mamíferos, a catalase é encontrada, principalmente, no fígado e nos eritrócitos, especialmente no meio intracelular (Deisseroth and Dounce 1970). Podem acontecer alterações na atividade desta enzima devido às disfunções metabólicas como as descritas para a diabetes mellitus, na resistência à insulina, na hipertensão, nas dislipidemias, bem como na atividade física, na senescência e nas variações sazonais (Kodydková et al. 2014).

A glutathione é, também um antioxidante produzido pelo corpo, que tem como função degradar o peróxido de hidrogênio das células, atrelando sua redução à oxidação da glutathione reduzida (GSH), permitindo a ela neutralizar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Soares et al. 2015). Esta pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto na mitocôndria das células, sendo que as duas formas existentes dessa enzima são dependentes de selênio, componente essencial na atividade enzimática. A função da glutathione, por sua vez, está relacionada à manutenção do ciclo redox, no qual deve ocorrer um equilíbrio entre a relação de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) (Galvao et al. 2014; Barbosa et al. 2010). A glutathione age sobre o endotélio vascular contra a peroxidação lipídica (reduzindo peróxidos lipídicos a lipídios alcoólicos) e contra o estresse oxidativo, sendo de grande importância para a sobrevivência da célula, podendo atuar na prevenção da aterosclerose (Soares et al. 2015; Zimmermann and Kirsten 2016).

A ação destas moléculas acontece simultaneamente para manter a homeostase tecidual. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Barreiros, David, and David 2006), enquanto a catalase e a glutathione peroxidase, de formas distintas, convertem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio (Callaghan et al. 2013; Vávrová et al. 2013).

Além das enzimas citadas acima, tem sido amplamente estudada a proteína carbonilada. No estresse oxidativo, ocorre o fracionamento das proteínas plasmáticas e a oxidação de seus

aminoácidos, tendo como produto desta reação, compostos carbonilados. As proteínas carboniladas atuam na regulação do sistema endócrino, nas respostas inflamatórias, transporte molecular, manutenção homeostática do volume sanguíneo, entre outras funções (Griffiths et al. 2014).

A carbonilação de proteínas é um biomarcador importante que mostra os danos celulares causados pelas várias formas de espécies reativas de oxigênio. E pode ser utilizada como biomarcador essencial na análise do efeito tóxico em nível proteico, uma vez que está diretamente relacionada a processos patológicos como o câncer e doenças inflamatórias (Mori et al. 2015).

No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, é consenso que o parasito enfrenta diferentes fontes de estresse oxidativo durante seu ciclo de vida em mamíferos e invertebrados. Além das espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pelo seu próprio metabolismo, o *T. cruzi* lida com níveis de ERO gerados como parte da resposta imune de seus hospedeiros. Para sobreviver, ele apresenta mecanismos complexos de defesa que inclui vias de desintoxicação de ROS, vias de reparo de DNA e polimerases especializadas que não apenas protegem seu genoma do dano oxidativo, mas também contribuem para a geração de diversidade genética na população parasitária (Machado-Silva et al. 2016).

A partir do exposto, é importante considerar que a ingestão de dietas ricas em gorduras pode favorecer o acúmulo de tecido adiposo, mas também, provocar alterações do perfil inflamatório em mamíferos. É de conhecimento que dietas ricas em gorduras saturadas aumentam a produção de mediadores inflamatórios, enquanto dietas ricas em gorduras insaturadas parecem contribuir para a proteção do sistema cardiovascular por meio da redução de colesterol LDL e aumento de colesterol HDL. Em paralelo, a infecção pelo *T. cruzi* leva a um padrão crônico de resposta inflamatória ocasionando dano tecidual aos organismos infectados. Por isso, tanto o perfil lipídico elevado quanto a infecção pelo *T. cruzi* parecem “co-existir” em mamíferos numa tentativa de estabelecer um controle da infecção pelo *T. cruzi*. Dessa forma, compreender o papel do perfil lipídico nas dietas e sua participação no controle das proteínas sinalizadoras e mediadores inflamatórios tem se mostrado uma importante estratégia para o controle da imunopatologia causada por este protozoário.

## 2. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Caracterizar o papel das dietas ricas em ácidos graxos (saturado e monoinsaturado) sobre a resposta inflamatória aguda e crônica em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

### 3.2. Objetivos específicos

Para alcançar o referido objetivo, utilizou-se as dietas de Banha de porco (ácido graxo saturado) e de Azeite de oliva (ácido graxo insaturado) em associação à infecção pelo *T. cruzi* para avaliar os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliação da replicação e da quantificação do *T. cruzi* no sangue, coração e tecido;
- b) Quantificação dos lipídeos totais hepáticos;
- c) Caracterização das alterações histológicas nos tecidos cardíaco e adiposo;
- d) Avaliação da produção de biomarcadores de processos redox (superóxido dismutase, catalase, glutathione e proteína carbonilada);
- e) Quantificação da produção dos mediadores inflamatórios CCL-2 e IL-10;
- f) Quantificação da expressão de genes de proteínas (*Tlr-2, Tlr-4, Tlr-9, Foxp3, Smad-2, Smad-3, Stat-6, Irak-1, Ppar- $\alpha$  e Ppar- $\gamma$* ).



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Cuidados éticos

Todos os procedimentos propostos nesse estudo encontram-se de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a metodologia foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), sob os protocolos 36/2015, referente aos estudos de fase aguda, e 77/2016, referente aos estudos de fase crônica. O experimento cumpre as normas de pesquisas com animais explícitos na Lei nº 11.749, de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.

### 4.2. Delineamento do estudo

O presente estudo foi desenvolvido em dois momentos da infecção pelo *T. cruzi*: na fase aguda, na qual o animal permaneceu infectado por 30 dias; e na fase crônica recente, na qual o animal permaneceu infectado por 100 dias (**figura 1**). Para a infecção foram utilizadas 50 formas tripomastigotas sanguínea da cepa Colombiana do *T. cruzi* (DTU TcI), obtidos após duas passagens consecutivas da cepa em camundongos da linhagem *Swiss*, por administração intraperitoneal.

#### Fase aguda



#### Fase crônica recente

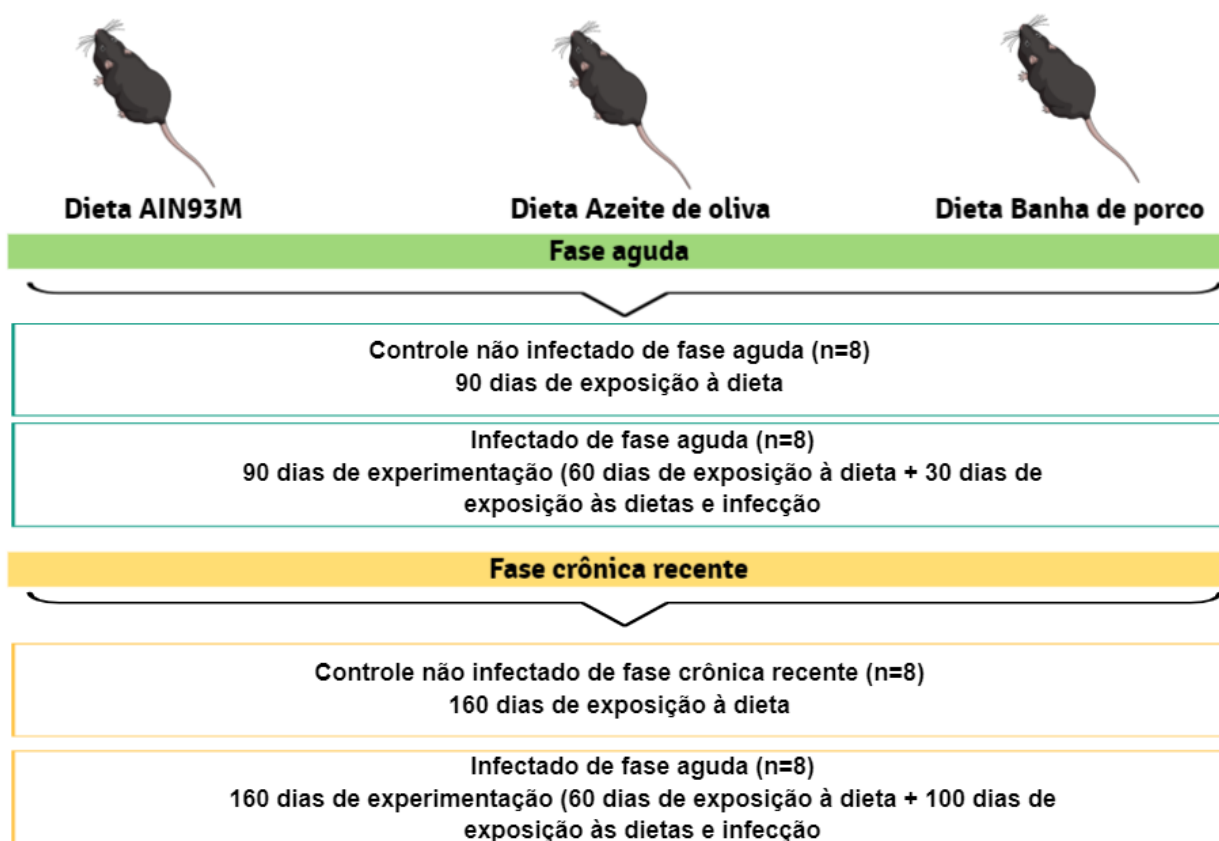


**Figura 1.** Delineamento do estudo. Apresentação dos grupos de estudo de acordo com os tempos de infecção.

### 4.3. Animais

Para os experimentos foram utilizados 96 camundongos machos C57BL/6, com 21 dias de idade e peso aproximado de 9g. Estes animais foram alocados no biotério central da UFOP, em salas climatizadas em condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ( $22,0 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e em gaiolas de polipropileno.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tipo de dieta oferecida, sendo elas: dieta AIN93M (9% lipídeos – fonte óleo de soja), dieta AIN93M com banha de porco (40% lipídeos – fonte banha de porco – ácido graxo saturado), dieta AIN93M com azeite de oliva (40% lipídeos – fonte azeite de oliva – ácido graxo insaturado). Posteriormente os animais foram divididos em grupos de acordo com a infecção ou não pelo *T. cruzi* e o respectivo tempo de infecção (**figura 2**).



**Figura 2. Distribuição dos animais nos grupos de acordo com as dietas e distribuição temporal.** Dietas utilizadas: controle AIN93M, azeite de oliva (ácidos graxos monoinsaturados) e banha de porco (ácidos graxos saturados). Distribuição temporal: fase aguda (30 dias de infecção) e fase crônica (100 dias de infecção).

#### 4.4. Dietas e controle do peso

Foram utilizadas três dietas com composições lipídicas diferentes (dieta AIN93M: 9% lipídeos; dieta AIN93M + banha de porco: 40% de lipídeos; e dieta AIN93M + azeite de oliva: 40% de lipídeos), todas produzidas pela Prag-Soluções e Comercio Ltda São Paulo – SP (tabela 1).

As respectivas dietas foram oferecidas aos animais durante todos os dias de experimento, com aferição diária do consumo e acompanhamento semanal do ganho de peso. A medida do comprimento dos animais (naso-anal) foi realizada apenas no dia da eutanásia.

**Tabela 1.** Composição das dietas (1000g).

Ingrediente	Dieta AIN 93M	Dieta AIN93M + alteração – banha de porco	Dieta AIN93M + alteração - azeite de oliva
Amido de milho	465,7	287,7	287,7
Caseína	140,0	140,0	140,0
Amido dextrinizado	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Óleo de Soja	40,0	40,0	40,0
Celulose microcristalina	50,0	50,0	50,0
Mix mineral AIN93M <sup>1</sup>	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico AIN93M <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0
L cistina	1,8	1,8	1,8
Bi tartarato de colina	2,5	2,5	2,5
BHT	0,0008	0,0010	0,0010
Banha <sup>3</sup>	----	168,0	----
Colesterol	----	10,0	----
Azeite de oliva extravirgem <sup>4</sup>	----	----	178,0
Valor calórico total	4020,0	4910,0	4910,0

1 - Mistura de minerais (expresso em g/kg da mistura): CaCO<sub>3</sub> 357,0/ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>K<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.1H<sub>2</sub>O 28,0/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250,0/ NaCl 74,0/ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 46,6/ MgO 24,0/ C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>+4yFexNyO<sub>7</sub> 6,06/ CO<sub>3</sub>Zn 1,65/ MnCO<sub>3</sub> 0,63/ CuCO<sub>3</sub> 0,3/ KI 0,01/ Na<sub>2</sub>Se 0,01025/ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,00795/ Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O 1,45/ KCr (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,275/ LiCl 0,0174/ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,0815/ NaF 0,0635/ NiCO<sub>3</sub> 0,0318/ NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> 0,0066/ C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> 209,806. 2 - Mistura de vitaminas (expresso em mg/kg da mistura): Niacina 3,0/ Pantotenato de cálcio 1,6/ Piridoxina 0,7/ Tiamina 0,6/ Riboflavina 0,6/ Ácido fólico 0,2/ Biotina 0,02/ Vitamina E (500 UI/g) 15,0/ Vitamina B12 (0.1%) 2,5/ Vitamina A (500000 UI/g) 0,8/ Vitamina D3 (400000 UI/g) 0,25/ Vitamina K1/Dextrose Mix (10 mg/g) 7,50/ Sacarose 967,23. Fatores de conversão: proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g, açúcares 4 kcal/g. 3 – Composição de ácidos graxos da banha de porco (nome comercial: Estrela – valores referentes a 100g do produto): saturados 40,0/ monoinsaturados 44,76/ poli-insaturados 15,42. 4 – Composição de ácidos graxos do azeite de oliva extravirgem (nome comercial: Olivenza – valores referentes a 100g de produto): saturados 14,9/ monoinsaturados 75,6/ poli-insaturados 9,5.

#### **4.5. Infecção e parasitemia**

Os animais foram infectados, intraperitonealmente, com 50 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana.

Para a confirmação da infecção nos animais e parasitemia, foi utilizada a técnica de Brener por meio de coleta diária de 5µL de sangue pela secção de veias superficiais da cauda (Brener, 1962) e identificação direta dos parasitos circulantes em lâmina/lamínula. O tempo de parasitemia foi igual ao tempo de infecção para os animais de fase aguda (30 dias) e até o quarto dia consecutivo de não detecção da parasitemia em animais de fase crônica. A mortalidade entre os animais foi observada ao longo de todo o experimento.

#### **4.6. Eutanásia dos animais**

Os animais foram eutanasiados aos 30 dias de infecção (grupos de fase aguda) e 100 dias de infecção (grupos de fase crônica recente).

Antes da eutanásia, os camundongos foram sedados com solução de ketamina (80mg/kg) /xilazina (7mg/kg), administrada intraperitonealmente. Em seguida, houve a coleta de sangue via punção cardíaca (cerca de 1,5mL) e os animais eutanasiados.

O coração, fígado e o tecido adiposo foram coletados e lavados com solução salina PBS, secados em papel absorvente, pesados e divididos em três partes: a primeira mantida em *TRIzol Reagent* (10mg de tecido para 500µL de *TRIzol*) destinada a quantificação de parasitos nos tecidos adiposo e cardíaco; a segunda mantida em solução de metanol-DMSO destinada as análises histológicas dos tecidos adiposo e cardíaco; e a terceira em tubo cônico sem nenhum acréscimo de solução para análises posteriores de lipídeos totais, biomarcadores de processos redox (fígado) e inflamatórios (plasma, tecidos adiposo e cardíaco).

#### **4.7. Dosagem de lipídeos totais hepáticos**

Durante a eutanásia os fígados dos animais foram removidos, lavados em solução salina fisiológica, secos em papel de filtro e pesados. Foram, então, colocados em tubo cônico e mantidos em freezer a -80°C até a realização das dosagens.

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de Folch (Folch, Lees, and Sloane-Stanley 1957). Em síntese, foram pesados 100 mg de fígado e triturados com 4000 µL de solução contendo clorofórmio-metanol (2:1), sendo homogeneizados por 2 minutos. Após a adição de 400 µL de metanol, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm

e o sobrenadante transferido para novos tubos de vidro com peso conhecido. Posteriormente foram acrescentados 800 µL de clorofórmio e 640 µL de solução de NaCl a 0,73% e as amostras novamente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada três vezes com 600 µl de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl a 0,29%) e os lipídeos assim extraídos foram secos em estufa *overnight* a 50° C. Após verificar que os tubos estavam totalmente secos, eles foram pesados e a quantidade de lipídeos extraída foi dada pela diferença dos tubos de vidro antes e depois de secos.

## **4.8. Histologia**

### 4.7.1 Histologia convencional:

Para quantificação dos parasitos teciduais (ninhos de amastigota) e para a mensuração da inflamação, os tecidos cardíaco e adiposo foram processados e avaliados através de histologia convencional. Os tecidos foram fixados em solução DMSO-metanol, e mantidos em freezer -20°C até o processamento. Posteriormente os tecidos foram processados e desidratados em passagens sucessivas por etanol, fixados em xilol e inseridos em parafina plástica (Paraplast).

Para evidenciação do infiltrado inflamatório, fragmentos do tecido cardíaco foram corados pela hematoxilina/eosina (HE). Os cortes foram colocados em dois banhos de xilol, cada um com a duração de 10 minutos. Foi realizado, então, a hidratação com a sequência de banho em álcool absoluto e soluções alcoólicas de 90%, 80% e 70%, cada um por 5 minutos, corados por hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente, diferenciados rapidamente em álcool acidulado e, novamente, lavados em água corrente e corados pela eosina durante um minuto. Após esta etapa os cortes foram lavados em água corrente por um minuto e passados por dois banhos de álcool absoluto, cada um com a duração de 10 segundos. Posteriormente, foram levados até a estufa de 56°C para secagem e, após este período, foram montadas as lâminas com auxílio de Entellan.

Os núcleos celulares presentes no fragmento foram quantificados em 20 imagens (campos aleatórios). As imagens visualizadas pela objetiva de 40X foram digitalizadas através da microcâmera Leica DM 5000 B (*Leica Application Suite*, versão 2.4.0R1) e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3.

#### 4.9. Biomarcadores de processos redox

O *status* redox foi testado para diversas proteínas em tecido hepático. Para estas dosagens foram utilizados fragmentos homogeneizados de fígado.

##### 4.9.1. Proteínas totais

As proteínas totais foram dosadas pelo método de Lowry (Lowry et al. 1951). Foram pipetados em um tubo cônico 10 µL da amostra e H<sub>2</sub>O destilada em volume até completar 100 µL. Para o branco foi pipetado 100µL de H<sub>2</sub>O destilada e todos os tubos incluindo o branco e os padrões receberam 1000µL do reagente C (Para 50ml de reagente B, adicionar 1ml de reagente A, onde reagente B é a solução de 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido/o de sódio em 250ml de água destilada; e o reagente A é a solução de 0,25g de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e 0,5g de citrato de sódio em 100ml de água destilada). As amostras foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente (22°C) por 15 minutos. Logo após, foram pipetados 100µL do reagente D (1 ml de Folin Ciocalteu: 1ml de H<sub>2</sub>O) em todos os tubos. As amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos em sala escura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 660nm para a obtenção das absorbâncias das amostras, zerando o aparelho com o branco.

A concentração do padrão (Eixo Y) versus a absorbância do padrão (Eixo X) foram expressas em gráfico. Após análise de regressão linear, a equação da reta foi determinada com a seguinte característica:

$$\text{Concentração} = a \times \text{absorbância} + b$$

Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato dos tecidos. Todas as concentrações serão obtidas em mg/mL.

##### 4.9.2. Catalase

Foram homogeneizados 100 mg tecido em 1ml de tampão fosfato 0,1M, pH: 7.2 e centrifugadas a 10000rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado em freezer -80°C por período inferior a 30 dias para que as amostras não fossem degradadas. As amostras foram colocadas em tubos cônicos identificados e em cada tubo foram pipetados 990

μl do mix de peróxido de hidrogênio (25 μl do peróxido 6% 2. 4975 μl de tampão fosfato) e 10 μl da amostra diluída. No momento em que a amostra foi colocada no mix, foi disparado cronômetro para 2 minutos e as absorbâncias foram anotadas nos tempos 0, 1 minutos e 2 minutos. Foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda 240nm para leitura das amostras, e este foi zerado com tampão fosfato 0,1M, pH: 7.2.

Para o cálculo da absorbância, utilizou-se os valores de proteínas totais, e considerou-se que 1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(ε = 39,4 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) por minuto (Aebi, 1984). A atividade foi calculada utilizando o delta das duas absorbâncias lidas (ABS final – ABS inicial / 2).

$$\frac{U}{mg} \text{ de proteína} = \left( \frac{\frac{\Delta ABS}{min}}{Vol(mL) \times \epsilon \times mg \text{ de proteína}} \right) \times \text{diluição}$$

Onde: ε = Coeficiente de extinção molar (0,071mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> / 1U; vol = 1mL.

#### 4.9.3. Superóxido dismutase

Para a dosagem de superóxido dismutase foram utilizadas as mesmas amostras obtidas para a dosagem de Catalase.

As amostras foram pipetadas em placa de 96 poços em diluição de 20 vezes (1,5uL de amostras + 28,5uL de tampão). Posteriormente foram adicionados tampão, MTT e pirogalol, conforme a tabela abaixo e incubadas a 37° C por 5 minutos.

**Tabela 2.** Diluição das amostras para dosagem de superóxido dismutase

	Amostras (uL)	Tampão (uL)	MTT(uL)	Pirogalol(uL)
Branco	-	144	6	-
Padrão	-	129	6	15
Amostra	30 já diluída	99	6	15

A reação foi interrompida com a adição de 150ul de DMSO em todos os poços e a leitura foi realizada em leitor a 570nm.

Para os cálculos, as absorbâncias foram divididas pela absorbância do padrão e posteriormente multiplicadas pelo fator de diluição (20). Os valores encontrados foram ainda divididos pela quantidade de proteínas totais encontradas anteriormente.

#### 4.9.4. Glutaciona total

Para a dosagem de glutaciona total foram utilizados 100 mg de fígado homogeneizados em 1mL de tampão de ácido sulfossalicílico a 5% - SSA (ácido sulfossalicílico (2,5g) em 50 mL de água). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mantido em freezer -80°C por período inferior a 30 dias.

As amostras foram pipetadas em placa de 96 poços de fundo chato conforme a tabela a seguir:

**Tabela 3.** Distribuição de reagentes para dosagem de glutaciona total.

	Amostra (5µL)	SSA 5% (µL)	Mistura de trabalho (µL)	NADPH (µL)
Branco	-	(10µL)	(150µL)	(50µL)
Curva padrão (5 pontos)	(10µL)	-	(150µL)	(50µL)
Amostra	(10µL)	-	(150µL)	(50µL)
	Misturar e incubar por 5 minutos			Adicionar após 5 minutos

Imediatamente após a adição do NADPH, a placa foi colocada no leitor e as absorvâncias lidas em intervalos de 1 minuto durante 5 minutos.

