

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO**

Dissertação

Ação da dieta hiperlipídica em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com Sinvastatina

Débora Maria Soares de Souza

**Ouro Preto, MG
2015**

DÉBORA MARIA SOARES DE SOUZA

Ação da dieta hiperlipídica em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com Sinvastatina

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição. **Área de concentração:** Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

Coorientador: Prof. Dr. Camilo Adalton M. da Silva

OURO PRETO

2015

S729a

Souza, Débora Maria Soares de.

Ação da dieta hiperlipídica em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com Sinvastatina [manuscrito] / Débora Maria Soares de Souza. - 2015.

48f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani.

Coorientador: Prof. Dr. Camilo Adalton Mariano da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição Clínica e social - DENCs. Saúde e nutrição. Área de Concentração: Bioquímica e fisiopatologia da Nutrição.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Infecção. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Sinvastatina. I. Talvani, André. II. Silva, Camilo Adalton Mariano da. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Nutrição – ENUT
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos quatro dias do mês de março de dois mil e quinze, às catorze horas, no Auditório do Centro de Educação Aberta e à Distância da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Debora Maria Soares de Souza**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Daniela Caldeira Costa (UFOP), Vanessa Pinho da Silva (UFMG), André Talvani Pedrosa da Silva (UFOP) e Camilo Adalton Mariano da Silva (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: "EFEITOS DA SINVASTATINA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi* E SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA". Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:

APROVAR


REPROVAR


Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa (UFOP),
Examinadora Interna.


Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva (UFMG),
Examinadora Externa.


Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva (UFOP),
Orientador.


Prof. Dr. Camilo Adalton Mariano da Silva (UFOP),
Coorientador.


Debora Maria Soares de Souza (UFOP),
Mestranda.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Valter e Aparecida e ao meu marido Bruno, pelo incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Valter e Aparecida, por estarem sempre presentes e me lembrarem de que é necessário ter paciência para viver cada conquista.

Aos meus irmãos Adriano, Adriana, Patrícia e Ana Eliza, pelos exemplos, amizade e conselhos.

Ao meu marido Bruno, amigo de todas as horas, companheiro para toda a vida.

Ao professor André Talvani, pela orientação, amizade e confiança.

Aos amigos do Laboratório de Imunobiologia da Inflamação por toda ajuda e momentos de descontração que tornaram o trabalho mais leve.

Aos familiares e amigos que se fizeram tão presentes nesta grande experiência que foi o Mestrado.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário capaz de provocar um processo inflamatório no hospedeiro infectado conduzindo-o ao desenvolvimento de possíveis alterações cardíacas, do trato digestivo e/ou do sistema nervoso autonômico. Durante o processo de invasão de células do hospedeiro, o sistema imune libera uma série de mediadores inflamatórios com o objetivo de eliminar o parasito e controlar a inflamação para evitar dano tecidual. Atualmente, o Benznidazol e o Nifurtimox têm sido os fármacos utilizados na clínica para eliminar diretamente o *T. cruzi* e, indiretamente, modular a resposta imune do hospedeiro responsável pela imunopatogênese durante a infecção pelo parasito. Porém, alguns grupos têm investigado outras categorias farmacológicas capazes de amenizar a resposta inflamatória cardíaca e, conseqüentemente, melhorar a funcionalidade do órgão. Inibidores da ECA, betabloqueadores e fármacos com ação sob a HMG-CoA, especialmente o grupo farmacológico das estatinas, têm sido importantes alvos de investigação tanto em modelo experimental e em seres humanos, uma vez que apresentam funções antiolesterolêmicas e efeitos pleiotrópicos na regulação da resposta inflamatória. Outro fator importante para a determinação das funções fisiológicas é o consumo alimentar. Nesse sentido, uma dieta hiperlipídica pode favorecer o acúmulo de tecido adiposo que exerce importante papel na formação estrutural da resposta imune e pode interferir, direta ou indiretamente, na eficiência dessa resposta contra agentes infecciosos e/ou parasitários, a destacar o *Trypanosoma cruzi*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) em camundongos isogênicos (C57BL/6) infectados pelo *T. cruzi*, submetidos à terapia diária com Sinvastatina. Grupos (n=10) de animais fêmeas com 3 semanas de idade foram submetidos à dieta hiperlipídica ou normolipídica por 60 dias e posteriormente infectados ou não com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados ou não, por via oral, com 20mg/kg/peso de Sinvastatina por 30 dias. Avaliou-se a parasitemia, ganho de peso e, após eutanásia no 30º dia pós-infecção, alterações no perfil colesterolêmico e de produção de citocinas e quimiocinas no soro e/ou tecidos (coração, fígado e tecido adiposo). Os resultados mostraram ação da Sinvastatina na redução da parasitemia, assim como na produção da quimiocinas CCL2. Em suma, a dieta hiperlipídica eleva os níveis de citocinas inflamatórias, e o tratamento com a Sinvastatina contribui para diminuir a replicação parasitária, tornando-se uma via protetora potencial para o sistema cardiovascular, alvo primário das respostas agudas e crônicas anti-*T. cruzi*.