O gráfico foi realizado utilizando os pontos obtidos na curva padrão (delta das absorvâncias). A equação da reta foi determinada após análise de regressão linear. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutaciona total em 10µL de amostra e este valor convertido para 1mL de amostra.

$$[Concentração = a \times (\text{delta das absorvâncias}) + b]$$

O gráfico foi plotado com as concentrações de cada ponto de acordo com a tabela a seguir:

**Tabela 4.** Concentrações para curva de calibração da glutaciona total.

Curva	Concentração
P1	0,25
P2	0,125
P3	0,062
P4	0,0312
P5	0,0156



#### 4.9.5. Glutathiona oxidada (GSSG)

Para a dosagem de glutathiona oxidada, foi preparada solução estoque padrão (10mM), onde foram diluídos 3mg de glutathiona oxidada em 440,2ul de água destilada. Para a curva, foi preparada uma solução a 50mM de solução de estoque em 5% de SSA, com 10ul de solução estoque (10nM) em 2ml de ácido sulfossalicílico. Os pontos da curva foram pipetados em solução seriada em tubos cônicos, e posteriormente pipetados em placa de baixa afinidade com 96 poços.

**Tabela 5.** Distribuição de reagentes para dosagem de glutathiona oxidada.

Poço	1	2	3	4	5
[GSSG] $\mu$ M	25	12,5	6,25	3,125	1,562
Solução de GSSG ( $\mu$ L)	25	25 (Tubo 1)	25 (Tubo 2)	25(Tubo 3)	25(Tubo 4)
SSA 5% ( $\mu$ L)	25	25	25	25	25
GSSG (nmoles)/10 $\mu$ L amostra	0,25	0,125	0,062	0,0312	0,0156

Para a realização do procedimento, foi utilizado um pHmetro calibrado e tubos cônicos identificados de acordo com o número das amostras. Foram pipetados 100ul das amostras nos tubos e realizado teste para dosagem de trabalho da vinilpiridina e da TEA, a serem utilizados em cada tubo.

Para o teste foram pipetados em tubo falcon de 50 mL entre 0,5 e 2,0 ul de vinilpiridina e de 1 a 5 ul de TEA. Os tubos foram completados com água destilada até o volume de 15 mL, homogeneizados e o pH mantido ente 6.0 e 7.0.

Depois de realizar o teste para o volume de vinilpiridina e pipetar o volume adequado, as amostras foram mantidas em capela a temperatura ambiente por 1 hora. Após o período de incubação foram utilizados 10ul de amostras e realizada a dosagem da mesma forma que descrita para a glutathiona total, utilizando um comprimento de onda de 412 nm.

**Tabela 6.** Distribuição dos reagentes na placa de 96 poços para dosagem de glutathiona oxidada.

	Misturar e incubar por 5 minutos			Após 5 minutos
	Amostra (uL)	SSA 5% (uL)	Mistura de trabalho (uL)	NADPH (uL) de uso
Branco	-	10uL	150uL	50uL
Curva padrão (5 pontos)	10 UI	-	150uL	50uL
Amostra	10 UI	-	150uL	50uL

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, adicionados 50uL de NADPH. Neste momento houve a leitura da placa para identificação das absorvâncias em intervalos de 1 minuto por 5 minutos.

Para definição dos valores das amostras foram utilizados os mesmos cálculos utilizados anteriormente para a glutatona total, porém, as concentrações utilizadas para a curva de calibração foram as seguintes:

**Tabela 7.** Concentrações para curva de calibração da glutatona oxidada.

Curva	Concentração
P1	0,25
P2	0,125
P3	0,062
P4	0,0312
P5	0,0156

#### 4.9.6. Proteína carbonilada

Para a dosagem de proteína carbonilada foram pesados 200 mg de fígado e macerados em 1,5mL de tampão KPE [80 mL da solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100mM), 420 mL de solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100 mM) e 930 mg de EDTA, pH 7,4]. As amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e mantido em freezer -80°C por período inferior a 30 dias.

Foram pipetados 500uL do homogenato e acrescentou-se 500 uL de TCA 10% (10 g de ácido tiocloroacético em 100 mL de água destilada) para precipitação da proteína. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 uL de DNPH (0,05 g de DNPH em 25 mL de HCl 2 mols/L) e, novamente, o material homogeneizado. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente em sala escura por 1 hora e, sem seguida, homogeneizadas a cada 15 minutos num período de 1 hora. Depois, foram novamente adicionados 500 mL de TCA 10% e as amostras homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi acrescido de 1mL de etanol/acetato de etila. Novamente, as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas por 10 minutos a 5.000rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em 1mL de solução de SDS (6 g de SDS em 100 ML de água destilada). Após última homogeneização das amostras e centrifugação por 10 minutos a 5.000rpm a 4°C, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 370 nm. O aparelho foi zerado com solução de SDS.

Para o cálculo de proteína carbonilada, foram necessários os valores de proteínas totais.

Proteína carbonilada (nmol/mL)

$$\left(\frac{\text{absorbância}}{\varepsilon}\right) \times \left(\frac{1000000}{VA}\right)$$

Onde:  $\varepsilon = 22000 \text{ M.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}$ ; VA= volume da amostra

$$\frac{\text{proteína carbonilada}\left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}}\right)}{\text{proteína total}\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

#### 4.10. Ensaio imunoenzimático

Foram realizadas as dosagens da quimiocina CCL-2 e da citocina regulatória IL-10, pelo método imunoenzimático - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), utilizando kits da empresa PEPROTECH®, Ribeirão Preto, SP.

Para a realização dos ensaios foram utilizados sobrenadantes de amostras de tecidos adiposo e cardíaco. Os tecidos foram pesados (20mg para coração e 40 mg para tecido adiposo), macerados junto a 200uL de solução salina tamponada, centrifugados a 3.500 rpm em temperatura de 4°C. O sobrenadante coletado foi utilizado para as dosagens.

Placas de alta afinidade foram utilizadas para o ensaio de ELISA e, em cada poço, adicionado 100ul de anticorpo monoclonal da proteína (ou peptídeo) a ser dosado, diluído em PBS contendo 0.1% de albumina de soro bovino - BSA (SIGMA), sendo estas placas incubadas por 12 horas à temperatura ambiente. Anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* e as placas bloqueadas com 300ul/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37° C. As placas foram novamente lavadas e as amostras de sobrenadante de macerado dos tecidos aplicadas em um volume de 25ul para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e realizada incubação por 12 horas à temperatura ambiente.

Os anticorpos secundários foram diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionado 100ul de avidina ligada à peroxidase na diluição de 1:2000 em PBS-BSA 0.1% e a placa incubada por 30 minutos.

O cromógeno escolhido para revelação foi o ABTS (A3219 - 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Foram adicionados 100 uL desta solução nos poços e a

placa incubada até o aparecimento da cor, o que ocorreu próximo a 30 minutos. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 405 nM com correção de 650 nM.

#### **4.11. Reações de PCR em tempo real**

##### *4.11.1. Extração de DNA genômico total e reação de PCR*

Os tecidos adiposo e cardíaco dos animais infectados foram retirados no momento da eutanásia e o DNA extraído utilizando-se o *kit QIAamp®*, segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, 10 mg de tecido foram triturados e colocados em 100 µL de tampão de digestão. Uma solução de proteinase K (20mg/ml, GIBCO) foi adicionada para incubação a 56°C, por 12 horas. Foi acrescentado às amostras 4 µL de *RNase A* (100mg/ml) e, após agitação por 15 segundos, 200µL de um segundo tampão seguido de incubação por 10 minutos a 70°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500xg a 25°C e 200 µL de etanol (96-100%) foi adicionado seguido de agitação por 15 segundos. A mistura foi aplicada à coluna pertencente ao *kit QIAamp®* e centrifugada a 6000xg (8000 rpm) por 1 minuto. O filtrado foi descartado e o DNA lavado 2 vezes com tampões que acompanham o kit. Este foi, então, eluído e ressuspenso em 50 µL de água miliQ e a concentração determinada em espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific Inc.©*). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento do uso na PCR em tempo real. A reação de PCR de DNA foi empregada, neste estudo, para quantificar o parasitismo nos tecidos adiposo e cardíaco nos animais infectados, ou seja, para avaliar a quantidade de DNA do parasito nestes sítios. Uma curva foi criada com amostras de DNA do parasito e cerca de 10 ng de DNA do coração dos animais infectados adicionado aos poços. Após a reação obteve-se a quantificação do DNA dos animais, de acordo com a curva de DNA do *T. cruzi*.

##### *4.11.2. Extração de RNA e quantificação de mensagem por PCR em tempo real*

Os tecidos adiposo e cardíaco dos animais foram coletados nos momentos da eutanásia e o RNA dos alvos extraídos utilizando-se o *kit Isolation System Promega*, segundo as instruções do fabricante. Os primers para tais reações foram desenhados a partir do programa *Primer Express (Applied Biosystems)*, conforme **tabela 8**.

Para a extração do RNA, 10 mg de tecido em 500uL de *TRIzol* foram trituradas em homogenizador manual com haste pequena, previamente tratada com água DEPC e autoclavada. Após homogeneizar as amostras, foram adicionados mais 500uL de *TRIzol* e acrescentado 200uL de clorofórmio. Logo após, as amostras foram incubadas por 5 minutos e centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a parte superior (translúcida) foi transferida para outro tubo cônico limpo com o cuidado de não contaminar com a interface das fases. Adicionou-se 200uL de álcool 95%, homogeneizado e a solução transferida para as colunas do kit *Isolation System Promega*. Os tubos com as colunas foram centrifugados a 12000g em temperatura ambiente por 1 minuto. Logo após foi adicionado 600uL de *RNA wash solution*, novamente centrifugado a 12000g por 1 minuto seguido de descarte do eluído. Foi então adicionado 40uL do mix (*yellow core buffer* – 400uL,  $MnCl_2$  0,09M – 5uL, e *DNase* – 5 uL) no centro da membrana e encubado por 15 minutos. Foram adicionados 200uL de *stop solution* e os tubos centrifugados por 1 minuto a 12000g. Depois, adicionados mais 600uL de *RNA wash*, e repetido a etapa de centrifugação e desprezo do eluído. Adicionado então 250uL de *RNA wash* e centrifugado novamente, para então desprezar o eluído, remover o tubo coletor, transferir a coluna para tubo de eluição e adicionar 50 uL de  $H_2O$  *endofree*. Os tubos foram, finalmente, centrifugados por 1 minuto e as amostras estocadas a -70°C.

As amostras de RNA foram suspensas em 50 µL de água deionizada e quantificadas em espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific Inc.*©). Após a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA mensageiro, a expressão quantitativa dos genes alvo foi analisada pela reação de PCR em tempo real no aparelho *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) utilizando-se o sistema *SYBER Green*. O sistema *SYBR Green* é utilizado nas reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras (*ABI Prism Software*) por intermédio de nucleases fluorogênicas, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. A reação básica de amplificação compreende 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Além disso, um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para a obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cycle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

#### 4.11.3. Primers

Os primers de oligonucleotídeos específicos para cada alvo (*18S*, *Gapdh*, *Calpain*, *Foxp3*, *Irak*, *Smad 2*, *Smad3*, *Stat6*, *Ppar-alpha*, *Ppar-gamma*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr9* e *Trypanosoma cruzi*) foram obtidos junto à Invitrogen, Brasil Ltda (Tabela 8).

**Tabela 8.** Sequência de primers baseadas nas sequências de nucleotídeos da Gen Bank Database.

<i>Alvo</i>	<i>Sequências: Sence / Antissence</i>
<i>18S</i>	<i>CCGCAGCTAGGAATAATGGAATA / GCCTCAGTTCCGAAAACCAA</i>
<i>Foxp3</i>	<i>ACAACCTGAGCCTGCACAAGT / GCCCACCTTTTCTTGGTTTTG</i>
<i>Gapdh</i>	<i>GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG / AATGGATGAAGGTCGGTGTG</i>
<i>Irak-1</i>	<i>TGGCTGGATGTTTCGTCATAT / TGTTCCACTTTTACCTTGGTTT</i>
<i>Ppar alpha</i>	<i>TCAATGCCTTAGAACTGGATGA / CCGATCTCCACAGCAAATTATA</i>
<i>Ppar gamma</i>	<i>TGAGATCATCTACACGATGCTG / AGGAACTCCCTGGTCATGAA</i>
<i>Smad 2</i>	<i>ATCAAACCTCGGAGAGGTTCTG / TTTCGGTTAACGTTGGAGAG</i>
<i>Smad 3</i>	<i>TAGGGAAGCATTTCATGGTCCT / ACCGGACAGCAAGTGACATA</i>
<i>Stat 6</i>	<i>ATCGGCTGATCATTGGCTTT / TGACGTGTGCAATGGTGATG</i>
<i>Tlr 2</i>	<i>AAGTCTCCGGAATTATCAGTCC / TGATGGATGTCGCGGAT</i>
<i>Tlr 4</i>	<i>CCAAGCCTTTCAGGGAATTAAG / GCCAGGTTTTGAAGGCAAGT</i>
<i>Tlr 9</i>	<i>GGACCTACAGCAGAATAGCTCA / AACTCGGGAACCAGACATG</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA / GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT</i>

#### 4.11.4. PCR quantitativo em tempo real

Os níveis de expressão do mRNA foram determinados pela PCR quantitativa em tempo real. As reações de transcrição reversa foram desenvolvidas utilizando-se 200ng do RNA total a 48°C durante 60 minutos com o kit *Syber Green Transcription* (*Applied Biosystems*). A PCR quantitativa em tempo real foi efetuada em um sistema ABI 7300 (*Applied Biosystems*), utilizando kits e reagentes da mesma agência fornecedora do sistema de detecção. Amostras contendo elevadas concentrações de cada alvo foram utilizadas para o estabelecimento de curva padrão dos cDNA transcritos. Todas as curvas padrões mantiveram-se lineares com um  $r^2$  maior que 0.98%. Na mesma corrida, os valores de CT das amostras (cDNA diluído 20x) foi medido e os níveis de expressão relativa determinados. Como gene constitutivo, a expressão do RNA ribossomal 18S foi avaliada, também, utilizando-se o kit controle *Syber Green RNA* (*Applied Biosystems*) de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações de PCR foram desenvolvidas em parceria com o laboratório do Prof. Dr. João Santana da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, SP.

#### 4.12. Análise estatística

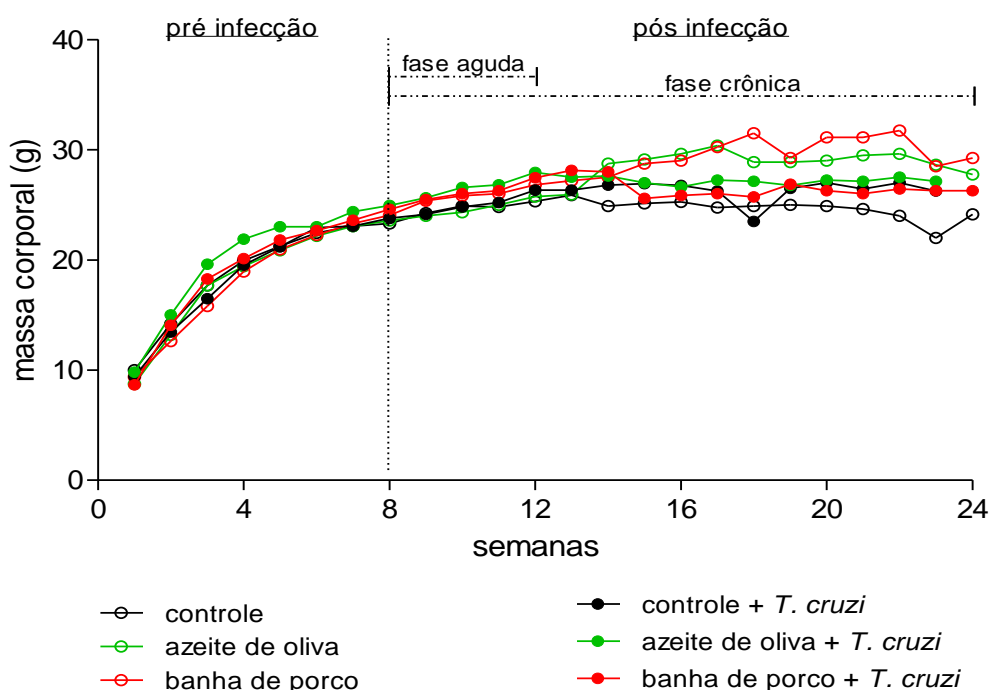
Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Foi utilizado o programa *Sisvar* (versão 5.6) e, após realização de teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*), os foram dados analisados pelo teste *ANOVA two way* utilizando os pós testes *Skott-Knott* para múltiplas comparações, ou *Teste T de Student* para a comparação de duas médias. As diferenças foram consideradas significativas para o  $p$  igual ou menor a 0,05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Influência da composição das dietas nos dados biométricos dos animais:

Para avaliar a influência da composição lipídica das dietas azeite de oliva e banha de porco nos dados biométricos dos animais, foram analisados o peso, a medida naso-anal, além das massas dos órgãos (coração, baço, fígado e tecido adiposo epididimal).

De acordo com a **figura 3** e a **tabela 9**, as dietas não refletiram diferenças no ganho de massa corporal ou comprimento naso-caudal.



**Figura 3.** Curva de massa corporal de animais infectados pelo *T. cruzi* em fases aguda e crônica. Animais alimentados com dieta AIN93M (em preto sem preenchimento); alimentados com dieta AIN93M e infectados pelo *T. cruzi* (em preto); alimentados com dieta AIN93M com alteração de azeite de oliva (em verde sem preenchimento); alimentados com dieta AIN93M com alteração de azeite de oliva e infectados pelo *T. cruzi* (em verde); alimentados com dieta AIN93M com alteração de banha de porco (em vermelho sem preenchimento); alimentados com dieta AIN93M com alteração de banha de porco infectados pelo *T. cruzi* (em vermelho). A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Não foram encontradas diferenças entre os grupos.



**Tabela 9. Medidas de comprimento naso-anal dos animais infectados pelo *T. cruzi* submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

	Grupos	Comprimento naso-anal (cm)
Fase aguda	Dieta AIN93M	8,98 ( $\pm 0,22$ )
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	8,96 ( $\pm 0,28$ )
	Dieta azeite de oliva	8,95 ( $\pm 0,41$ )
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	9,16 ( $\pm 0,64$ )
	Dieta banha de porco	9,50 ( $\pm 0,27$ )
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	9,35 ( $\pm 0,29$ )
Fase crônica recente	Dieta AIN93M	9,50 ( $\pm 0,27$ )
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	9,44 ( $\pm 0,42$ )
	Dieta azeite de oliva	9,81 ( $\pm 0,37$ )
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	9,71 ( $\pm 0,39$ )
	Dieta banha de porco	9,81 ( $\pm 0,37$ )
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	9,17 ( $\pm 0,26$ )

A **tabela 10** mostra os dados relativos à massa do coração dos animais infectados pelo parasito. Constatou-se que apenas os animais infectados, em fase aguda e alimentados com dieta azeite de oliva apresentaram aumento na massa deste órgão, quando comparado ao seu controle não infectado.

**Tabela 10. Massa do coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Grupos identificados com letras similares apresentaram diferenças entre si.

	Grupos	Coração (g)
Fase aguda	Dieta AIN93M	0,16 ( $\pm 0,05$ )
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,16 ( $\pm 0,02$ )
	Dieta azeite de oliva	0,14 ( $\pm 0,02$ ) <sup>a</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,16 ( $\pm 0,02$ ) <sup>a</sup>
	Dieta banha de porco	0,17 ( $\pm 0,04$ )
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,16 ( $\pm 0,04$ )
Fase crônica recente	Dieta AIN93M	0,14 ( $\pm 0,02$ )
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,17 ( $\pm 0,02$ )
	Dieta azeite de oliva	0,17 ( $\pm 0,05$ )
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,14 ( $\pm 0,02$ )
	Dieta banha de porco	0,14 ( $\pm 0,02$ )
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,19 ( $\pm 0,03$ )

As **tabelas 11 a 13** mostram que a dieta e a infecção contribuíram para o aumento de massa dos órgãos avaliados (baço, fígado e tecido adiposo epididimal).

Na **tabela 11**, observou-se que os animais infectados, e alimentados com a dieta azeite de oliva apresentaram maior massa do baço quando comparado ao grupo infectado alimentado

com a dieta AIN93M e quando comparado ao grupo de animais infectados e alimentado com a dieta banha de porco durante a fase aguda da infecção. Já na fase crônica recente, a infecção foi decisiva para a persistência do aumento da massa esplênica, independente da dieta utilizada. Neste segmento, a dieta com azeite de oliva também propiciou aumento da massa esplênica, quando comparada ao grupo de animais alimentados com a dieta AIN93M ou com a dieta com banha de porco.

**Tabela 11. Massa do baço em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Grupos identificados com letras similares apresentaram diferenças entre si.

Grupos		Baço (g)
Fase aguda	Dieta AIN93M	0,11 ( $\pm 0,04$ )
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,48 ( $\pm 0,03$ ) <sup>a</sup>
	Dieta azeite de oliva	0,07 ( $\pm 0,02$ ) <sup>b</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,69 ( $\pm 0,12$ ) <sup>ab</sup>
	Dieta banha de porco	0,10 ( $\pm 0,03$ ) <sup>c</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,26 ( $\pm 0,07$ ) <sup>ac</sup>
Fase crônica recente	Dieta AIN93M	0,08 ( $\pm 0,01$ ) <sup>dg</sup>
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,62 ( $\pm 0,10$ ) <sup>d</sup>
	Dieta azeite de oliva	0,13 ( $\pm 0,03$ ) <sup>egh</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,23 ( $\pm 0,03$ ) <sup>e</sup>
	Dieta banha de porco	0,09 ( $\pm 0,01$ ) <sup>fh</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,21 ( $\pm 0,04$ ) <sup>f</sup>

Na avaliação do fígado (**tabela 12**), a infecção pelo *T. cruzi* aumentou a massa deste órgão entre os animais alimentados com as mesmas dietas. Também foi verificado aumento da massa hepática pela associação da infecção com a composição lipídica da dieta.

**Tabela 12. Massa hepática em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Grupos identificados com letras similares apresentaram diferenças entre si.

Grupos		Fígado (g)
Fase aguda	Dieta AIN93M	1,29 ( $\pm 0,14$ ) <sup>af</sup>
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	1,86 ( $\pm 0,20$ ) <sup>ad</sup>
	Dieta azeite de oliva	0,92 ( $\pm 0,30$ ) <sup>bfg</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	1,73 ( $\pm 0,21$ ) <sup>bde</sup>
	Dieta banha de porco	1,35 ( $\pm 0,13$ ) <sup>cg</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	1,61 ( $\pm 0,21$ ) <sup>ce</sup>
Fase crônica recente	Dieta AIN93M	1,24 ( $\pm 0,17$ ) <sup>hj</sup>
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	1,65 ( $\pm 0,19$ ) <sup>h</sup>
	Dieta azeite de oliva	1,28 ( $\pm 0,14$ ) <sup>ik</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	1,90 ( $\pm 0,14$ ) <sup>i</sup>
	Dieta banha de porco	1,62 ( $\pm 0,50$ ) <sup>jk</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	1,73 ( $\pm 0,13$ )

Em relação à gordura epididimal dos animais (**tabela 13**), apenas aqueles em fase aguda e alimentados com a dieta banha de porco foi maior entre infectados e não infectados, havendo predomínio no ganho de gordura epididimal com a dieta com banha de porco. Durante a fase crônica recente da infecção não foram observadas diferenças entre os animais infectados e não infectados, apenas mantida a diferença induzida pela composição lipídica das dietas (observada entre os animais não infectados).

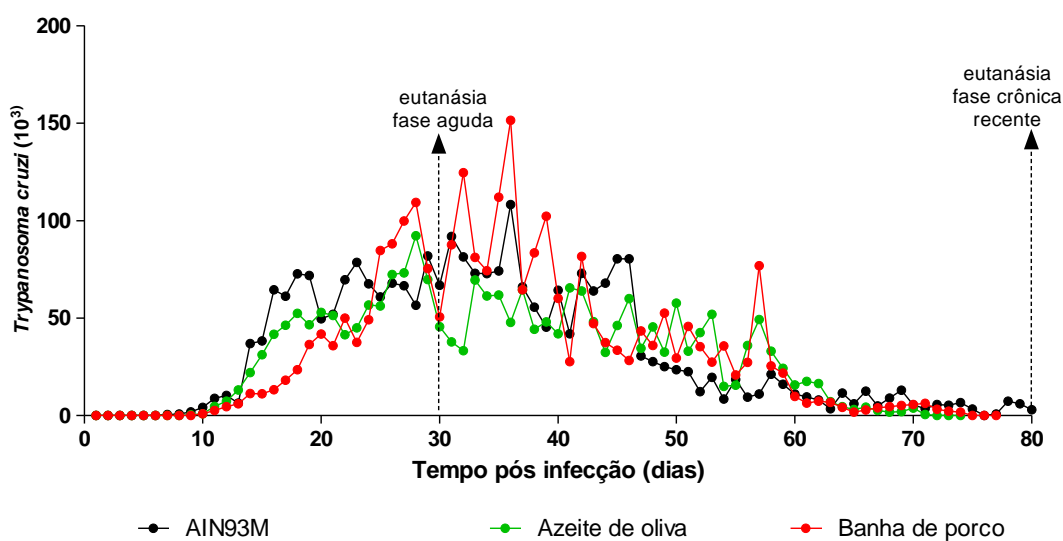
**Tabela 13. Massa do tecido adiposo epididimal em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0.05$ . Grupos identificados com letras similares apresentaram diferenças entre si (n=8).

Tecido adiposo epididimal (g)		
Fase aguda	Dieta AIN93M	0,26 ( $\pm 0,14$ ) <sup>b</sup>
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,25 ( $\pm 0,06$ )
	Dieta azeite de oliva	0,31 ( $\pm 0,17$ ) <sup>c</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,37 ( $\pm 0,09$ )
	Dieta banha de porco	0,50 ( $\pm 0,15$ ) <sup>abc</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,60 ( $\pm 0,33$ ) <sup>a</sup>
Fase crônica recente	Dieta AIN93M	0,24 ( $\pm 0,06$ ) <sup>d</sup>
	Dieta AIN93M + <i>T. cruzi</i>	0,32 ( $\pm 0,09$ )
	Dieta azeite de oliva	0,54 ( $\pm 0,38$ ) <sup>d</sup>
	Dieta azeite de oliva + <i>T. cruzi</i>	0,54 ( $\pm 0,18$ )
	Dieta banha de porco	0,86 ( $\pm 0,35$ ) <sup>d</sup>
	Dieta banha de porco + <i>T. cruzi</i>	0,63 ( $\pm 0,27$ )

## 5.2. Influência da composição das dietas na mortalidade e replicação de parasitos

Para avaliar a influência da composição lipídica das dietas de azeite de oliva e de banha de porco na mortalidade e replicação parasitária foram avaliados os dados de parasitemia (curva, área sob a curva, pico máximo, parasitemia pré-patente e patente), além de dados de sobrevivência e parasitismo cardíaco.

A **figura 4** apresenta a curva de parasitemia dos animais. Os dados parasitológicos estão detalhados na **tabela 14**. Não houve diferença referente a área sob a curva da parasitemia entre as distintas dietas, mas a banha de porco favoreceu o aumento da parasitemia pré-patente quando comparada à dieta controle AIN93M. Outro fato observado foi que a parasitemia patente diminuiu com ambas as dietas hiperlipídicas, quando comparadas à dieta controle, o que sugere uma resposta inflamatória eficiente, possivelmente mediada por mediadores lipídicos, neste período inicial da infecção.

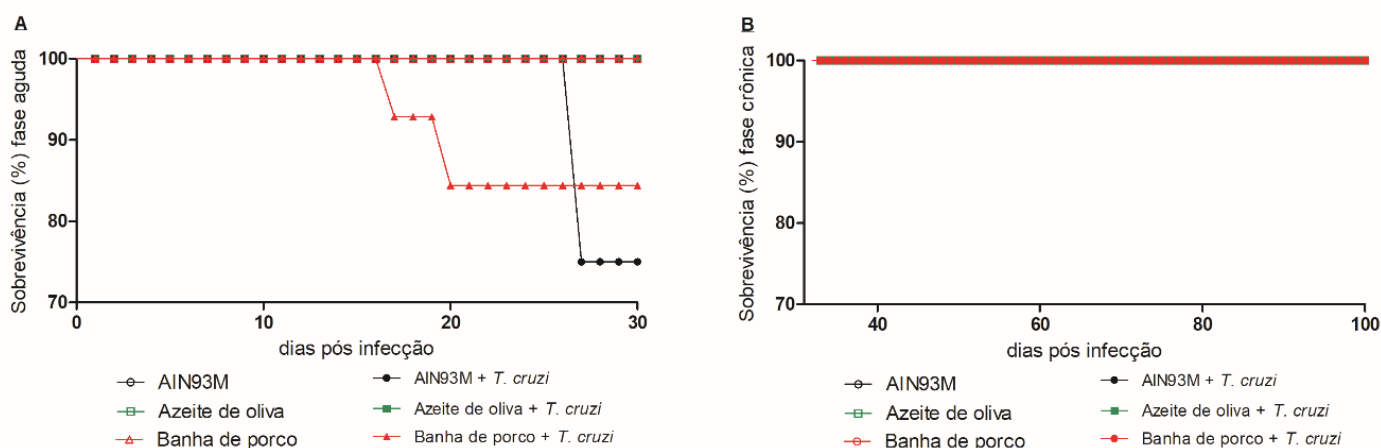


**Figura 4. Curva de parasitemia dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** Animais alimentados com dieta AIN93M em preto; alimentados com dieta AIN93M com alteração para azeite de oliva em verde; alimentados com dieta AIN93M com alteração para banha de porco em vermelho. Utilizou-se um n=16 animais até a eutanásia na fase aguda e um n=8 animais até eutanásia na fase crônica recente. Dados significativos para  $p < 0,05$ .

**Tabela 14. Dados parasitológicos de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos (n=8).** Letras semelhantes indicam diferenças entre os grupos. Dados significativos para  $p < 0,05$ .

	<i>AIN93M</i>	<i>Azeite de oliva</i>	<i>Banha de porco</i>
Área sob a curva	2655±295,9	2306±273,2	2432±285,9
Pico máximo	108,3±12,95	92,25±8,40	151,4±44,6
Parasitemia pré patente	9±0,53 <sup>a</sup>	10,56±0,37	11,86±0,61 <sup>a</sup>
Parasitemia patente	69,88±1,89 <sup>bc</sup>	60±1,15 <sup>b</sup>	59,83±2,65 <sup>c</sup>

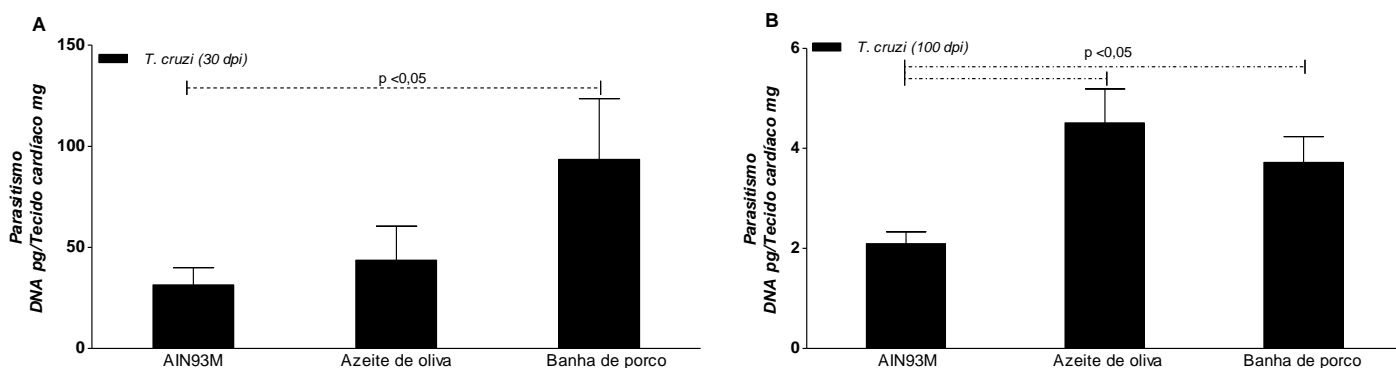
A **figura 5** apresenta as curvas de sobrevivência dos animais, sendo a **figura 5A** representativa dos dados em fase aguda. Animais alimentados com dieta com azeite de oliva não apresentaram mortalidade enquanto aqueles alimentados com dieta com banha de porco apresentaram mortalidade inferior ao grupo controle. Na **figura 5B** são mostrados os dados de fase crônica, mas não houve perda de animais em nenhum dos grupos.



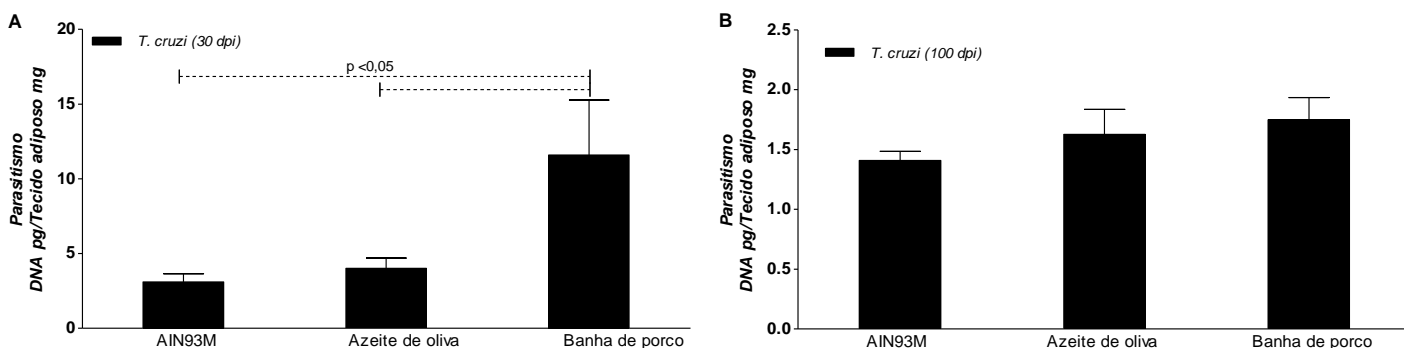
**Figura 5. Dados de sobrevivência dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos.** A: Dados de sobrevivência de camundongos de fase aguda. B: Dados de sobrevivência de animais de fase crônica recente. Animais alimentados com dieta normolipídica (preto); alimentados com dieta insaturada (verde); alimentados com dieta hiperlipídica (vermelho). A avaliação destes animais ocorreu na fase aguda (n=8) e na fase crônica recente (n=8). Valores significativos para  $p < 0,05$ .

As **figuras 6 e 7** apresentam os dados de parasitismo nos tecidos cardíaco e adiposo, respectivamente. No tecido cardíaco (**figura 6**) é possível observar que durante a fase aguda (**figura 6A**) a dieta com banha de porco provocou um aumento na carga parasitária quando comparado ao grupo alimentado com a dieta AIN93M e, durante a fase crônica recente (**figura 6B**), tanto a dieta com banha de porco, quanto a dieta com azeite de oliva propiciaram maior parasitismo no tecido cardíaco quando comparado ao grupo alimentado com a dieta AIN93M.

Em relação ao tecido adiposo é mostrado que os ácidos graxos presentes na dieta com banha de porco elevam os parasitos durante a fase aguda (**figura 7A**) mas não há interferência da composição lipídica durante a fase crônica recente



**Figura 6. Parasitismo no tecido cardíaco dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. A:** camundongos em fase aguda (n=8). **B:** camundongos em fase crônica recente (n=8). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .



**Figura 7. Parasitismo tecido adiposo dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. A:** camundongos em fase aguda (n=8). **B:** camundongos em fase crônica recente (n=8). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

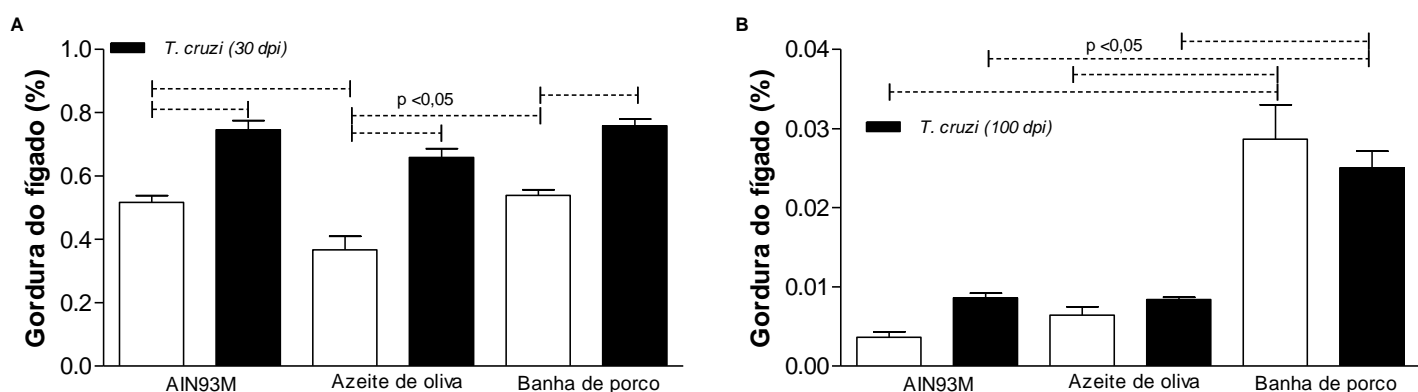
### 5.3. Interferência da composição das dietas ricas em ácido graxo nos tecidos hepático, cardíaco e adiposo de animais infectados pelo *T. cruzi*.

Para avaliar a interferência da composição lipídica das dietas azeite de oliva e banha de porco na patogênese dos tecidos hepático, cardíaco e adiposo, avaliou-se o percentual de gordura no fígado e a quantificação do infiltrado inflamatório nos demais tecidos avaliados.

### 5.3.1. Interferência da dieta no acúmulo de lipídios no fígado

A **figura 8** é referente aos dados de percentual de gordura do fígado, obtidos a partir da técnica de Folch e colaboradores (1957) e mostra que a infecção em fase aguda favorece o acúmulo de neste órgão, independente da dieta utilizada no tratamento. Porém, observou-se que a dieta azeite de oliva propiciou menor acúmulo de gordura hepática.

Na fase crônica, este perfil se altera, ficando os valores encontrados para os animais infectados e não infectados similares em comparação aos grupos de animais alimentados com a mesma dieta. Porém, houve maior acúmulo de gordura entre aqueles animais alimentados com dieta banha de porco, seja associado à infecção ou não.



**Figura 8. Percentual de gordura no fígado dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a dietas com diferentes ácidos graxos. A:** camundongos em fase aguda (n=8). **B:** camundongos em fase crônica recente (n=8). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

### 5.3.2. Interferência da dieta no infiltrado inflamatório nos tecidos cardíaco e adiposo

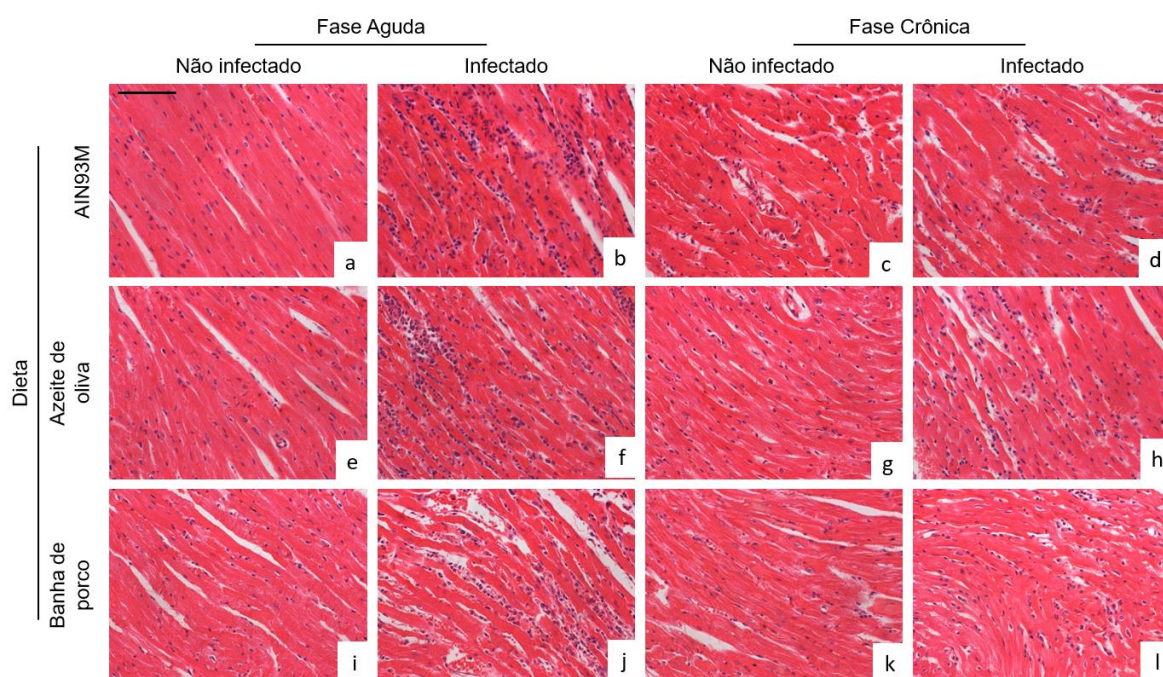
Foi observado que, independente da dieta, AIN93M, azeite de oliva ou banha de porco, o coração (**figuras 9 e 10**) e o tecido adiposo (**figuras 13 e 14**) dos animais não infectados não apresentaram infiltrado inflamatório relevante em ambos os tempos avaliados.

Animais infectados e submetidos à dieta AIN93M ou azeite de oliva e eutanasiados na fase aguda da infecção demonstraram processo inflamatório multifocal, de caráter moderado no coração, constituído principalmente por células mononucleares. Por outro lado, animais infectados e submetidos à dieta banha de porco apresentaram um processo inflamatório cardíaco discreto a moderado, também com perfil predominante de células inflamatórias mononucleares.

O tecido adiposo dos animais infectados, submetidos à dieta AIN93M ou azeite de oliva apresentou um infiltrado inflamatório multifocal de caráter moderado à intenso na fase aguda

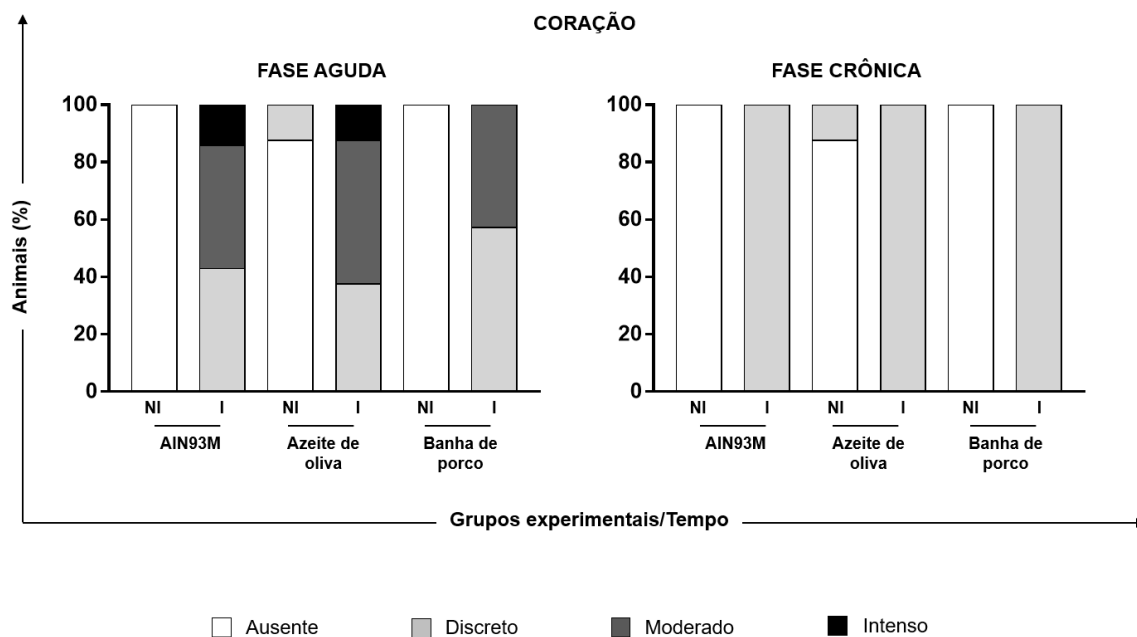
da infecção. Contudo, animais infectados e submetidos à dieta banha de porco, na fase aguda, similar ao observado com o tecido cardíaco, apresentaram redução na intensidade do processo inflamatório de discreto a moderado.

Todos os animais infectados, independente da dieta, mostraram inflamação discreta no tecido cardíaco (**figuras 11 e 12**) e no tecido adiposo (**figuras 11 e 12**) durante a fase crônica recente da infecção, sendo que no coração, a região atrial e o pericárdio destacaram-se pela predominância deste infiltrado inflamatório, enquanto no tecido adiposo, o mesmo apresentou-se distribuído ao longo da região estromal.