Palavras-chave: inflamação, *Trypanosoma cruzi*, dieta hiperlipídica, Sinvastatina.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi initiate an inflammatory process in the infected host, leading to the development of potential cardiac changes. During the host cell invasion process, the immune system releases a number of inflammatory mediators aiming to eliminate the parasite, control inflammation and to prevent tissue damage. Currently, Nifurtimox and Benznidazole drugs have been used in the clinic to eliminate *T. cruzi* and, indirectly, to modulate the host immune response. However, some groups have investigated other pharmacological categories able to soften cardiac inflammatory response and thus improve organ function. ECA inhibitors, beta blockers and drugs with action on HMG-CoA especially the pharmacological class of the statins, have been major targets for research in both experimental models and human beings, since they have pleiotropic effects in response regulation inflammatory. Another important factor for determining the physiological functions is food consumption. In this sense, a high-fat diet can promote the accumulation of adipose tissue that plays an important role in the structural formation of the immune response and may interfere, directly or indirectly, the efficiency of this response against infectious and/or parasitic agents, to highlight the *Trypanosoma cruzi*. The aim of this study was to evaluate the effects of high-fat diet (60% fat) in inbred mice (C57BL / 6) infected with *T. cruzi*, undergoing daily therapy with simvastatin. Groups (n = 10) Female animals at 3 weeks of age were subjected to normolipidic or fat diet for 60 days and later infected or not with the VL-10 strain of *T. cruzi* and treated or not orally with 20mg/kg simvastatin for 30 days. We evaluated the parasitemia, weight gain and the animals were sacrificed on the 30th day post-infection, changes in profile cholesterolemic and production of cytokines and chemokines in serum and tissues (heart, liver and adipose tissue). The results showed action of simvastatin in reducing the parasitemia as well as in the production of chemokines CCL2. In summary, the high fat diet increases the levels of inflammatory cytokines, and treatment with simvastatin helps to reduce the parasitic replication, making it a potential route for protecting the cardiovascular system, the primary target of anti-*T. cruzi* acute and chronic responses.

Keywords: inflammation, *Trypanosoma cruzi*, h fat diet, simvastatin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ação das estatinas na via do mevalonato.	15
Figura 2. Grupo submetido à dieta normolipídica: distribuição dos animais.	18
Figura 3. Grupo submetido à dieta hiperlipídica: distribuição dos animais.	19
Figura 4. Avaliação da parasitemia durante os 30 dias de infecção.	25
Figura 5. Avaliação do ganho de peso nas 13 semanas de estudo.	27
Figura 6. Teste de tolerância à glicose.	28
Figura 7. Teste de tolerância à insulina.	29
Figura 8. Lipídeos totais hepáticos.	30
Figura 9. Colesterol total.	31
Figura 10. Colesterol HDL.	31
Figura 11. Colesterol LDL.	32
Figura 12. Triglicerídeos.	32
Figura 13. TNF plasmático.	33
Figura 14. CCL2 plasmático.	33
Figura 15. IL-10 plasmática.	34
Figura 16. Leptina plasmática.	34
Figura 17. IFN- Γ tecido cardíaco.	35
Figura 18. TNF tecido cardíaco.	36
Figura 19. Dosagem de IL-10 no tecido cardíaco.	36
Figura 20. Dosagem de IFN- Γ tecido adiposo.	37
Figura 21. Dosagem de TNF tecido adiposo.	38
Figura 22. Dosagem de IL-10 tecido adiposo.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN93-m – *American Institute of Nutrition*