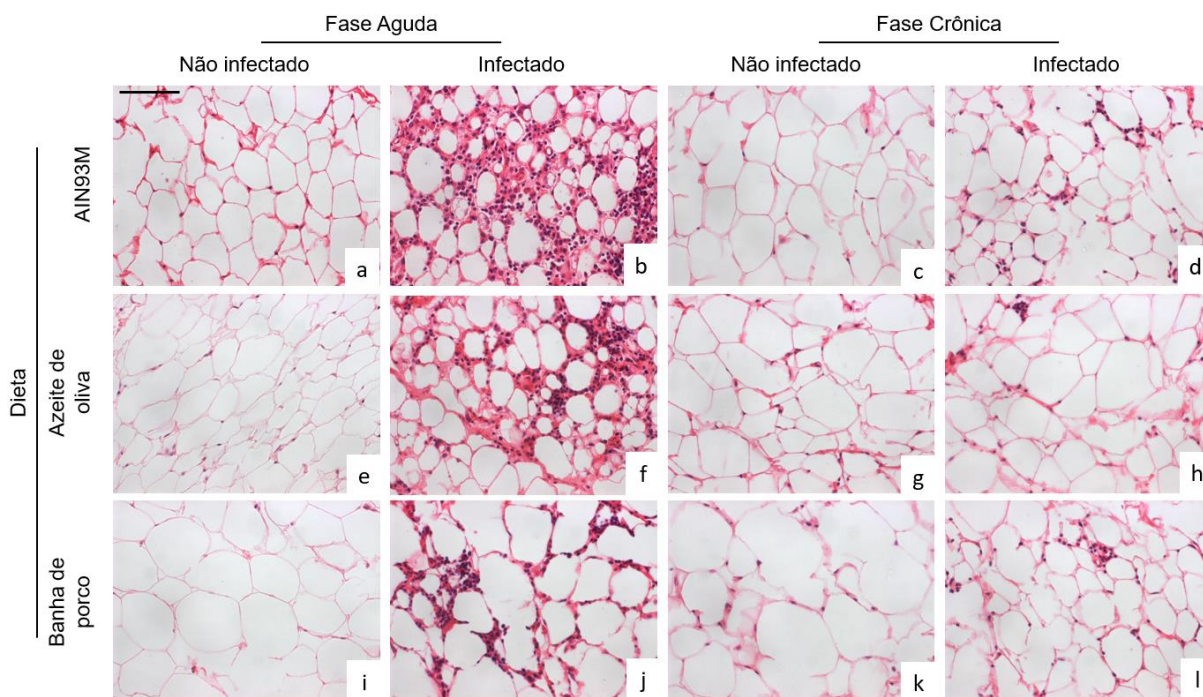


**Figura 9.** Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos à dieta banha de porco e azeite de oliva aos 30 e 100 dias de infecção. Aspecto histológico cardíaco normal observado em animais não infectados e submetidos à dieta AIN93M (a, c), azeite de oliva (e, g) ou banha de porco (i, k) em período correspondente à fase aguda ou crônica da infecção com o *T. cruzi*. Processo inflamatório multifocal de caráter moderado em animais infectados e submetidos à dieta AIN93M (b) ou Azeite de oliva (f) e de caráter discreto a moderado em animais infectados e submetidos à dieta Banha de porco (j) na fase aguda da infecção. Processo inflamatório multifocal de caráter discreto em animais infectados, independente da constituição da dieta, AIN93M (d) ou Azeite de oliva (h) ou Banha de porco (l) na fase crônica da infecção. O infiltrado inflamatório foi constituído, principalmente, por células mononucleares, linfócitos e macrófagos. Hematoxilina-Eosina. Barra=50mm.

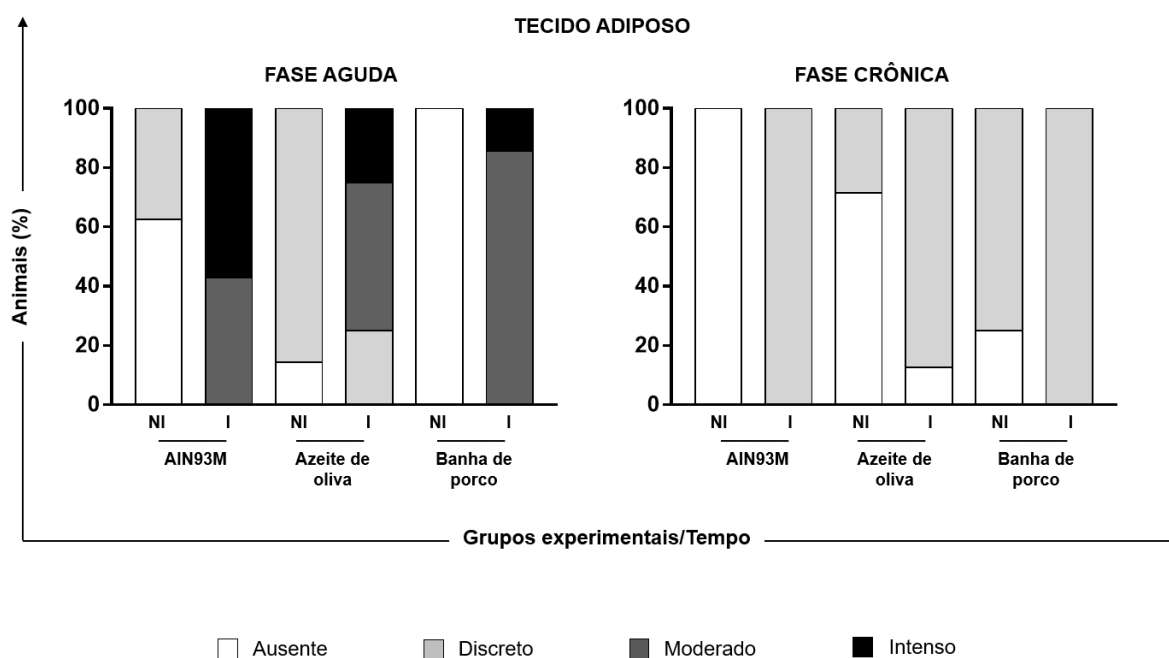




**Figura 10. Análise qualitativa da histologia do tecido cardíaco.** Os dados representam o percentual a partir da classificação histológica dos grupos quanto a presença de processo inflamatório. Caracterização do infiltrado inflamatório em escala de cinza sendo ausente em branco; discreto em cinza claro, moderado em cinza escuro e intenso em preto.



**Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido adiposo de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos à banha de porco e azeite de oliva aos 30 e 100 dias de infecção.** Aspecto histológico normal em animais não infectados e submetidos a dieta AIN93M (a, c), Azeite de oliva (e, g) ou Banha de porco (i, k) em período correspondente à fase aguda ou crônica da infecção com *T. cruzi*. Processo inflamatório multifocal de caráter moderado a intenso em animais infectados e submetidos à dieta AIN93M (b) ou Azeite de oliva (f) e de caráter moderado em animais infectados e submetidos à dieta Banha de porco (j) na fase aguda da infecção. Processo inflamatório multifocal de caráter discreto em animais infectados, independente da constituição da dieta, AIN93M (d) ou Azeite de oliva (h) ou Banha de porco (l) na fase crônica da infecção. O infiltrado inflamatório foi constituído, principalmente, por células mononucleares, linfócitos e macrófagos. Hematoxilina-Eosina. Barra=50mm.



**Figura 12. Análise qualitativa da histologia do tecido adiposo.** Dados apresentados em percentual a partir da classificação histológica dos grupos quanto a presença de processo inflamatório. Caracterização do infiltrado inflamatório apresentado em escala de cinza sendo ausente em branco; discreto em cinza claro, moderado em cinza escuro e intenso em preto.

#### 5.4. Interferência da dieta no *status redox* durante a infecção pelo *T. cruzi*

Para avaliar a participação da composição lipídica das dietas azeite de oliva e banha de porco no *status redox* foram dosados, em amostras de fígado, as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona total, glutatona oxidada e o marcador de dano proteína carbonilada.

A **figura 13** apresenta os dados de *status redox* na infecção pelo *T. cruzi* após o uso de diferentes dietas. Em relação à atividade da enzima catalase durante a fase aguda (**figura 13A**), observou-se que o parasito reduziu a ação da catalase quando comparados com os respectivos grupos não infectados. O uso da dieta com banha de porco associada à infecção induziu menor atividade da enzima, quando comparado aos demais grupos infectados.

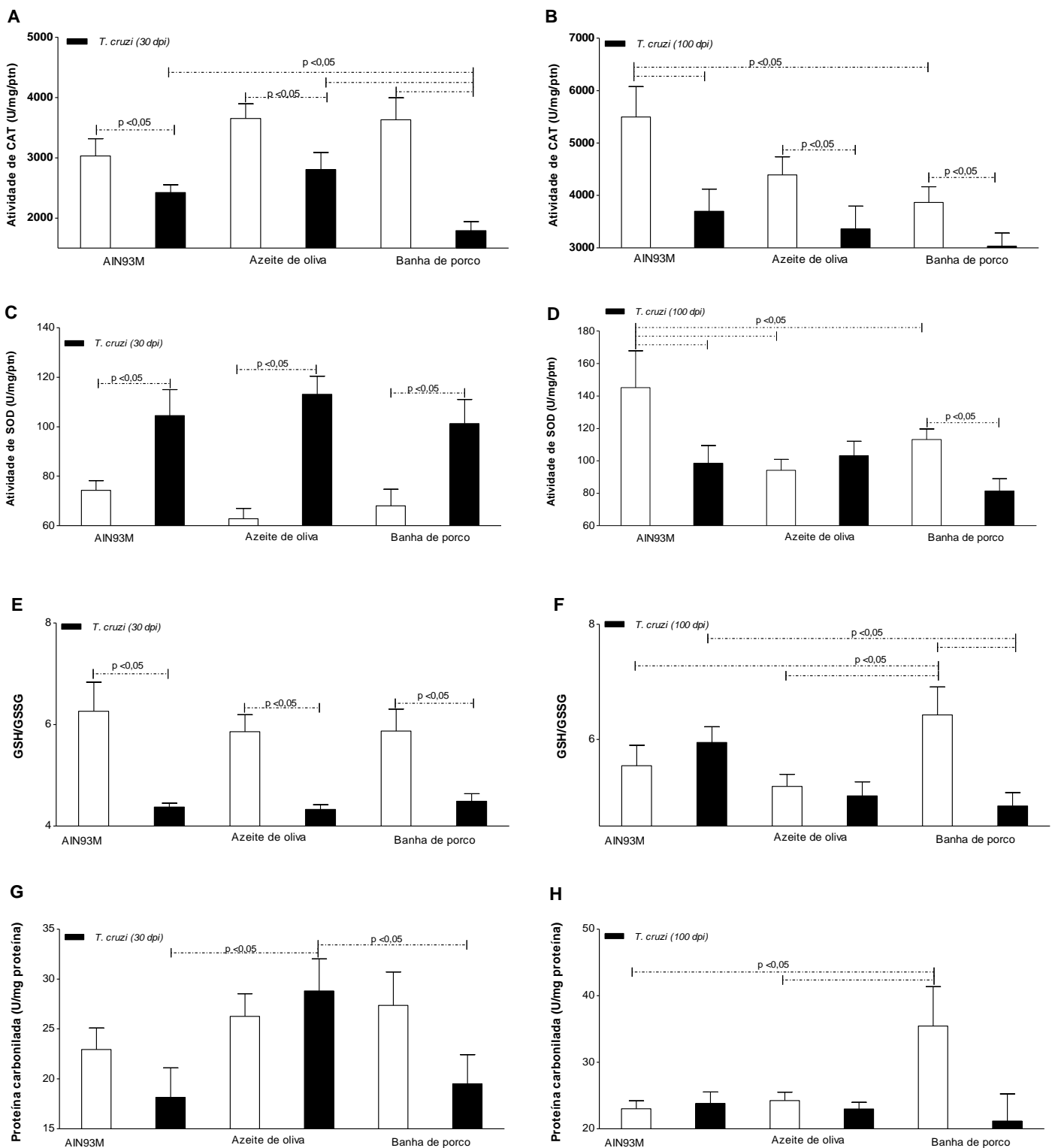
Quando este dado é comparado ao gráfico referente à atividade da enzima superóxido dismutase nos animais em fase aguda (**figura 13C**), observamos um comportamento contrastante ao apresentado pela catalase, com a infecção elevando a produção da enzima, independente da dieta utilizada. Por outro lado, como seria esperado um aumento conjunto da ação das duas enzimas, verificamos a possibilidade de a infecção atuar causando um desequilíbrio redox.

Quando analisada a razão da glutatona em fase aguda (**figura 13E**) verificamos que sua ação para controle do ciclo redox estava diminuída nos animais infectados, independente da dieta utilizada, fato que confirma a situação de desequilíbrio do status redox induzido pelo parasito. Neste sentido é possível reforçar a tentativa do parasito em desestabilizar o equilíbrio redox na fase inicial da infecção, como possível mecanismo de evasão do sistema imune.

Por fim, a **figura 13G** encerra o quadro da análise redox na fase aguda da infecção com os dados de proteína carbonilada e evidencia que a associação da dieta azeite de oliva com a infecção apresenta maiores níveis de proteína carbonilada em relação aos demais grupos de animais infectados. Sendo assim, os dados em fase aguda, relativos ao status redox, sugerem um possível dano celular, provocado pela associação da dieta azeite de oliva e infecção, possivelmente intensificado pela composição lipídica da dieta azeite de oliva que possui alta concentração de compostos monoinsaturados, mais susceptíveis a oxidação lipídica.

Quando analisados os dados referentes à infecção e às dietas na fase crônica recente, verificamos que os animais alimentados com dieta AIN93M apresentam elevados níveis de atividade de catalase (**figura 13B**), acompanhado de um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (**figura 13D**) dentre os animais não infectados.

Por outro lado, a ação da dieta banha de porco, em longo prazo, aumenta a relação entre as glutatonas oxidada e reduzida (**figura 13F**) nos animais não infectados quando comparado aos outros grupos que receberam as dietas AIN93M e azeite de oliva. Por último, a proteína carbonilada em fase crônica recente (**figura 13H**) mostrou que animais não infectados alimentados com dieta banha de porco apresentaram maiores valores desse marcador, contrastando com os resultados da dosagem em fase aguda. Juntos, estes dados de fase crônica recente sugerem que o consumo da dieta banha de porco, rica em ácidos graxos saturados, pode ser responsável por um dano celular causado pela inflamação provocada pela presença destes ácidos graxos no organismo, hipótese reforçada pela relação direta destes ácidos graxos com a ativação de vias inflamatórias como, por exemplo, a via do NFκ-β.



**Figura 13. Dosagem de marcadores de status redox.** **A:** atividade de catalase em 30 dias de infecção (n=8); **B:** atividade de catalase em 100 dias de infecção (n=8); **C:** atividade de superóxido dismutase em 30 dias de infecção (n=8); **D:** atividade de superóxido dismutase em 100 dias de infecção (n=8); **E:** razão das glutatonas oxidada e reduzida em 30 dias de infecção (n=8); **F:** razão das glutatonas oxidada e reduzida em 100 dias de infecção (n=8); **G:** dosagem de proteína carbonilada em 30 dias de infecção (n=8); **H:** dosagem de proteína carbonilada em 100 dias de infecção (n=8). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

## 5.5. Interferência da dieta hiperlipídica na produção de CCL2 e IL-10 frente à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* os tecidos adiposo e cardíaco

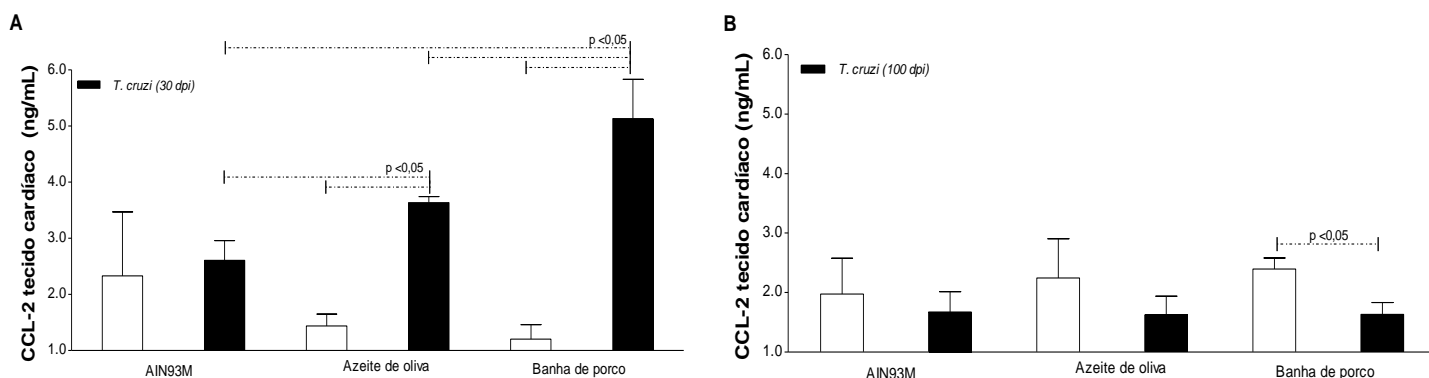
Para avaliar a contribuição das dietas azeite de oliva e banha de porco na produção de marcadores inflamatórios nos tecidos cardíaco e adiposo, foram avaliados os níveis de CCL-2 e IL-10.

### 5.5.1. Produção de CCL-2

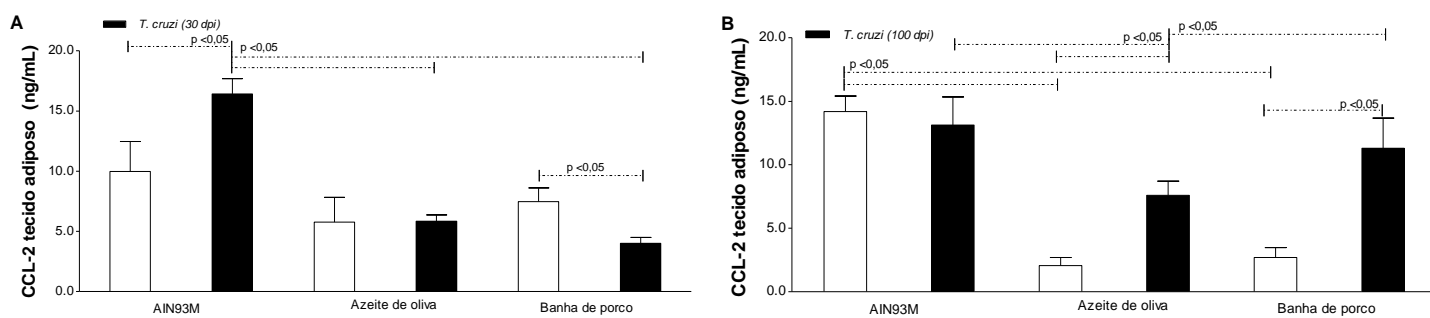
As **figuras 14 e 15** apresentam os resultados das dosagens de CCL-2 nos tecidos cardíaco e adiposo, respectivamente.

Na análise do tecido cardíaco, observamos que os animais infectados, alimentados com as dietas azeite de oliva ou banha de porco apresentaram maior produção de CCL-2, tanto quando comparado ao grupo não infectado quanto quando comparado ao grupo controle AIN93M (**figura 14A**). Porém, ao analisar os dados referentes ao tecido adiposo na fase aguda (**figura 15A**), observamos que os animais infectados, alimentados com a dieta banha de porco, apresentaram menor produção desta quimiocina, quando comparado ao grupo infectado alimentado com a dieta AIN93M.

Na fase crônica recente da infecção, observamos que a produção desta quimiocina apresentou-se reduzida no tecido cardíaco de animais infectados e alimentados com a dieta banha de porco (**figura 14B**). Porém, no mesmo período da infecção os animais infectados, e alimentados com a dieta azeite de oliva apresentaram redução da mesma CCL-2 no tecido adiposo (**figura 15B**).



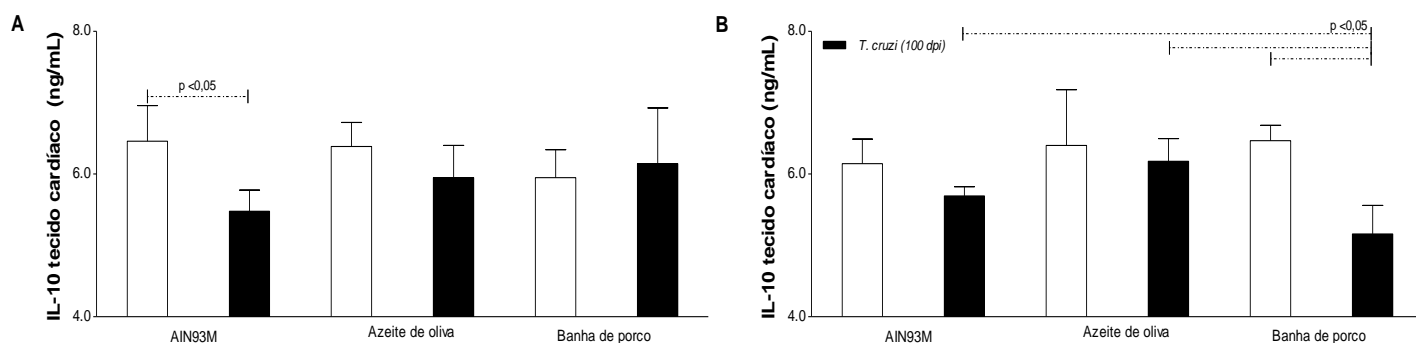
**Figura 14. Produção de CCL-2 no tecido cardíaco.** A: produção de CCL-2 no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); B: produção de CCL-2 no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .



**Figura 15. Produção de CCL-2 no tecido adiposo.** **A:** produção de CCL-2 no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); **B:** produção de CCL-2 no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

### 5.5.2. Produção de IL-10

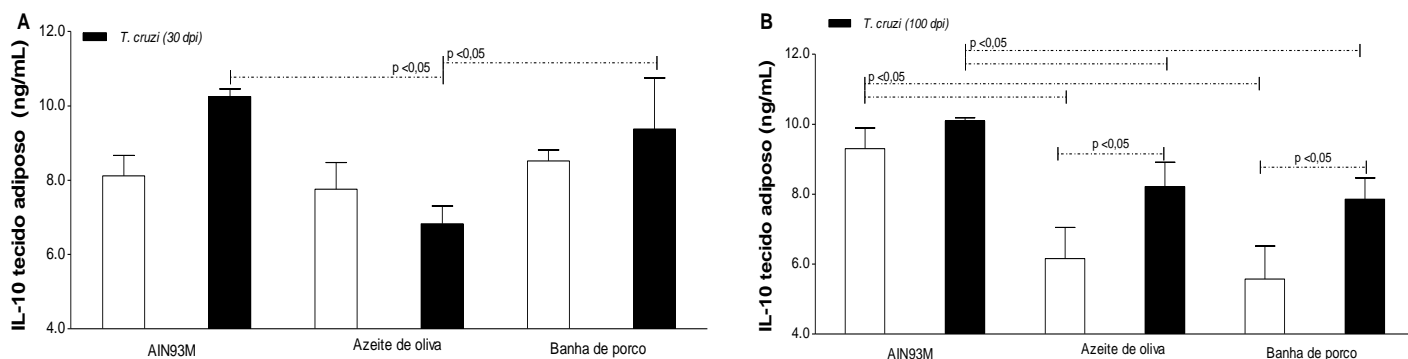
Em relação à produção da IL-10 no tecido cardíaco, verificamos que na fase aguda (**figura 16A**), não houve alteração nos grupos alimentados com as dietas azeite de oliva ou banha de porco, e, na fase crônica recente da infecção (**figura 16B**), observamos que animais infectados e alimentados com a dieta banha de porco apresentaram valores inferiores aos demais grupos infectados.



**Figura 16. Produção de IL-10 no tecido cardíaco.** **A:** produção de IL-10 no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **B:** produção de IL-10 no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

Já em relação às dosagens no tecido adiposo (**figura 17**), percebemos que na fase aguda (**figura 17A**), os animais infectados, e alimentados com dieta azeite de oliva, apresentaram menores valores que os infectados alimentados com as demais dietas. Na fase crônica recente (**figura 17B**), tanto os animais, infectados ou não, alimentados com a dieta azeite de oliva,

quanto os alimentados com a dieta banha de porco, apresentaram menores valores que os alimentados com a dieta AIN93M.



**Figura 17. Produção de IL-10 no tecido adiposo.** A: produção de IL-10 no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); B: produção de IL-10 no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

## 5.6. Ação da dieta rica em ácidos graxos na expressão de genes envolvidos nas vias inflamatórias intracelulares

Para avaliar a ação das dietas ricas em ácidos graxos (dietas azeite de oliva e banha de porco) na expressão de genes relacionados à ativação de vias inflamatórias, foram dosados nos tecidos cardíaco e adiposo, os seguintes genes: *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *Foxp3*, *Irak-1*, *Ppar- $\alpha$* , *Ppar- $\gamma$* , *Smad-2*, *Smad-3* e *Stat-6*.

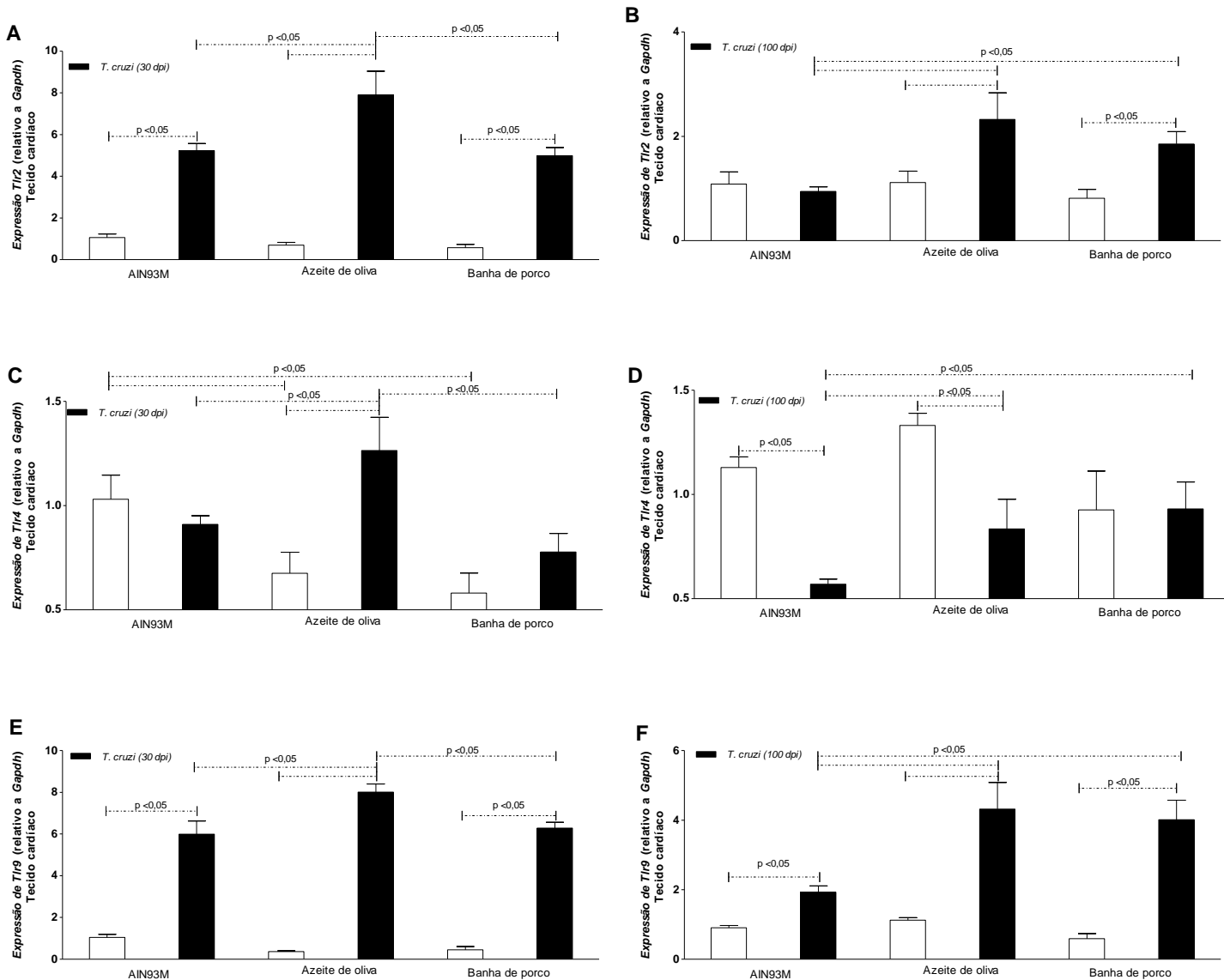
### 5.6.1. Receptores do tipo *Toll* 2, 4 e 9

As **figuras 18 e 19** apresentam os dados de expressão de *Toll* 2, 4, 9 nos tecidos cardíaco e adiposo, respectivamente. Nas dosagens realizadas no tecido cardíaco, em fase aguda da infecção (**figuras 18A, C e**), os grupos de animais infectados apresentaram maior expressão dos receptores do tipo *Toll*-2, -4 e -9, quando comparados ao respectivo controle não infectado, independentemente da dieta utilizada. As expressões destes receptores foram maiores dentre os animais infectados alimentados com a dieta azeite de oliva, quando comparados aos infectados alimentados com as demais dietas.

Durante a fase crônica recente da infecção, os animais infectados, e alimentados com a dieta azeite de oliva ou banha de porco, apresentam maiores valores do *TLR*-2 em comparação aos não infectados. Os valores expressos pelos grupos alimentados com estas dietas, também foram superiores aos apresentados pelo grupo infectado alimentado com a dieta controle

AIN93M (**figura 18B**). Em relação ao *TLR-4* (**figura 18D**), houve redução na expressão tanto no grupo de animais infectados que recebeu a dieta AIN93M, quanto no grupo infectado alimentado com a dieta azeite de oliva, quando comparado ao respectivo controle não infectado. Os valores de *TLR-4* expressos pelos animais infectados alimentados com a dieta banha de porco foram maiores quando comparado ao apresentado pela dieta controle AIN93M.

Por fim, o *TLR-9* na fase crônica recente (**figura 18F**) manteve perfil similar ao da fase aguda, com maiores valores de expressão entre animais infectados, quando comparados ao respectivo controle não infectado. Os animais infectados, alimentados tanto com a dieta azeite de oliva quanto alimentados com a dieta banha de porco, expressaram maiores valores deste receptor quando comparado ao grupo infectado alimentado com a dieta controle AIN93M.



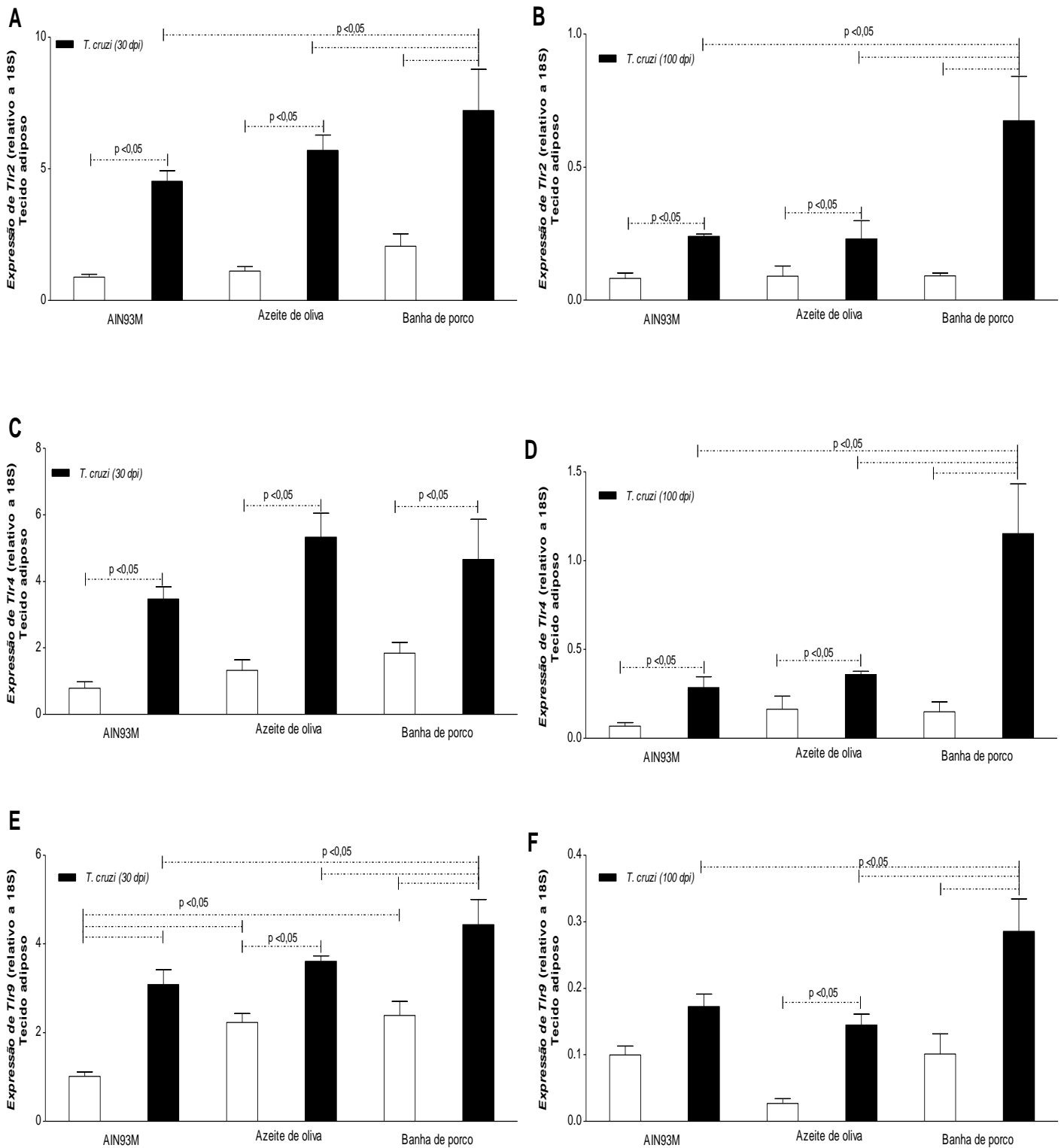
**Figura 18. Expressão de receptores do tipo Toll no tecido cardíaco.** A: expressão de *TLR-2* em 30 dias de infecção (n=5); B: expressão de *TLR-2* em 100 dias de infecção (n=5); C: expressão de *TLR-4* em 30 dias de infecção (n=5); D: Expressão de *TLR-4* em 100 dias de infecção (n=5); E: expressão de *TLR-9* em 30 dias de infecção (n=5); F:



expressão de *TLR-9* em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

Em relação à análise destes receptores no tecido adiposo (**figura 19**) observou-se que na fase aguda da infecção, independentemente da dieta, a infecção pelo *T. cruzi* elevou a expressão dos receptores do tipo *Toll-2*, porém a dieta banha de porco induziu maior expressão em relação às demais dietas (**figura 19A**). Os receptores do tipo *Toll-4*, na fase aguda (**figura 19C**) também foram elevados devido à infecção pelo parasito, mas sem apresentar diferenças entre as dietas. Por fim, ainda na fase inicial da infecção, os receptores do tipo *Toll-9* apresentaram-se elevados entre os animais infectados quando comparados com o respectivo controle (**figura 19E**). Porém, a dieta banha de porco apresentou perfil maior de expressão deste receptor, quando comparado aos demais grupos de animais infectados submetidos às diferentes dietas. Por fim, observamos que apenas a presença dos ácidos graxos das dietas azeite de oliva e banha de porco já proporcionaram aumento da expressão de *TLR-9*.

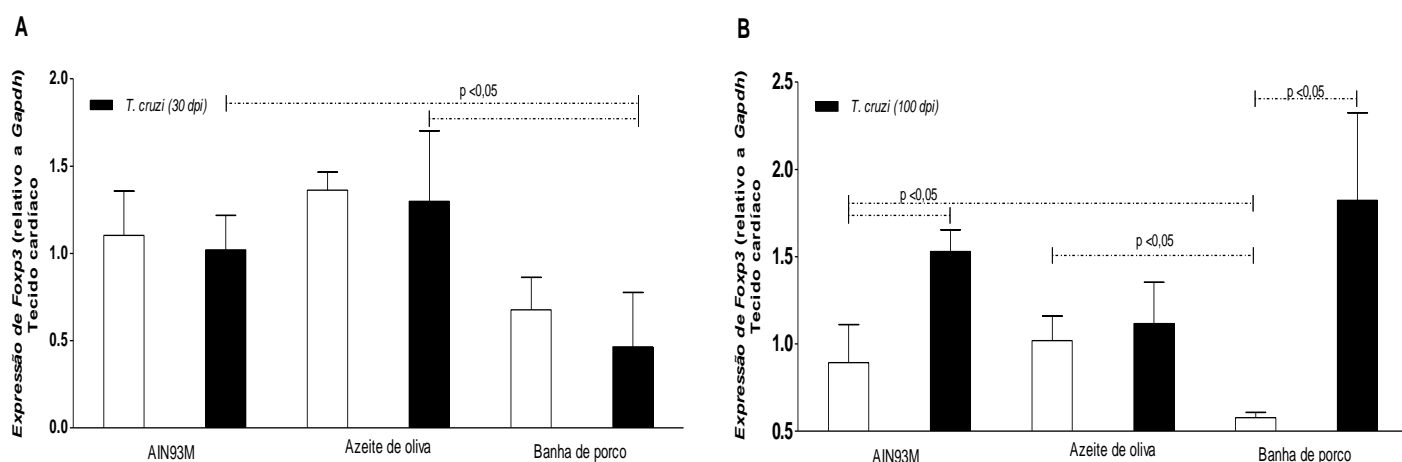
Durante a fase crônica recente da infecção observou-se que os animais infectados, alimentados com a dieta banha de porco apresentaram maior expressão de todos os receptores do tipo *Toll* analisados -2, -4 e -9 (**figuras 19B, D e F** respectivamente). Ao contrário do observado nas análises do tecido cardíaco, a dieta banha de porco favoreceu maior ativação dos receptores do tipo *Toll* -2, -4 e -9, no tecido adiposo dos animais, tanto na fase aguda quanto na fase crônica.



**Figura 19. Expressão de receptores do tipo *Toll* no tecido adiposo.** **A:** expressão de *TLR-2* em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão de *TLR-2* em 100 dias de infecção (n=5); **C:** expressão de *TLR-4* em 30 dias de infecção (n=5); **D:** Expressão de *TLR-4* em 100 dias de infecção (n=5); **E:** expressão de *TLR-9* em 30 dias de infecção (n=5); **F:** expressão de *TLR-9* em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

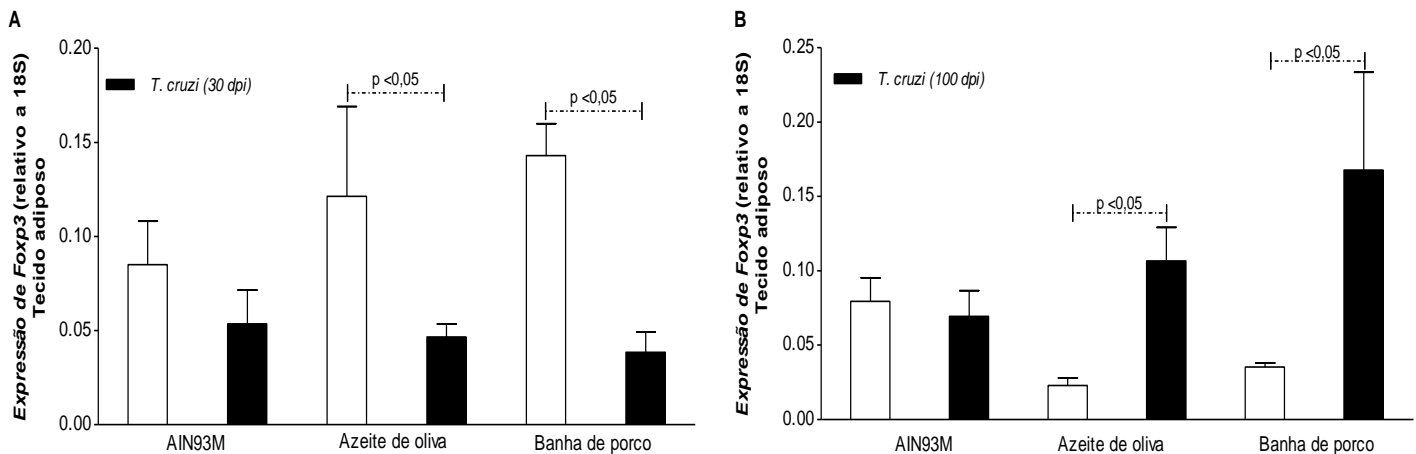
### 5.6.2. Expressão de *Foxp3*

A expressão do fator de transcrição *Foxp3* no tecido cardíaco (**figura 20**) foi menor no grupo de camundongos infectados e alimentados com a dieta banha de porco, quando comparado aos grupos infectados alimentados com as dietas AIN93M e azeite de oliva, na fase aguda da infecção (**figura 20A**). Porém, quando analisados os dados na fase crônica recente (**figura 20B**), os animais infectados, alimentados com a dieta banha de porco expressaram maiores valores de *Foxp3* quando comparado ao respectivo controle.



**Figura 20. Expressão de *Foxp3* no tecido cardíaco.** **A:** expressão de *Foxp3* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Foxp3* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

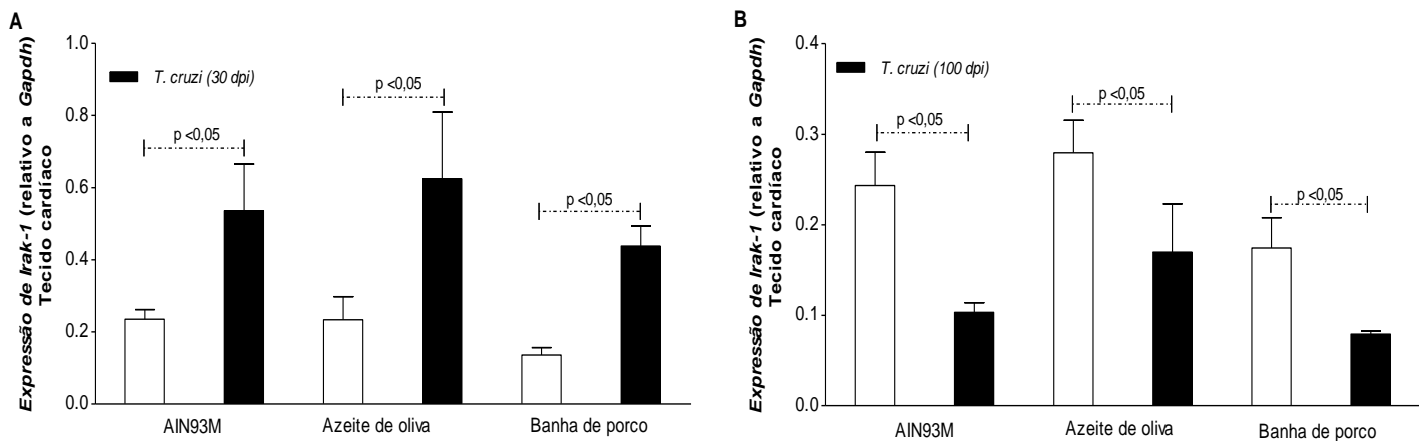
Já na análise do tecido adiposo (**figura 21**), a expressão do *Foxp3* mostrou-se menor tanto no grupo de animais que recebeu a dieta azeite de oliva quanto entre aqueles que receberam a dieta banha de porco, na fase inicial da infecção, quando comparados com os respectivos controles não infectados (**figura 21A**). Após 100 dias de infecção (**figura 21B**), a avaliação da expressão do fator *Foxp3*, foi maior tanto no grupo infectado alimentado com a dieta azeite de oliva, quanto no grupo infectado alimentado com a dieta banha de porco, quando comparado ao respectivo controle.