BSA – Albumina de soro bovino (“*bovine serum albumin*”)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CMC – Carboxi metil celulose

DCA – Doença de Chagas

DH – Dieta hiperlipídica

DN – Dieta normolipídica

HDL – Lipoproteína de alta densidade (“*high density lipoprotein*”)

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (“*low density lipoprotein*”)

NaCl – Cloreto de sódio

NK – *Natural Killer*

PAI-1 – Inibidor de ativação do plasminogênio

PBS – Tampão fosfato-salino (“*phosphate buffered saline*”)

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TLR – Receptor tipo *Toll*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade (“*very low density lipoprotein*”)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.2. Aspectos imunológicos da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.3. A ação das estatinas.....	14
1.4. A dieta hiperlipídica	15
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Animais	18
3.2. Dietas e controle do peso.....	19
3.3. Estratégia experimental	20
3.4. Infecção e parasitemia	21
3.5. Tratamento com Sinvastatina	21
3.6. Avaliações bioquímicas.....	21
4. Resultados	25
4.1. Mortalidade dos animais	25
4.2. Parasitemia	25
4.3. Peso dos animais	25
4.4. Relação entre peso corporal e peso do fígado	27
4.5. Teste de tolerância oral à glicose	27
4.6. Teste de tolerância oral à insulina	29
4.7. Determinação de lipídeos hepáticos totais	30
4.8. Dosagens de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides plasmáticos.	30
4.9. Dosagens plasmáticas de TNF, CCL2, IL-10 e leptina.....	33
4.10. Dosagens de IFN- γ , IL-10 e TNF no tecido cardíaco.	35
4.11. Dosagens de IFN- γ , IL-10 e TNF no tecido adiposo.	37
6. Conclusão	42
7. Referências.....	43

1. Introdução

1.1. A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A tripanosomíase americana ou doença de Chagas é uma moléstia parasitária de substrato inflamatório cujas conseqüências compreendem alterações no sistema cardiovascular, digestório e/ou nervoso humano (Rocha et al., 2007). A doença de Chagas foi descrita por Carlos Chagas (1909) quando este encontrava-se envolvido no controle da malária em áreas próximas à cidade de Lassance, localizada na região central do estado de Minas Gerais. A doença tem como agente etiológico, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, o *Trypanosoma cruzi*. Tal parasita intracelular apresenta-se sob diferentes tipos morfológicos. A forma amastigota está presente no interior das células (principalmente células fagocitárias e musculares) do hospedeiro vertebrado. A forma tripomastigota sanguínea é encontrada no sangue de hospedeiros vertebrados, enquanto epimastigotas e esferomastigotas estão presentes no tubo digestivo dos vetores e nas glândulas anais de marsupiais. Já a forma tripomastigota metacíclica está presente na ampola retal do vetor e é responsável pela infecção do hospedeiro vertebrado (Coura & Borges Pereira, 2010).

O principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas em áreas endêmicas é a via vetorial. Esta ocorre quando um triatomíneo infectado exerce o repasto sanguíneo no hospedeiro e deposita ali suas fezes e urina contendo as formas infectantes. As formas tripomastigotas metacíclicas, por meio de solução de continuidade da pele ou pela mucosa, alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro onde ganharão novos sítios nos quais poderão reproduzir-se (Brener, 1976; Dias, 2010). Outras vias de transmissão da enfermidade que possuem grande importância epidemiológica e que dependem primariamente da presença de prévia transmissão vetorial são: (i) via transfusional, em que um indivíduo adquire o parasito por meio de recepção de sangue contaminado e (ii) via congênita, na qual o parasito é passado da mãe ao feto por meio da circulação ou por rompimento de ninhos de formas amastigotas presentes na placenta. Destaca-se ainda (iii) a via oral para ingestão, acidental, de formas infectantes que tem emergido nos últimos anos como uma das principais responsáveis pelo surgimento de casos agudos da doença (Dias, 2006; Coura, 2007). O período de incubação varia com a forma de transmissão, sendo a vetorial de 5 a 15 dias, a transfusional de 30 a 40 dias, a vertical que pode ocorrer em qualquer período da gestação ou durante o parto e a oral com um período de 3 a 22 dias (WHO, 2009; Coura, 2015).