**Figura 21. Expressão de *Foxp3* no tecido adiposo.** **A:** expressão de *Foxp3* no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Foxp3* no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

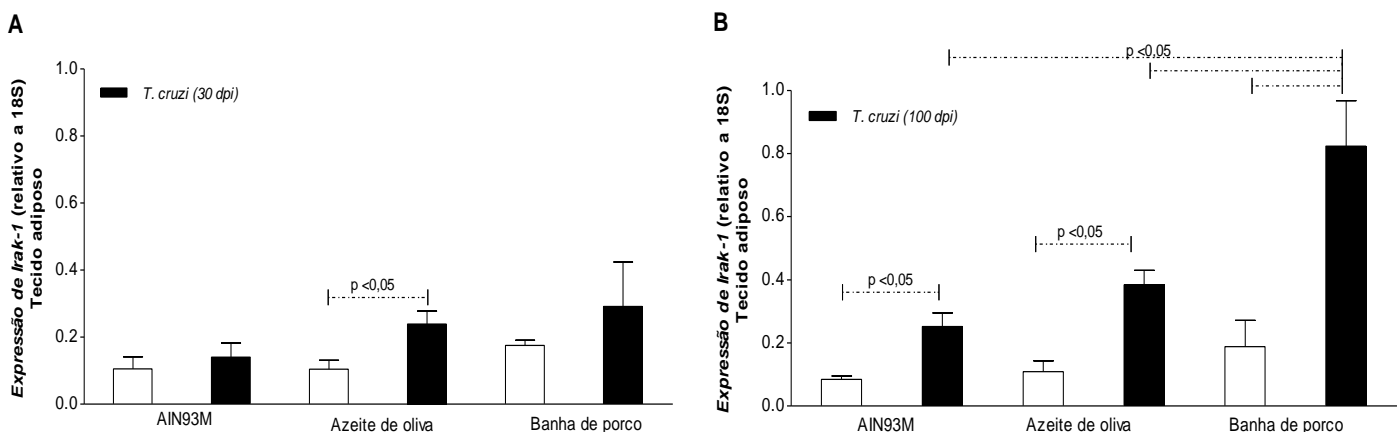
### 5.6.3. Expressão de *Irak-1*

Nas **figuras 22 e 23** são apresentados os resultados da dosagem de expressão de *Irak-1* nos tecidos cardíaco e adiposo, respectivamente. Nas dosagens da fase aguda realizadas no tecido cardíaco (**figura 22A**), a expressão de *Irak-1* foi maior entre os animais infectados, quando comparados aos respectivos controles. Já os dados de expressão de fase crônica recente, mostraram que os animais infectados apresentaram menores valores de expressão quando comparados aos respectivos controles. (**figura 22B**). Em nenhum dos dois momentos da infecção foram observadas diferenças ocasionadas pela composição das dietas.



**Figura 22. Expressão de *Irak-1* no tecido cardíaco.** A: expressão de *Irak* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); B: expressão *Irak* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

A **figura 23A** demonstra que animais infectados, em fase aguda da infecção, que foram alimentados com a dieta azeite de oliva apresentaram maior expressão da *Irak-1*, quando comparado ao respectivo controle não infectado. Na análise de fase crônica recente (**figura 23B**), os grupos infectados, independente da dieta utilizada, apresentaram maior expressão do gene, quando comparado ao respectivo controle, e, o grupo alimentado com a dieta banha de porco, expressou maiores valores de *Irak-1* que os grupos infectados alimentados com as demais dietas.

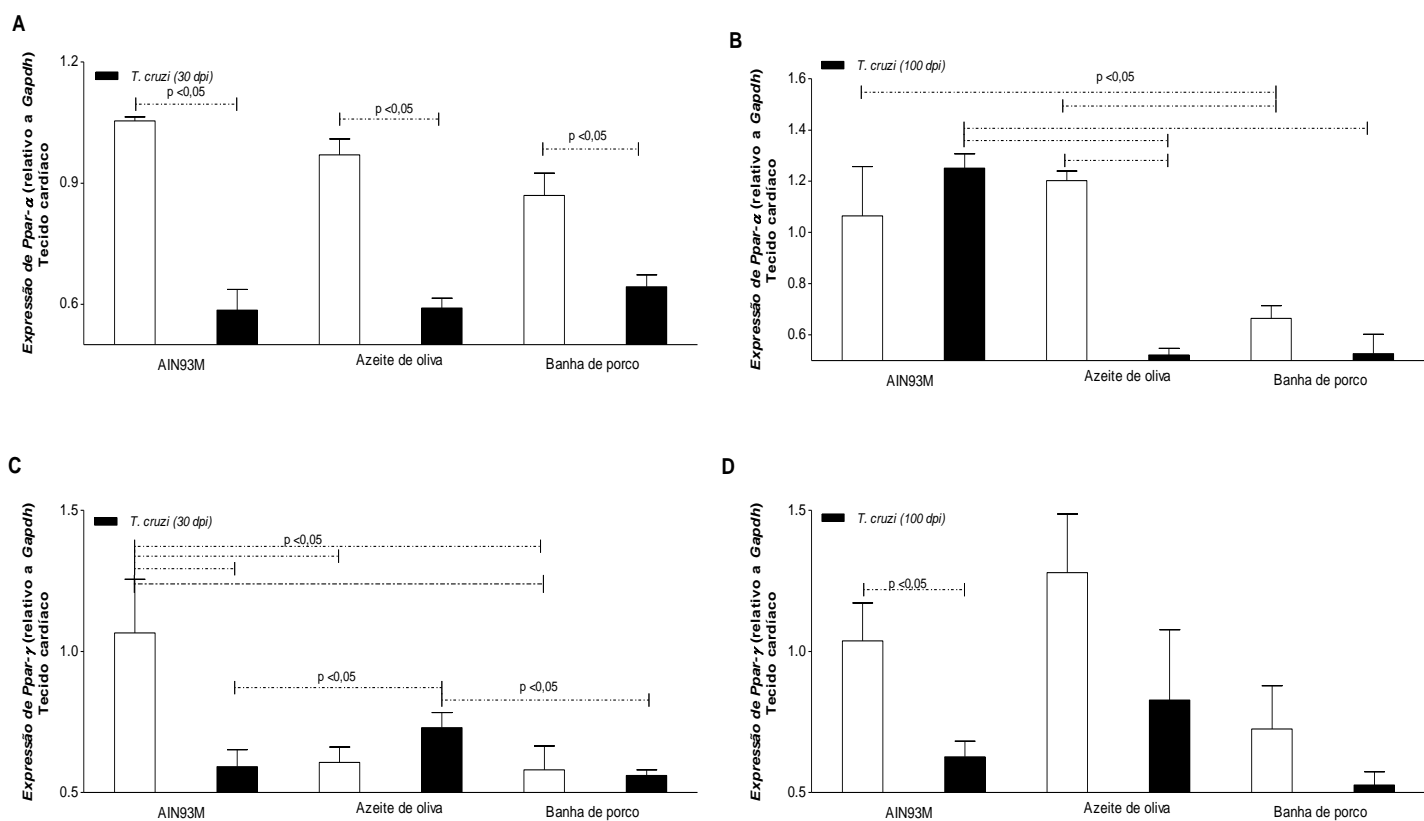


**Figura 23. Expressão de *Irak-1* no tecido adiposo.** A: expressão de *Irak* no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); B: expressão *Irak* no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

#### 5.6.4. Expressão de *Ppar-alfa* e *Ppar-gama*

A **figura 24** apresenta os dados da expressão de *Ppar-alfa* (**figuras 24A-B**) e *Ppar-gama* (**figuras 24C-D**) no tecido cardíaco. Em relação ao *Ppar-alfa*, durante a fase aguda do experimento, foi observada redução na expressão (**figura 24A**) nos grupos de animais infectados, independente da dieta, em relação ao respectivo controle não infectado. Não houve diferença entre os grupos de animais infectados alimentados com as diferentes dietas. Já durante a fase crônica recente (**figura 24B**), o *Ppar-alfa*, na ausência da infecção, foi menos expresso no grupo alimentado com a dieta banha de porco, e, na presença da infecção, as duas dietas, ricas em ácidos graxos (monoinsaturados – azeite de oliva e saturados – banha de porco), apresentaram menores valores de expressão do gene quando comparado ao grupo controle alimentado com a dieta AIN93M.

Ainda sobre a **figura 24**, mas em relação às dosagens do *Ppar-gama*, os animais infectados de fase aguda (**figura 24C**) e alimentados com dieta azeite de oliva apresentaram maior expressão do *Ppar-gama* quando comparado tanto ao grupo alimentado com a dieta AIN93M, quanto quando comparado ao grupo alimentado com a dieta banha de porco. Por outro lado, na ausência da infecção pelo *T. cruzi*, as dietas azeite de oliva e banha de porco, exibiram menor expressão do *Ppar-gama*, quando comparado ao controle AIN93M. Durante a fase crônica recente (**figura 24D**), a expressão de *Ppar-γ* apresentou diferença apenas no grupo que recebeu a dieta AIN93M, havendo redução naqueles animais infectados pelo *T. cruzi* em relação aos animais controles não infectados.

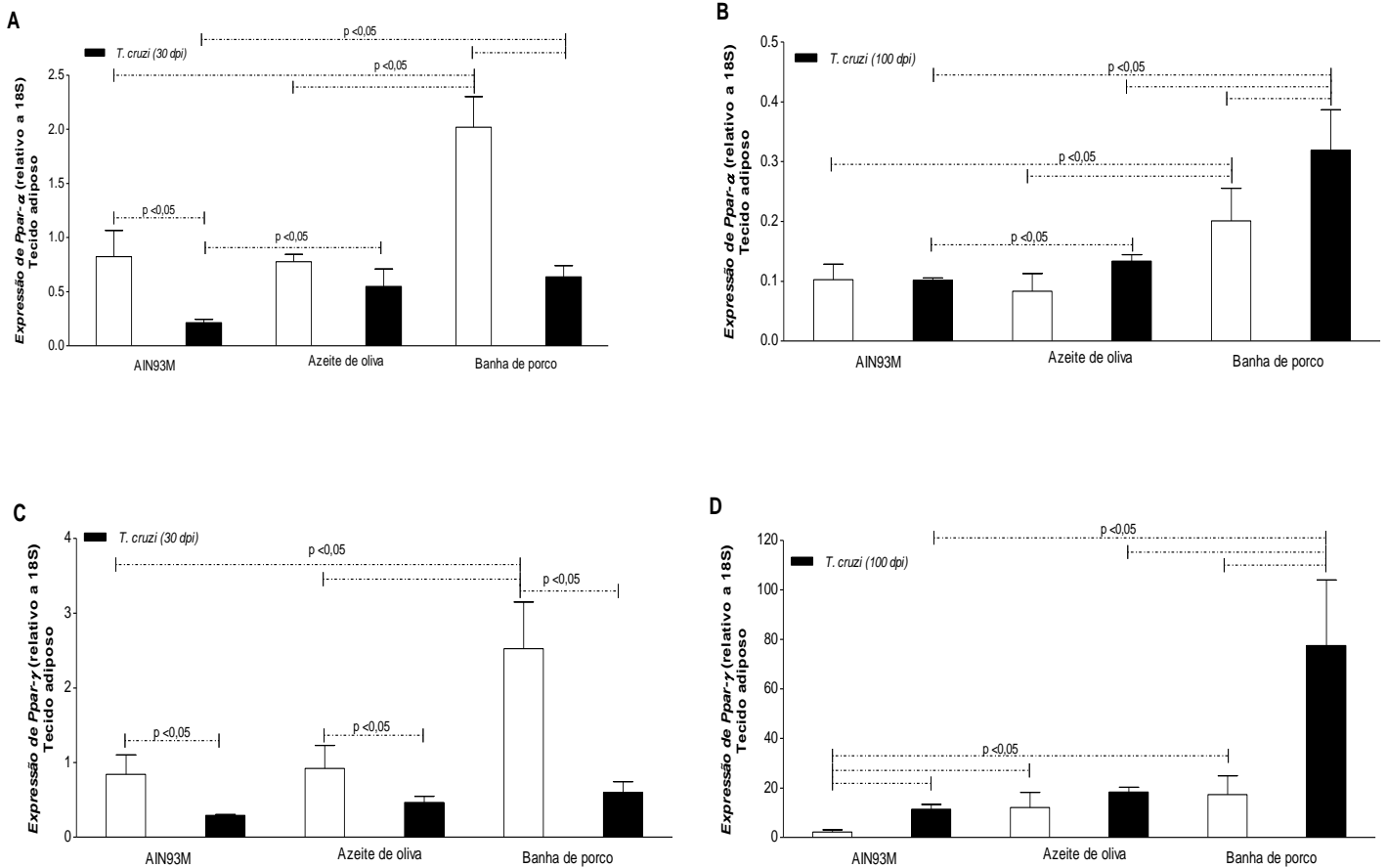


**Figura 24. Expressão dos *Ppar*'s *alfa* e *gama* no tecido cardíaco.** **A:** expressão de *Ppar-alfa* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Ppar-alfa* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5); **C:** expressão de *Ppar-gama* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **D:** Expressão de *Ppar-gama* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

A **figura 25** apresenta o resultado das análises da expressão de *Ppar-alfa* e *Ppar-gama* no tecido adiposo dos animais. Durante a fase aguda e considerando os animais sem a infecção com o *T. cruzi*, observou-se aumento do *Ppar-alfa* apenas nos animais que receberam a dieta banha de porco (**figura 25A**), não havendo diferenças entre aqueles animais infectados, independente da dieta. Durante a fase crônica recente da infecção (**figura 25B**), o padrão de expressão para os animais não infectados se manteve similar ao encontrado na fase aguda da infecção. Porém, naqueles grupos onde os animais foram infectados pelo *T. cruzi*, ambas as dietas (azeite de oliva e banha de porco) induziram aumento na expressão desta proteína em relação à dieta controle AIN93M, porém o padrão de expressão induzido pela dieta com banha foi duas vezes maior.

A expressão de *Ppar-gama* no tecido adiposo durante a fase aguda (**figura 25C**) seguiu o perfil de expressão encontrado para o *Ppar-alfa*. Porém, na fase crônica recente e,

considerando os animais infectados pelo *T. cruzi*, apenas aqueles submetidos à dieta banha de porco apresentaram níveis elevados de expressão desta proteína (**figura 25D**).



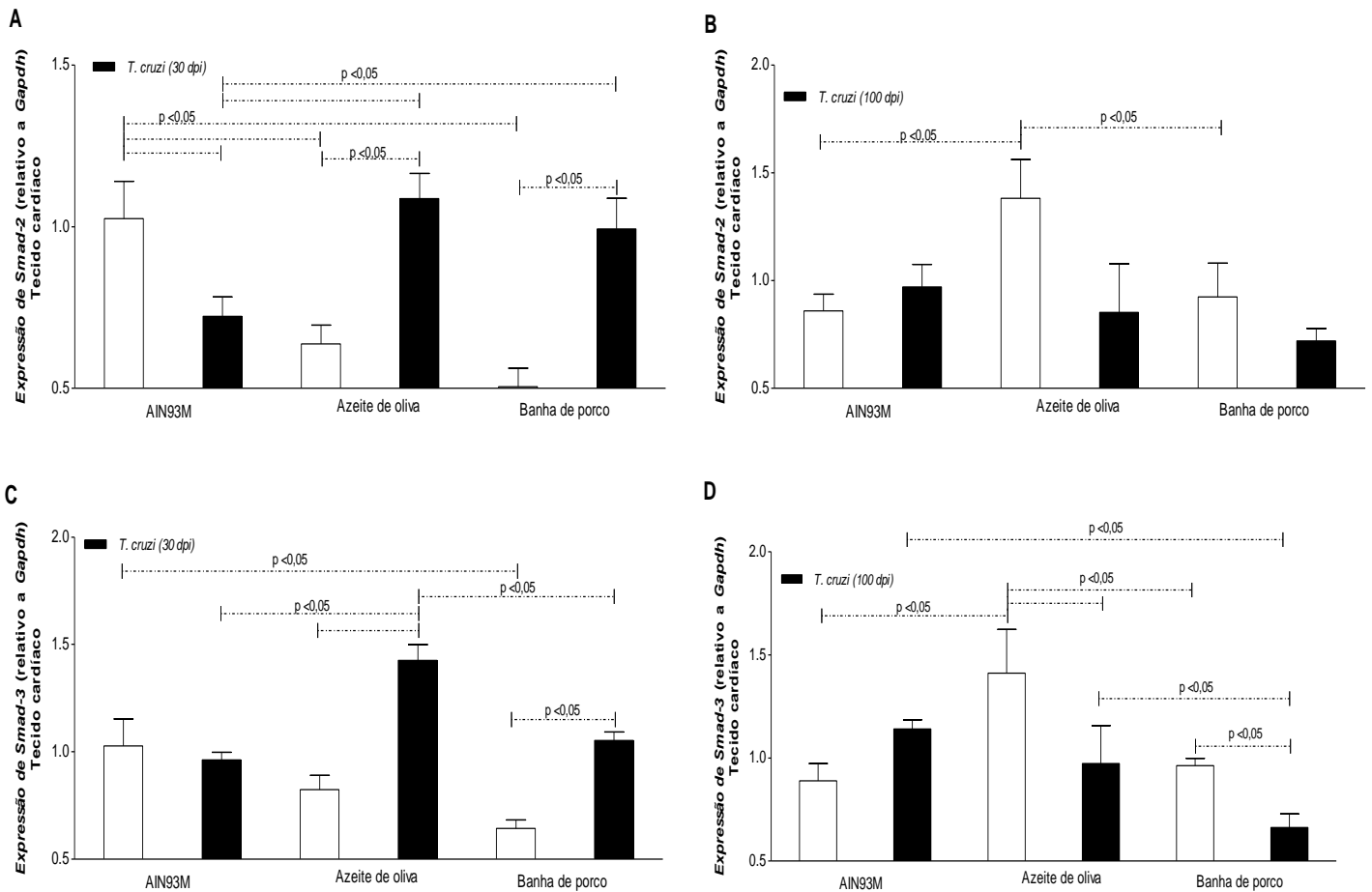
**Figura 25. Expressão dos Ppar's alfa e gama no tecido adiposo.** A: expressão de *Ppar-alfa* no tecido adiposo em 30 dias de infecção; B: expressão *Ppar-alfa* no tecido adiposo em 100 dias de infecção; C: expressão de *Ppar-gama* no tecido adiposo em 30 dias de infecção; D: Expressão de *Ppar-gama* no tecido adiposo em 100 dias de infecção. Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

#### 5.6.5. Expressão das *Smads* 2 e 3

Os resultados referentes à expressão das *Smads* -2 e -3, no tecido cardíaco, estão representados na **figura 26**. Na fase aguda da infecção, ambas as dietas ricas em ácidos graxos (azeite de oliva e banha de porco) induziram aumento na expressão da *Smad-2* (**figura 26 A**) nos animais infectados pelo *T. cruzi*. O mesmo perfil foi observado para a *Smad-3* também na fase aguda (**figura 26 C**). Já na fase crônica recente, não houve diferença entre a expressão do



gene da *Smad-2* com as diferentes dietas nos animais infectados (**figura 26 B**), porém, houve redução da expressão da *Smad-3* (**figura 26 D**) com a dieta banha de porco.

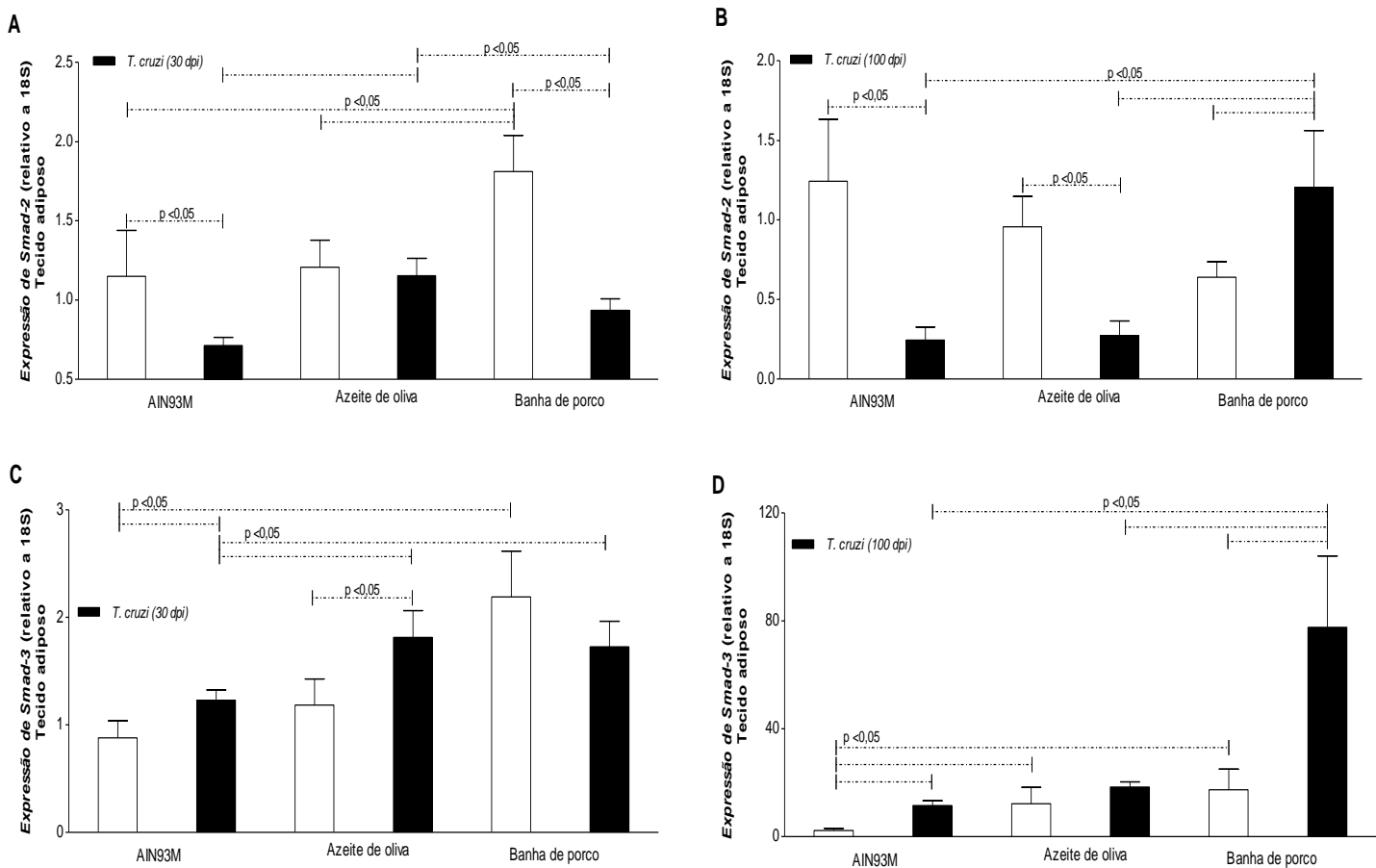


**Figura 26. Expressão das Smad's 2 e 3 no tecido cardíaco.** **A:** expressão de *Smad-2* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Smad-2* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5); **C:** expressão de *Smad-3* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **D:** Expressão de *Smad-3* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para p<0.05.

A **figura 27** apresenta os dados relativos à expressão das *Smads* -2 e -3 dosados no tecido adiposo. Os dados de fase aguda (**figura 27A**) mostram que, em relação aos animais infectados, a dieta azeite de oliva apresentou maior expressão da *Smad-2* quando comparado aos demais grupos infectados; e, na ausência da infecção, a dieta banha de porco provocou maior aumento da expressão deste gene.

Quando foram analisados durante a fase crônica recente e relativos à *Smad-2* (**figura 27B**), observou-se que a infecção reduziu a expressão do gene nos grupos alimentados com as dietas AIN93M e azeite de oliva, enquanto entre os grupos de animais infectados, a dieta banha de porco induziu maior expressão deste gene.

De forma inversa, a infecção aumentou a expressão de *Smad-3* (**figura 27C**) em todos os grupos independente das dietas, porém houve um expressivo aumento nos grupos que receberam as dietas ricas em ácidos graxos. Já em fase crônica recente, apenas a dieta banha de porco elevou a expressão de *Smad-3* naqueles animais infectados pelo *T. cruzi* (**figura 27D**), enquanto ambas as dietas ricas em ácidos graxos elevaram a expressão deste gene nos grupos de animais sem a infecção.

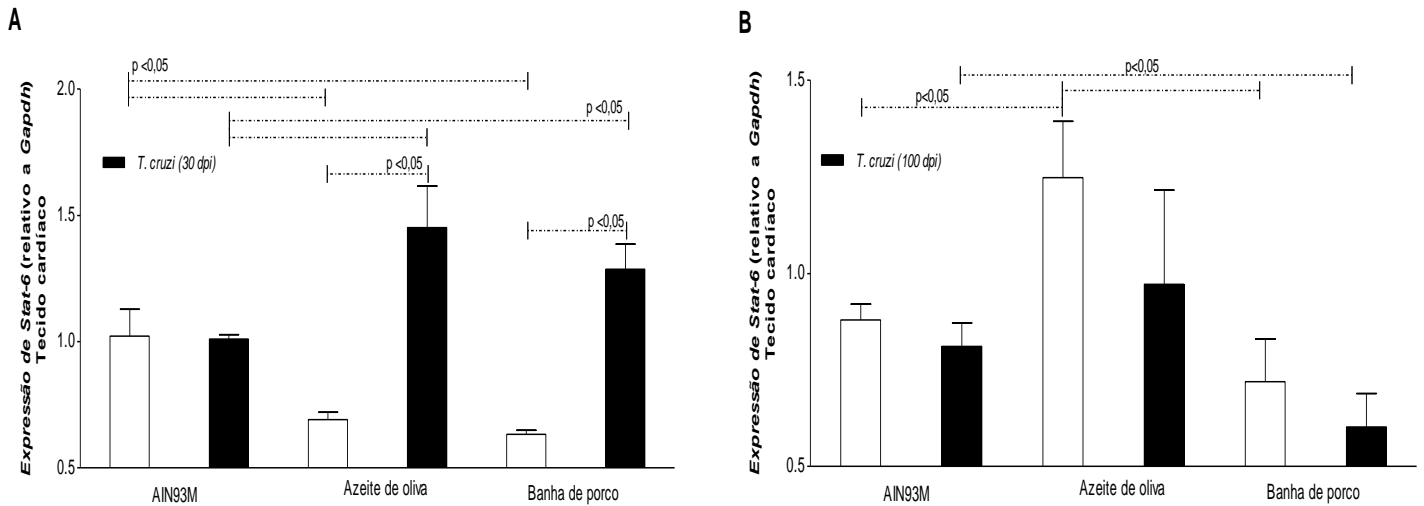


**Figura 27. Expressão das *Smad*'s 2 e 3 no tecido adiposo.** **A:** expressão de *Smad-2* no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Smad-2* no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5); **C:** expressão de *Smad-3* no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); **D:** Expressão de *Smad-3* no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

#### 5.6.6. Expressão da *Stat-6*

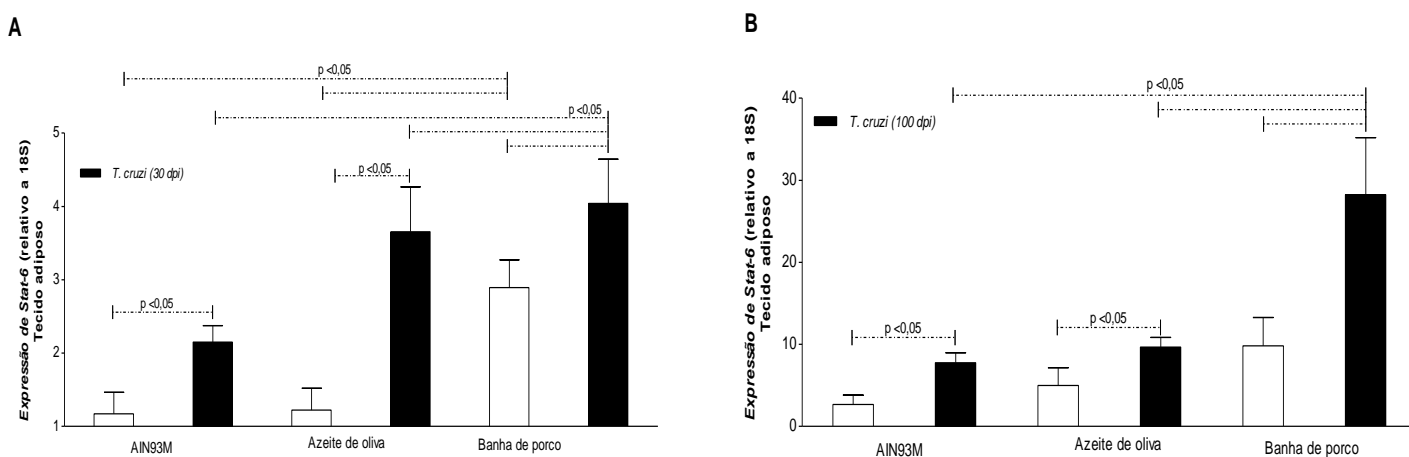
As **figuras 28 e 29** apresentam os dados referentes à expressão de *Stat-6* nos tecidos cardíaco e adiposo respectivamente. Nas dosagens realizadas no tecido cardíaco de animais infectados em fase aguda (**figura 28A**), ambas as dietas ricas em ácidos graxos (monoinsaturados – dieta azeite de oliva/ saturados – dieta banha de porco) propiciaram um

aumento na expressão da *Stat-6*, enquanto na fase crônica recente da infecção apenas a banha de porco foi capaz de reduzir a expressão em relação às dietas AIN93M e azeite de oliva (**figura 28B**).



**Figura 28. Expressão de *Stat-6* no tecido cardíaco.** **A:** expressão de *Stat-6* no tecido cardíaco em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão *Stat-6* no tecido cardíaco em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

No tecido adiposo durante a fase aguda da infecção, foi observado aumento da expressão da *Stat-6* (**figura 29A**) na presença de ambas as dietas ricas em ácidos graxos (monoinsaturados – dieta azeite de oliva/ saturados – dieta banha de porco). Na fase crônica, a presença do parasito elevou drasticamente a expressão de *Stat-6*, quando comparada com os níveis apresentados na fase aguda. Porém, entre os grupos de animais infectados e crônicos, apenas a dieta Banha de porco induziu aumento deste gene (**figura 29B**).



**Figura 29. Expressão de Stat-6 no tecido adiposo. A:** expressão de Stat-6 no tecido adiposo em 30 dias de infecção (n=5); **B:** expressão Stat-6 no tecido adiposo em 100 dias de infecção (n=5). Linhas pontilhadas indicam grupos diferentes entre si. Valores significativos para  $p < 0.05$ .

## 6. DISCUSSÃO

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta estreita relação com a resposta imune e a homeostase do hospedeiro mamífero, principalmente quando se avalia os acometimentos cardíacos induzidos por este parasito. Neste contexto, outros órgãos considerados secundários a esta infecção, e, portanto, menos investigados, podem exercer importante função na compreensão da fisiopatologia induzida pelo *T. cruzi*. Sabe-se, por exemplo, que o aumento da massa do baço e do fígado frente à infecção por este parasito pode ocorrer sem que haja alteração aparente da consistência e característica lisa da superfície desses órgãos, como descrito por Dias e Coura (Dias and Coura 1997). No presente estudo verificamos que a associação da infecção com a composição lipídica da dieta também foi um fator decisivo na massa, característica e composição do baço e do fígado. Observamos, neste caso, um aumento dos lipídeos intracelulares nos hepatócitos e o consumo prolongado de uma dieta rica em ácidos graxos saturados, com concentração superior a 14%, foi suficiente para, junto com a infecção pelo *T. cruzi*, promover o aumento da massa hepática. Esta deposição excessiva de “lipídeos” pode ser um fator promotor do quadro de esteatose hepática, assim como previamente demonstrado por nosso grupo (Figueiredo et al. 2018). No presente estudo, também constatamos que, durante a fase aguda, o parasito favorece o aumento do tecido adiposo epididimal em animais alimentados com dieta com banha de porco, possivelmente devido à interação desse parasito com a presença de ácidos graxos saturados, assim como o encontrado nos trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa liderado durante anos por Tanowitz e Nagajyothi (Nagajyothi et al.

2014; Nagajyothi et al. 2012; Tanowitz et al. 2011; Ferreira et al. 2011). Como publicado anteriormente, sabemos que o parasito necessita de moléculas análogas ao colesterol, para invadir as células do hospedeiro, replicar, e se manter numa forma, digamos, latente, para continuar o ciclo, num possível caso de imunossupressão do hospedeiro (Nagajyothi et al. 2011; Johndrow et al. 2014; Tanowitz et al. 2017). Da mesma forma, durante anos, pesquisadores têm estudado o quanto a natureza química dos ácidos graxos da dieta são capazes de gerar um ambiente tanto pró-inflamatório quanto regulatório (Lovo-Martins et al. 2017; López-Muñoz et al. 2018; Bozza et al. 2011).

Em paralelo a isso, e preocupados com a participação dos lipídeos na sobrevivência dos parasitos, avaliamos se os ácidos graxos das dietas interfeririam na mortalidade e replicação do *T. cruzi* numa fase inicial e numa fase crônica recente da infecção, e podemos afirmar, com base nos dados parasitológicos e de mortalidade, que realmente ocorre alguma interferência. Nossos dados corroboram com estudos publicados mostrando que uma dieta hiperlipídica aumenta a taxa de sobrevivência de camundongos infectados durante a fase aguda da infecção (Brima et al. 2015; Nagajyothi et al. 2014). Brima e colaboradores, acreditaram que os resultados encontrados podem ser justificados devido à maior presença de gordura na região abdominal e resposta inflamatória provocado por esta gordura, principalmente relacionado à ativação do *TLR-4*. Por sua vez, o grupo liderado por Nagajyothi, atribuiu tal efeito a uma possível lipidopatia provocada pelo *T. cruzi*, que seria capaz de aumentar a expressão de receptores relacionados à captação de colesterol circulante, e assim, reduzir o dano cardíaco. Acreditamos que as duas vertentes de pensamento são justificáveis, porém, aqui, trabalhamos com dieta com 45% de lipídeos, e obtivemos resultados de maior sobrevivência relacionada aos ácidos graxos monoinsaturados. Sendo assim, não podemos descartar também, a capacidade do *T. cruzi* de modular a resposta imune do hospedeiro através da conversão do ácido oleico, presente no azeite de oliva, em ácido linoleico, como descrito por Maldonado e colaboradores (Maldonado et al. 2006).

Ainda em relação à sobrevivência dos animais, nossos dados vão de encontro ao “paradoxo da obesidade”, descrito por Beleigoli e colaboradores (Beleigoli et al. 2013), que descreveram que seres humanos com alto índice de massa corporal (IMC) apresentam maior sobrevivência em uma população com alta incidência da doença de Chagas. Apesar desta descrição ter ocorrido em um estudo com seres humanos, os dados sustentam aqueles obtidos no presente estudo com camundongos, indicando que a obesidade, apesar de seu efeito deletério ao organismo, poderia ser considerada “positiva” numa situação de infecção pelo *T. cruzi*, pois o

tecido adiposo funcionaria como uma grande esponja, atraindo os parasitos, e evitando maiores danos ao tecido cardíaco, como o relatado por Nagajyothi e colaboradores (Nagajyothi et al. 2014).

Para confirmar esta hipótese, realizamos um estudo qualitativo nos tecidos cardíaco e adiposo dos animais. Os dados obtidos confirmam estudos prévios que mostraram que os tecidos adiposos de camundongos infectados desempenharam um papel importante na redução da carga parasitária e da inflamação mediante o uso de dietas hiperlipídicas (Nagajyothi et al. 2014; Brima et al. 2015). Este fato pode contribuir para o aumento da taxa de sobrevivência durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*. Ainda, acredita-se que a dieta hiperlipídica possa melhorar os efeitos da infecção pelo *T. cruzi* no tecido adiposo e reduzir a lipólise dos adipócitos (Nagajyothi et al. 2014), além de induzir melhoria no perfil imunopatológico cardíaco, em comparação aos camundongos infectados e alimentados com uma dieta com percentual lipídico normal.

Analizamos também, os componentes de *status redox* e observamos, que ambos os ácidos graxos podem provocar danos teciduais, mas em tempos de infecção diferentes. No trabalho de Johndrow e cols, os autores concluíram que a elevação de níveis lipídicos intracelulares, mediados pela infecção e pelo aumento da biossíntese de colesterol alterou a função membranar e lisossomal, além de exaurirem a capacidade oxidativa mitocondrial e contribuírem para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica (Johndrow et al. 2014). Estes dados, aliados aos nossos, mostram que, apesar dos ácidos graxos possuírem relação com o aumento da sobrevivência, há necessidade de cautela na quantidade presente na dieta.

A partir desses dados, decidimos investigar, a interferência na produção de dois marcadores inflamatórios, CCL-2 e IL-10, considerados indicadores importantes de inflamação e dano cardíaco (Horta et al. 2017). Porém, quando estes dados foram avaliados em conjunto com os dados qualitativos da análise histológica, principalmente em relação à quimiocina CCL-2, que possui importante papel no recrutamento de macrófagos para o local da infecção (Talvani et al. 2004), nossos dados foram considerados inconclusivos.

Sendo assim, buscamos identificar genes relacionados à resposta inflamatória que estariam alterados pela ação das dietas ricas em ácidos graxos. Tanto o tecido cardíaco quanto o tecido adiposo, na fase crônica recente, apresentaram maior expressão do fator de transcrição *Foxp3* entre os animais infectados e alimentados com a dieta rica em ácidos graxos saturados. Estes animais apresentaram um perfil de infiltrado inflamatório moderado a discreto, assim como o descrito por Araújo e colaboradores (De Araújo et al. 2011), que demonstraram em

pacientes chagásicos com forma clínica indeterminada exibiram uma concentração significativamente maior de células *Foxp3+* em comparação com pacientes chagásicos com forma clínica cardíaca e indivíduos não infectados. De acordo com estes autores, as células *Foxp3+* estão envolvidas com o controle da inflamação, e é possível sugerir que essas células podem representar um mecanismo usado prevenir a exacerbação do processo inflamatório.

Seguindo então, com o estímulo dos *TLR's* como um processo inicial da cascata inflamatória, observamos que a infecção aliada aos ácidos graxos monoinsaturados da dieta azeite de oliva provocam maior expressão dos *TLR's -2* e *-4*, no tecido cardíaco, na fase aguda da infecção. Em 2013, Gravina e colaboradores (Gravina et al. 2013) demonstraram que a não expressão do *TLR-9*, mas sim a expressão do *TLR-2*, tornava o animal experimental mais susceptível à infecção pelo *T. cruzi*. Isso ocorre porque os *TLR's -2* e *-9* atuam de forma cooperada no controle da replicação parasitária, e produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  na infecção (Tarleton 2007; Bafica et al. 2006). No presente estudo, observamos que os animais, alimentados com a dieta azeite de oliva, apresentaram maior expressão destes receptores no tecido cardíaco. Estes mesmos animais não apresentaram mortalidade na fase aguda nem na fase crônica, confirmando que os ácidos graxos monoinsaturados possuem papel potencializador do controle imunológico do hospedeiro contra o parasito.

Ao analisarmos a expressão dos *TLR's* no tecido adiposo, também na fase aguda, observamos que a infecção aliada tanto aos ácidos graxos monoinsaturados da dieta azeite de oliva, quanto aos saturados, da dieta banha de porco, aumenta a expressão destes receptores. O tecido adiposo é conhecido como alvo para o parasito devido à composição lipídica celular e metabolismo de gorduras do tecido, além de ser um possível reservatório de parasitos que voltariam a circular no organismo, em caso de imunossupressão (Nagajyothi, Desruisseaux, Weiss, Chua, Albanese, Machado, Esper, Lisanti, Teixeira, Scherer, et al. 2009). Sendo assim, os dados observados na histologia do tecido adiposo, corroboram também com aqueles observados de expressão dos receptores tipo *Toll*.

Com base nos dados histológicos apresentados, os animais alimentados com a dieta banha de porco, apresentaram redução na intensidade do infiltrado inflamatório. Possivelmente, por haver maior resposta frente à presença do parasito, via ativação de *TLR-2* e de *TLR-9*. Além disso, a presença de ácidos graxos saturados na dieta promoveu um aumento da ativação da via inflamatória do NF- $\kappa\beta$ , possivelmente privilegiando a resposta contra o parasito, como observado por Nagajyothi e colaboradores em estudos nos tecidos adiposo branco e marrom (Nagajyothi et al. 2012). Este fato poderia levar a uma redução do parasito

circulante e menor intensidade do infiltrado inflamatório no grupo de animais alimentados com a dieta banha de porco. Porém, os dados relativos à expressão de *TLR-4* não foram conclusivos até momento.

Partindo do princípio de que a ação da *Irak-1* é dependente da ativação do *TLR-4* e que ela atua como um elemento essencial na transcrição de marcadores pró-inflamatórios e enzimas oxidativas, por ativar a via do NF- $\kappa$ B (Ringwood and Li 2008). No tecido cardíaco de animais em fase aguda, observamos que o *TLR-4*, assim como o *Irak-1*, apresentaram maior expressão entre os animais infectados e alimentados com dieta azeite de oliva. Além disso, estes resultados sustentam os dados de status oxidativo onde observamos na fase aguda da infecção, que a dieta azeite de oliva promoveu um ambiente característico de dano celular. Nossos resultados corroboram aqueles obtidos por Singh e colaboradores (Singh and Li 2012) que relacionaram a ativação da *Irak-1* com a redução da atividade antioxidante e a promoção de dano tecidual; além de corroborar também com os dados apresentados por Su e colaboradores (Su et al. 2019) que mostraram relação entre o *Irak-1* e a inflamação nos cardiomiócitos.

Considerando que os *Ppar's*  $\alpha$  e  $\gamma$  são capazes de modular o sistema imune através da polarização de macrófagos em M1 para M2, como publicado por Penas e colaboradores (Penas et al. 2015), verificamos que, no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção, os ácidos graxos monoinsaturados da dieta azeite de oliva provocaram maior expressão do *Ppar- $\gamma$* ; e durante a fase crônica, tanto os ácidos graxos monoinsaturados da dieta azeite de oliva quanto os ácidos graxos saturados da dieta banha de porco provocaram redução da expressão do *Ppar- $\alpha$* , fato que sugere ausência de modulação da inflamação neste tecido. Quando analisamos os dados dos *Ppar's* no tecido adiposo, percebemos que a associação infecção e dietas ricas em ácidos graxos (monoinsaturados ou saturados), provocam maior expressão destas isoforma, na fase crônica recente da infecção.

Da mesma forma, avaliamos a expressão das *Smads-2* e  $-3$ , e observamos que, quando avaliados conjuntamente com a infecção pelo *T. cruzi*, os ácidos graxos monoinsaturados da dieta azeite de oliva favoreceram o aumento da expressão destes genes precursores de via anti-inflamatória do TGF- $\beta$ . Com base no trabalho publicado por DaMatta e colaboradores, que mostraram a relação da *Smad-2* com a sobrevivência do *T. cruzi* (DaMatta et al. 2007), nossos dados sugerem uma possível via de controle do parasito favorecido pelos ácidos monoinsaturados da dieta com azeite de oliva.

Por fim, avaliamos também que, na presença da infecção, tanto no tecido cardíaco, quanto no tecido adiposo a *Stat-6* foi mais expressa nos animais alimentados com as dietas ricas



em ácidos graxos (monoinsaturados ou saturados); e na análise do tecido adiposo da fase crônica recente, a associação infecção e ácidos graxos saturados, provocou maior expressão deste gene. Estes dados podem ser analisados como benéficos ao hospedeiro, baseado nos estudos de Ricardo-Gonzales e colaboradores (Ricardo-Gonzalez et al. 2010) onde demonstraram que o eixo imune IL-4/*Stat-6*, é uma via importante no controle do metabolismo por melhorar a ação da insulina, inibir o catabolismo de nutrientes e atenuar a inflamação do tecido adiposo.

Então, observamos que a afinidade do parasito aos componentes lipídicos de membrana celular, possivelmente alterados pela dieta, parece ser decisiva para a manutenção das formas evolutivas replicação e de resistência do parasito frente ao sistema imune. Além disso, acreditamos que esta afinidade pode ser um indicativo de que o parasito seja menos combatido nos cardiomiócitos devido um grau menor inflamação tecidual quando comparado ao tecido adiposo, ambiente naturalmente inflamado devido à grande produção e circulação de citocinas pró-inflamatórias.

O diferencial do presente estudo foi exatamente avaliar o quão específico seria uma dieta rica em ácido graxo saturado e outra rica em ácido graxo monoinsaturado no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Para isso, investigamos diferentes genes envolvidos tanto na resposta inflamatória frente ao parasito, quanto numa possível alteração desta resposta referente à dieta consumida. Acreditávamos que assim poderíamos avaliar em qual momento o organismo do hospedeiro mamífero poderia ser beneficiado. Porém, encontramos dados contrastantes que nos deixam em dúvida se há vantagens para o hospedeiro, na migração do parasito para os tecidos, assim como não sabemos ainda responder sobre até onde tal migração seria benéfica para o hospedeiro.

Sendo assim, acreditamos que os estudos envolvendo dietas e processos infecciosos/inflamatórios, devem ser mais bem especificados do ponto de vista da composição nutricional, uma vez que a natureza lipídica interfere tanto no controle do parasito quanto nos elementos do sistema imune do hospedeiro mamífero. Acreditamos ainda que, esta nova vertente de investigação precisa de maior fundamentação e avaliação em outros modelos experimentais, mas confirmando-se o que a literatura já vem apontando e que o presente estudo reforçou, o planejamento de uma dieta, seja no contexto da pesquisa básica ou no manejo do paciente chagásico, deveria ser melhor considerada.

## 7. CONCLUSÃO

Camundongos C57BL6, infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, e submetidos à dietas ricas em ácido graxo saturado (banha de porco) e monoinsaturado (azeite de oliva) apresentam um padrão inflamatório no tecido cardíaco e adiposo dependente da dieta, sendo a dieta rica em ácidos graxos monoinsaturados associada ao aumento das proteínas inflamatórias e de sinalização responsáveis pela patogênese induzida pelo *T. cruzi*.

## 8. REFERÊNCIAS

Akhurst, Rosemary J, and Akiko Hata. 2012. 'Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease', *Nature reviews. Drug discovery*, 11: 790.