A doença de Chagas, cerca de cem anos após ser descrita, constitui ainda um sério problema de saúde pública na América Latina. Estima-se que existam aproximadamente 7 a 8

milhões de pessoas infectadas e cerca de 30% das pessoas desenvolvem a forma crônica da doença com alterações cardíacas. Além disso, cerca de 10% desenvolvem a forma digestiva, neurológica ou alterações combinadas (WHO, 2013).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de novos casos de doença de Chagas tem sido descrita, em especial, na região da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará, Tocantins), onde a transmissão oral tem sido registrada com maior frequência, mas também nos estados de Minas Gerais, Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo (Brasil, 2009, Souza-Lima et al., 2013; Santana et al., 2014).

Na doença, observam-se duas fases clínicas: uma aguda, que pode ou não ser identificada precocemente, podendo evoluir para uma fase crônica. A doença de Chagas Aguda (DCA) é caracterizada por miocardite difusa, com vários graus de gravidade. Pode ocorrer pericardite, derrame pericárdico, cardiomegalia, insuficiência cardíaca e derrame pleural. As manifestações mais comuns são: febre prolongada e recorrente, cefaleia, mialgias, astenia, edema de face ou membros inferiores, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, ascite e *rash* cutâneo. Manifestações digestivas (diarreia, vômito e epigastralgia) são comuns na transmissão oral, podendo haver icterícia, lesões na mucosa gástrica e hemorragia digestiva. Na transmissão vetorial pode haver sinais de porta de entrada: sinal de Romaña (edema bupalpebral unilateral) ou chagoma de inoculação (lesão semelhante a um furúnculo que não supura). Meningoencefalite pode ocorrer em lactentes ou em casos de reativação (imunodeprimidos) (Hemmige et al., 2012). As alterações laboratoriais mais comuns são: anemia, leucocitose, linfocitose, plaquetopenia; alteração em enzimas hepáticas, provas de coagulação e marcadores de atividade inflamatória (velocidade de hemossedimentação, proteína C-reativa, entre outras). Para ser considerado um caso crônico, é necessária a comprovação de contato com o *T. cruzi* (sorológico ou parasitológico), e o indivíduo pode evoluir para as formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A forma clínica mais relevante é a cardíaca, uma vez que é causa de limitação e morte do indivíduo chagásico. Com esta forma cardíaca, o indivíduo pode apresentar insuficiência cardíaca de diversos graus, arritmias, acidentes tromboembólicos, aneurisma de ponta do coração, morte súbita (Brasil, 2009; Andrade et al., 2014).

1.2. Aspectos imunológicos da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Múltiplos fatores parecem contribuir para o curso da infecção pelo *T. cruzi*, mas a resposta imune do hospedeiro aparece como essencial para definir o prognóstico clínico tanto em seres humanos, quanto no modelo experimental. Dentre estes fatores destaca-se a resposta mediada por anticorpos, a autoimunidade e a produção de mediadores inflamatórios e regulatórios coordenando o controle parasitário, a intensidade da resposta imune e possivelmente as alterações clínicas no hospedeiro (Basso, 2013). A produção de citocinas e quimiocinas tem extrema relevância na alteração da homeostasia e no recrutamento leucocitário, ambos essenciais para a imunopatogênese da infecção pelo *T. cruzi* (Brenner & Gazzinelli, 1997; Talvani, 2000; Teixeira et al., 2002; Talvani & Teixeira, 2011).

As citocinas são moléculas sinalizadoras, secretadas por diferentes tipos de células e envolvidas na inflamação, imunidade, diferenciação e divisão celular. As citocinas apresentam destacada participação no controle da infecção pelo *T. cruzi* e são responsáveis por ativar células fagocitárias, intensificar a produção de óxido nítrico, estimular as células *Natural Killer* (NK), além do controle da resposta inflamatória pela IL-10 (Paiva et al., 2009; Talvani & Teixeira; 2011). Nesse mesmo sentido, as quimiocinas são mediadores inflamatórios com alto poder de recrutamento tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Talvani & Teixeira; 2011). São classificadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteínas, podendo ser agrupadas nas famílias CXC (α), CC (β), C (γ) e subfamília CX3C (δ). Dentre as várias quimiocinas envolvidas no processo inflamatório agudo da infecção pelo *T. cruzi*, destacam-se a CCL2 e CCL5 responsáveis pelo recrutamento de monócitos e células T para o sítio de infecção (Machado et al., 2013).

A citocina inflamatória TNF, por sua vez, exerce importante papel durante a infecção pelo *T. cruzi*, mediando os danos ao tecido muscular cardíaco e contribuindo para uma sobrevivência do hospedeiro (Roggero et. al., 2009). Além disso, tanto o IFN- γ quanto o TNF, ambos sintetizados durante a fase inicial e crônica da infecção pelo *T. cruzi*, são importantes agentes potencializadores da produção de quimiocinas (Talvani et al. 2000, Talvani et. al., 2004, Cunha-Neto et. al., 2009).

Por outro lado, essa resposta inflamatória desencadeada por este protozoário apresenta mecanismos ou mediadores capazes de controlá-la ou amenizá-la. A IL-10 também é encontrada em altos níveis no tecido cardíaco durante a fase aguda da doença, porém inibindo a resposta inflamatória (Tricoli et. al., 2009; Hovsepian et al., 2013). Tanto mecanismos intrínsecos ao hospedeiro quanto extrínsecos (ex. fármacos) tornam-se importantes alvos de

investigação básica e clínica, pois podem atuar como proteção parcial dos tecidos infectados aumentando a perspectiva funcional de seu respectivo órgão.

1.3. A ação das estatinas

Medicamentos do grupo farmacológico das estatinas, eficazes redutores do LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) são inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA) – uma enzima chave na síntese de colesterol pela via do mevalonato (Vaughan et al., 2010; Fukuda et al., 2014). A inibição dessa enzima reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, há aumento do número de receptores de LDL-colesterol nos hepatócitos e internalização do colesterol circulante (Santos & Silva, 2010). As estatinas também possuem propriedades pleiotrópicas como a habilidade de reduzir a inflamação sistêmica, estimular a angiogênese, melhorar a função endotelial e recrutar células-tronco derivadas da medula óssea (Weis et al., 2002; Robinson, 2008; Ferreira & Sato, 2013).

As estatinas reduzem a morbidade e mortalidade em indivíduos com distintas doenças cardiovasculares, contribuindo para a melhora da função ventricular esquerda e a prevenção ou atenuação do progressivo remodelamento na deficiência cardíaca (Nissen et al., 2004; Mancini et al., 2006; Spósito et al., 2011). Os benefícios clínicos das estatinas estão associados à sua capacidade de diminuir a síntese de colesterol, principal indicação terapêutica (Ferreira & Sato, 2013). Em resposta à redução de colesterol livre nos hepatócitos, a síntese de receptores de LDL na superfície dos hepatócitos aumenta, levando à maior remoção de LDL proveniente da corrente sanguínea que, por sua vez, induz uma maior redução de colesterol LDL disponível no organismo. A droga mostra-se eficaz na redução das concentrações sanguíneas do colesterol total, do colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade LDL-colesterol e do colesterol ligado à lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), além dos lipídeos, da apolipoproteína B e dos triglicérides plasmáticos, quando a resposta à dieta e a outras medidas não farmacológicas forem insuficientes. A Sinvastatina também eleva o HDL-colesterol e, portanto, reduz a relação de LDL/HDL-colesterol e a relação colesterol total/HDL. A redução do colesterol se reflete na diminuição do desenvolvimento de doenças cardiovasculares o que conseqüentemente propicia a queda na taxa de mortalidade (Villela, 2013).