Andrade, Daniela V, Kenneth J Gollob, and Walderez O Dutra. 2014. 'Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease', *PLoS neglected tropical diseases*, 8: e3010.

Andrade, ZA, and SG Andrade. 1979. 'Pathology of experimental Chagas disease in dogs', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 75: 77-95.

Asif, Mohammad. 2011. 'Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: Perilla frutescens is a good example of plant oils', *Oriental Pharmacy & Experimental Medicine*, 11: 51-59.

Bafica, Andre, Helton Costa Santiago, Romina Goldszmid, Catherine Ropert, Ricardo T Gazzinelli, and Alan Sher. 2006. 'Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection', *The Journal of Immunology*, 177: 3515-19.

Barbosa, Kiriaque Barra Ferreira, Neuza Maria Brunoro Costa, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, Sérgio Oliveira De Paula, Valéria Paula Rodrigues Minim, and Josefina Bressan. 2010. 'Oxidative stress: concept, implications and modulating factors', *Revista de Nutrição*, 23: 629-43.

Barreiros, André Luís Bacelar Silva, Jorge Mauricio David, and Juceni Pereira de Lima David. 2006. 'Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo'.  
Beleigoli, Alline Maria, Antonio Luiz Ribeiro, H Diniz Maria de Fátima, Maria Fernanda Lima-Costa, and Eric Boersma. 2013. 'The “obesity paradox” in an elderly population with a high prevalence of Chagas disease: the 10-year follow-up of the Bambuí (Brazil) Cohort Study of Aging', *International journal of cardiology*, 166: 523-26.

Bozza, Patricia T, Ilka Bakker-Abreu, Roberta A Navarro-Xavier, and Christianne Bandeira-Melo. 2011. 'Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update', *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA)*, 85: 205-13.

Brener, Zigman. 1973. 'Biology of *Trypanosoma cruzi*', *Annual Reviews in Microbiology*, 27: 347-82.

Bright, John J, Saravanan Kanakasabai, Wanida Chearwae, and Sharmistha Chakraborty. 2008. 'PPAR regulation of inflammatory signaling in CNS diseases', *PPAR research*, 2008.

Brima, Wunnie, Daniel J Eden, Syed Faizan Mehdi, Michelle Bravo, Mohammad M Wiese, Joanna Stein, Vanessa Almonte, Dazhi Zhao, Irwin Kurland, and Jeffrey E Pessin. 2015. 'The brighter (and evolutionarily older) face of the metabolic syndrome: evidence from *Trypanosoma cruzi* infection in CD-1 mice', *Diabetes/metabolism research and reviews*, 31: 346-59.

Callaghan, Connor M, Catherine Schuler, Robert E Leggett, and Robert M Levin. 2013. 'Effect of severity and duration of bladder outlet obstruction on catalase and superoxide dismutase activity', *International Journal of Urology*, 20: 1130-35.

- Campos, Marco A, and Ricardo T Gazzinelli. 2004. 'Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors', *Mediators of inflammation*, 13: 139-43.
- Capra, Valérie, G Enrico Rovati, Paolo Mangano, Carola Buccellati, Robert C Murphy, and Angelo Sala. 2015. 'Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851: 377-82.
- Colas, Romain A, Anthony W Ashton, Shankar Mukherjee, Jesmond Dalli, Oscar B Akide-Ndunge, Huan Huang, Mahalia S Desruisseaux, Fangxia Guan, Linda A Jelicks, and Fabiane Matos dos Santos. 2018. 'Trypanosoma cruzi produces the specialized proresolving mediators resolvin D1, resolvin D5, and resolvin E2', *Infection and immunity*, 86: e00688-17.
- Cunningham-Rundles, Susanna. 1993. *Nutrient modulation of the immune response* (Dekker).
- DaMatta, Renato A, Sergio H Seabra, Poliana Deolindo, Andréa CV Arnholdt, Lauro Manhães, Samuel Goldenberg, and Wanderley De Souza. 2007. 'Trypanosoma cruzi exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism', *FEMS microbiology letters*, 266: 29-33.
- De Araújo, F. F., A. B. M. da Silveira, R Correa-Oliveira, A. T. Chaves, S. J. Adad, J. A. Fiuza, and J. A. Silva Gomes. 2011. 'Characterization of the presence of Foxp3+ T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease', *Human pathology*, 42: 299-302.
- Deisseroth, ALBERT, and ALEXANDER L Dounce. 1970. 'Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role', *Physiological reviews*, 50: 319-75.
- Dias, João Carlos Pinto, and José Rodrigues Coura. 1997. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral* (SciELO-Editora FIOCRUZ).
- Dobrian, AD, Margaret A Hatcher, Joshua J Brotman, Elena V Galkina, P Taghavi-Moghadam, Hong Pei, Bronson A Haynes, and JL Nadler. 2015. 'STAT4 contributes to adipose tissue inflammation and atherosclerosis', *Journal of Endocrinology*, 227: 13-24.
- Dutra, Walderez O, Cristiane AS Menezes, Luisa MD Magalhães, and Kenneth J Gollob. 2014a. 'Immunoregulatory networks in human Chagas disease', *Parasite immunology*, 36: 377-87.
- . 2014b. 'Immunoregulatory networks in human Chagas disease', *Parasite immunology*, 36: 377-87.
- Ferreira, Adaliene Versiani Matos, Marcela Segatto, Zélia Menezes, Andréa Mara Macedo, Cláudio Gelape, Luciana de Oliveira Andrade, Fnu Nagajyothi, Philipp E Scherer, Mauro Martins Teixeira, and Herbert B Tanowitz. 2011. 'Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease', *Microbes and infection*, 13: 1002-05.
- Figueiredo, Vivian Paulino, Evandro Saraiva Lopes Junior, Laís Roquete Lopes, Natalia Figueirôa Simões, Arlete Rita Penitente, Eduardo Bearzoti, Paula Melo de Abreu Vieira, Richard Schulz, and André Talvani. 2018. 'High fat diet modulates inflammatory parameters in the heart and liver during acute Trypanosoma cruzi infection', *International immunopharmacology*, 64: 192-200.

- FIOCRUZ, Belo Horizonte. 2011. 'Characterization of the presence of Foxp3+ T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease', *Human pathology*, 42: 299-302.
- Folch, Jordi, M\_ Lees, and GH Sloane-Stanley. 1957. 'A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues', *J biol Chem*, 226: 497-509.
- Freire, Marcelo O, and Thomas E Van Dyke. 2013. 'Natural resolution of inflammation', *Periodontology 2000*, 63: 149-64.
- Galvao, André Luiz Baptista, Elzylene Léga Palazzo, Mildre Loraine Pinto, and Manuela Cristina Vieira. 2014. 'Espécies reativas do oxigênio e doença renal crônica: Revisão de literatura', *Nucleus Animalium*, 6.
- González-Pérez, Ana, and Joan Clària. 2010. 'Resolution of adipose tissue inflammation', *The Scientific World Journal*, 10: 832-56.
- Gravina, Humberto D, Lis Antonelli, Ricardo T Gazzinelli, and Catherine Ropert. 2013. 'Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*', *PloS one*, 8: e63100.
- Griffiths, Helen R, Irundika HK Dias, Rachel S Willetts, and Andrew Devitt. 2014. 'Redox regulation of protein damage in plasma', *Redox biology*, 2: 430-35.
- Griffiths, Keith, Bharat B Aggarwal, Ram B Singh, Harpal S Buttar, Douglas Wilson, and Fabien De Meester. 2016. 'Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention', *Diseases*, 4: 28.
- Haluzik, MM, and M Haluzik. 2006. 'PPAR-[alpha] and Insulin Sensitivity', *Physiological research*, 55: 115.
- Hata, Akiko, and Ye-Guang Chen. 2016. 'TGF- $\beta$  signaling from receptors to Smads', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8: a022061.
- Hemmige, Vagish, Herbert Tanowitz, and Aisha Sethi. 2012. '*Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations', *International journal of dermatology*, 51: 501-08.
- Horta, Aline Luciano, Ana Luisa Junqueira Leite, G Paula Costa, Vivian Paulino Figueiredo, and André Talvani. 2017. 'Potential role of carvedilol in the cardiac immune response induced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*', *BioMed research international*, 2017.
- Hovsepian, Eugenia, Federico Penas, Gerardo A Mirkin, and Nora B Goren. 2012. 'Role of PPARs in *Trypanosoma cruzi* infection: implications for chagas disease therapy', *PPAR research*, 2012.
- Janani, C, and BD Ranjitha Kumari. 2015. 'PPAR gamma gene—a review', *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 9: 46-50.

- Johndrow, Christopher, Randin Nelson, Herbert Tanowitz, Louis M Weiss, and Fnu Nagajyothi. 2014. 'Trypanosoma cruzi infection results in an increase in intracellular cholesterol', *Microbes and infection*, 16: 337-44.
- Kodydková, J, L Vávrová, M Kocík, and A Zak. 2014. 'Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases', *Folia biologica*, 60: 153.
- López-Muñoz, Rodrigo A, Alfredo Molina-Berrios, Carolina Campos-Estrada, Patricio Abarca-Sanhueza, Luis Urrutia-Llancaqueo, Miguel Peña-Espinoza, and Juan D Maya. 2018. 'Inflammatory and pro-resolving lipids in trypanosomatid infections: a key to understanding parasite control', *Frontiers in microbiology*, 9.
- Lovo-Martins, Maria I, Aparecida D Malvezi, Rosiane V da Silva, Nágela G Zanluqui, Vera LH Tatakihara, Niels OS Câmara, Ana Paula L de Oliveira, Jean PS Peron, Marli C Martins-Pinge, and Kevin L Fritsche. 2017. 'Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from Trypanosoma cruzi', *Nutrition Research*, 41: 73-85.
- Lowry, Oliver H, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, and Rose J Randall. 1951. 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-75.
- Machado-Silva, Alice, Paula Goncalves Cerqueira, Viviane Grazielle-Silva, Fernanda Ramos Gadelha, Eduardo de Figueiredo Peloso, Santuza Maria Ribeiro Teixeira, and Carlos Renato Machado. 2016. 'How Trypanosoma cruzi deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767: 8-22.
- Machado, Fabiana S, Shankar Mukherjee, Louis M Weiss, Herbert B Tanowitz, and Anthony W Ashton. 2011. 'Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection', *Advances in parasitology*, 76: 1.
- Macias, Maria J, Pau Martin-Malpartida, and Joan Massagué. 2015. 'Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling', *Trends in biochemical sciences*, 40: 296-308.
- Maldonado, Rosa A, Renata K Kuniyoshi, Jutta G Linss, and Igor C Almeida. 2006. 'Trypanosoma cruzi oleate desaturase: molecular characterization and comparative analysis in other trypanosomatids', *Journal of Parasitology*, 92: 1064-74.
- Marion-Letellier, Rachel, Guillaume Savoye, and Subrata Ghosh. 2016. 'Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma', *European journal of pharmacology*, 785: 44-49.
- Medeiros, Nayara I, Juliana AS Gomes, and Rodrigo Correa-Oliveira. 2017. 'Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy', *Parasite immunology*.
- Miao, Qianqian, and Momar Ndao. 2014. 'Trypanosoma cruzi infection and host lipid metabolism', *Mediators of inflammation*, 2014.
- Mori, Natacha Cossetin, RC Horn, Caroline Oliveira, Paola Ariane Pereira Leal, Diego Pascoal Golle, Jana Koefender, Josiane Bortolotto, and Helena Matiello Dias. 2015. 'Alterações bioquímicas e toxicológicas de agricultores familiares da região do Alto Jacuí, Rio Grande do Sul', *Sci Med*, 25: 20999.

- Nagajyothi, Fnu, Mahalia S Desruisseaux, Linda A Jelicks, Fabiana S Machado, Streamson Chua, Philipp E Scherer, and Herbert B Tanowitz. 2009. 'Perspectives on adipose tissue, Chagas disease and implications for the metabolic syndrome', *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- Nagajyothi, Fnu, Mahalia S Desruisseaux, Fabiana S Machado, Rajendra Upadhy, Dazhi Zhao, Gary J Schwartz, Mauro M Teixeira, Chris Albanese, Michael P Lisanti, and Streamson C Chua Jr. 2012. 'Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain)', *Journal of Infectious Diseases*, 205: 830-40.
- Nagajyothi, Fnu, Mahalia S Desruisseaux, Louis M Weiss, Streamson Chua, Chris Albanese, Fabiana S Machado, Lisia Esper, Michael P Lisanti, Mauro M Teixeira, and Philipp E Scherer. 2009. 'Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 219-25.
- Nagajyothi, Fnu, Mahalia S Desruisseaux, Louis M Weiss, Streamson Chua, Chris Albanese, Fabiana S Machado, Lisia Esper, Michael P Lisanti, Mauro M Teixeira, Philipp E Scherer, and Herbert B Tanowitz. 2009. 'Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 219-25.
- Nagajyothi, Fnu, Louis M Weiss, David L Silver, Mahalia S Desruisseaux, Philipp E Scherer, Joachim Herz, and Herbert B Tanowitz. 2011. '*Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion', *PLoS neglected tropical diseases*, 5: e953.
- Nagajyothi, Fnu, Louis M Weiss, Dazhi Zhao, Wade Koba, Linda A Jelicks, Min-Hui Cui, Stephen M Factor, Philipp E Scherer, and Herbert B Tanowitz. 2014. 'High fat diet modulates *Trypanosoma cruzi* infection associated myocarditis', *PLoS neglected tropical diseases*, 8: e3118.
- Ogata, Haline, Maxelle Martins Teixeira, Rodrigo Cunha de Sousa, Marcos Vinícius da Silva, Dalmo Correia, Virmondes Rodrigues Junior, Bruce David Levy, and Alexandre de Paula Rogério. 2016. 'Effects of aspirin-triggered resolvin D1 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Chagas' heart disease', *European journal of pharmacology*, 777: 26-32.
- Park, Hui Gyu, Kumar SD Kothapalli, Woo Jung Park, Christian DeAllie, Lei Liu, Allison Liang, Peter Lawrence, and J Thomas Brenna. 2016. 'Palmitic acid (16: 0) competes with omega-6 linoleic and omega-3  $\alpha$ -linolenic acids for FADS2 mediated  $\Delta$ 6-desaturation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861: 91-97.
- Penas, Federico, Gerardo A Mirkin, Marcela Vera, Ágata Cevey, Cintia D González, Marisa I Gómez, María Elena Sales, and Nora B Goren. 2015. 'Treatment in vitro with PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from *T. cruzi*-infected mice', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852: 893-904.
- Previato, Jose O, Robin Wait, Christopher Jones, George A DosReis, Adriane R Todeschini, Norton Heise, and Lucia Mendonça Previato. 2004. 'Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology', *Advances in parasitology*, 56: 2-42.

- Ricardo-Gonzalez, Roberto R, Alex Red Eagle, Justin I Odegaard, Hani Jouihan, Christine R Morel, Jose E Heredia, Lata Mukundan, Davina Wu, Richard M Locksley, and Ajay Chawla. 2010. 'IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 22617-22.
- Ringwood, Lorna, and Liwu Li. 2008. 'The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation', *Cytokine*, 42: 1-7.
- Rocha, Manoel OC, Mauro M Teixeira, and Antonio L Ribeiro. 2007. 'An update on the management of Chagas cardiomyopathy', *Expert review of anti-infective therapy*, 5: 727-43.
- Romanã, C. 1935. "Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina." In.: Publication.
- Ruan, Xiong Z, Zac Varghese, Ray Fernando, and John F Moorhead. 1998. 'Cytokine regulation of low-density lipoprotein receptor gene transcription in human mesangial cells', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 13: 1391-97.
- Shea-Donohue, Terez, Bolin Qin, and Allen Smith. 2017. 'Parasites, nutrition, immune responses and biology of metabolic tissues', *Parasite immunology*, 39.
- Singh, Neeraj, and Liwu Li. 2012. 'Reduced oxidative tissue damage during endotoxemia in IRAK-1 deficient mice', *Molecular immunology*, 50: 244-52.
- Soares, Elaine dos R, Elisa B Monteiro, Renata C da Silva, Aline Batista, Flavia Sobreira, Thaísa Mattos, Cristiane A da Costa, and Julio B Daleprane. 2015. 'Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição', *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, 14.
- Sousa, Giovane Rodrigo, Juliana Assis Silva Gomes, Rafaelle Christine Gomes Fares, Marcos Paulo de Souza Damásio, Ana Thereza Chaves, Karine Silvestre Ferreira, Maria Carmo Pereira Nunes, Nayara Ingrid Medeiros, Vanessa Alves Azevedo Valente, and Rodrigo Corrêa-Oliveira. 2014. 'Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease', *PloS one*, 9: e87082.
- Su, Qiang, Xiangwei Lv, Ziliang Ye, Yuhan Sun, Binghui Kong, Zhenbai Qin, and Lang Li. 2019. 'The mechanism of miR-142-3p in coronary microembolization-induced myocardial injury via regulating target gene IRAK-1', *Cell death & disease*, 10: 61.
- Sundram, Kalyana, Karuthan Chinna, Khun-Aik Chuah, Michihiro Sugano, Ryosuke Matsuoka, Tilakavati Karupaiyah, and Yasunobu Masuda. 2016. 'Comparing effects of soybean oil-and palm olein-based mayonnaise consumption on the plasma lipid and lipoprotein profiles in human subjects: a double-blind randomized controlled trial with cross-over design', *Lipids in health and disease*, 15: 131.
- Svahn, Sara L, Leif Våremo, Britt G Gabrielsson, Eduard Peris, Intawat Nookaew, Louise Grahnmemo, Ann-Sofie Sandberg, Ingrid Wernstedt Asterholm, John-Olov Jansson, and Jens Nielsen. 2016. 'Six Tissue Transcriptomics Reveals Specific Immune Suppression in Spleen by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids', *PloS one*, 11: e0155099.



- Taghavi-Moghadam, Parésa L, Breanne N Gjurich, Rukhsana Jabeen, Purna Krishnamurthy, Mark H Kaplan, Anca D Dobrian, Jerry L Nadler, and Elena V Galkina. 2015. 'STAT4 deficiency reduces the development of atherosclerosis in mice', *Atherosclerosis*, 243: 169-78.
- Talvani, A, FS Machado, GC Santana, A Klein, L Barcelos, JS Silva, and MM Teixeira. 2002. 'Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection', *Infection and immunity*, 70: 4247-53.
- Talvani, André, Manoel OC Rocha, Lucíola S Barcelos, Yara M Gomes, Antônio L Ribeiro, and Mauro M Teixeira. 2004. 'Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor— $\alpha$  in chagasic cardiomyopathy', *Clinical Infectious Diseases*, 38: 943-50.
- Talvani, André, and Mauro M Teixeira. 2011. '8 Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance', *Advances in parasitology*, 76: 171.
- Tanowitz, Herbert B, Linda A Jelicks, Fabiana S Machado, Lisia Esper, Xiaohua Qi, Mahalia S Desruisseaux, Streamson C Chua, Philipp E Scherer, and Fnu Nagajyothi. 2011. 'Adipose tissue, diabetes and Chagas disease.' in *Advances in parasitology* (Elsevier).
- Tanowitz, Herbert B, Fabiana S Machado, David C Spray, Joel M Friedman, Oren S Weiss, Jose N Lora, Jyothi Nagajyothi, Diego N Moraes, Nisha Jain Garg, and Maria Carmo P Nunes. 2015. 'Developments in the management of Chagas cardiomyopathy', *Expert review of cardiovascular therapy*, 13: 1393-409.
- Tanowitz, Herbert B, Philipp E Scherer, Maria M Mota, and Luisa M Figueiredo. 2017. 'Adipose tissue: a safe haven for parasites?', *Trends in parasitology*, 33: 276-84.
- Tarleton, Rick L. 2007. 'Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*', *Current opinion in immunology*, 19: 430-34.
- Tarleton, Rick L, Michael J Grusby, and Lei Zhang. 2000. 'Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*', *The Journal of Immunology*, 165: 1520-25.
- Teixeira, Mauro M, Ricardo T Gazzinelli, and João S Silva. 2002. 'Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection', *Trends in parasitology*, 18: 262-65.
- Tieghi, Thais de Mello, Camilla Chimelo Manca, Lígia Cangussu Tomaz Garcia, Roberto Esteves Pires Castanho, Altino Luiz Silva Therezo, Fernando Frei, Elane de Fátima Taipeiro, and Luciamáre Perinetti Alves Martins. 2017. 'Evaluation of antioxidant therapy in experimental Chagas disease', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50: 184-93.
- Vasconcelos Costa, André Gustavo, Josefina Bressan, and Céphora Maria Sabarense. 2006. 'Ácidos Graxos Trans: Alimentos e Efeitos na Saúde', *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 56: 12-21.
- Vávrová, Lucie, Jana Kodydková, Miroslav Zeman, Magdaléna Dušejovská, Jaroslav Macášek, Barbora Staňková, Eva Tvrzická, and Aleš Žák. 2013. 'Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome', *Obesity facts*, 6: 39-47.

Velloso, Licio Augusto. 2009. 'The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism', *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53: 151-58.

Wahli, Walter, and Liliane Michalik. 2012. 'PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23: 351-63.

Wonisch, Willibald, Andreas Falk, Isabella Sundl, Brigitte M Winklhofer-Roob, and Meinrad Lindschinger. 2012. 'Oxidative stress increases continuously with BMI and age with unfavourable profiles in males', *The Aging Male*, 15: 159-65.

Zeyda, Maximilian, and Thomas M Stulnig. 2009. 'Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review', *Gerontology*, 55: 379-86.

Zhang, Yanhua, Songyan Wang, Shengmao Liu, Chunguang Li, and Ji Wang. 2015. 'Role of Smad signaling in kidney disease', *International urology and nephrology*, 47: 1965-75.

Zhou, Hao, Minjia Yu, Koichi Fukuda, Jintek Im, Peng Yao, Wei Cui, Katarzyna Bulek, Jarod Zepp, Youzhong Wan, and Tae Whan Kim. 2013. 'IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NFκB activation and cytokine production', *The EMBO journal*, 32: 583-96.

Zhu, Jiankun, and Chandra Mohan. 2010. 'Toll-like receptor signaling pathways—therapeutic opportunities', *Mediators of inflammation*, 2010.

Zimmermann, Alice Mesquita, and Vanessa Ramos Kirsten. 2016. 'Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica', *Disciplinarum Scientia/ Saúde*, 8: 51-68.

Zingales, Bianca, Sonia G Andrade, Marcelo Ribeiro da Silva Briones, David A Campbell, Egler Chiari, Octavio Fernandes, Felipe Guhl, Eliane Lages-Silva, Andréa M Macedo, and Carlos R Machado. 2009. 'A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 1051-54.

Zingales, Bianca, Michael A Miles, David A Campbell, Michel Tibayrenc, Andrea M Macedo, Marta MG Teixeira, Alejandro G Schijman, Martin S Llewellyn, Eliane Lages-Silva, and Carlos R Machado. 2012. 'The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications', *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 240-53.