A ação anti-inflamatória das estatinas resulta, a princípio, na redução da concentração de lipoproteínas ricas em colesterol no plasma (Silva, 2009), e as pesquisas atuais apontam para três mecanismos básicos responsáveis pela ação anti-inflamatória da Sinvastatina: a

redução da disponibilidade celular dos radicais isoprenóides (Rosendo et al., 2007; Campo & Carvalho, 2007); inibição da adesão de moléculas associadas ao recrutamento de células inflamatórias; e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral TNF e a IL-6, liberadas pelo tecido adiposo (Villela, 2013).

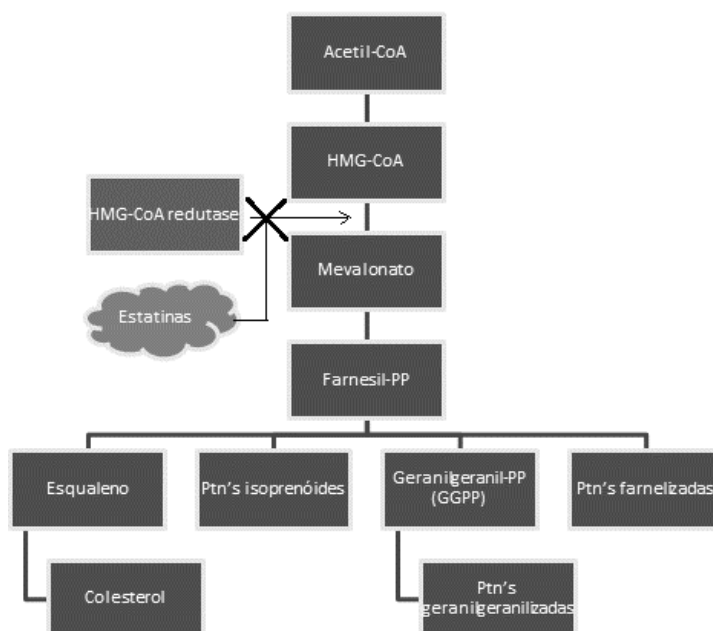


Figura 1. Ação das Estatinas na via do mevalonato.

As estatinas atuam impedindo a ação da HMG-Coa redutase na conversão da HMG-CoA em mevalonato.

1.4. A dieta hiperlipídica

A ingestão de dietas hiperlipídicas está diretamente relacionada ao desenvolvimento da obesidade e os ácidos graxos saturados de cadeia longa são os lipídeos mais nocivos quando se trata de acúmulo de massa adiposa (Veloso, 2009; Milansky, 2009). Essas moléculas atuam na resposta inflamatória ligando-se aos receptores do tipo *Toll* (TLR2 e TLR4) das micróglia, células protetoras do hipotálamo, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias como a proteína C-reativa e citocinas (TNF, IL-1 β e IL-6), bem como leptina e, conseqüentemente, a destruição dos neurônios responsáveis pelo controle do apetite e da termogênese (Zeida & Stulning, 2009; Rosini, 2012).

Devido a estas características, a obesidade é vista como um estado inflamatório de baixa intensidade o que se deve ao fato do tecido adiposo branco produzir uma série de citocinas ou adipocinas, envolvidas diretamente nesse processo inflamatório (Lopes, 2007; Nagajyothi et al, 2008). Em outras palavras, o termo adipocina, é uma terminologia didática para representar algumas proteínas e peptídeos da resposta imune, a exemplo de hormônios

tais como leptina, adiponectina, visfatina, apelina, omentina e citocinas inflamatórias, incluindo-se o fator de necrose tumoral (TNF), proteína ativadora do plasminogênio tecidual (PAI-I) (Furtado, 2013). As adipocinas produzidas modulam uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo humano. Na obesidade, ocorre uma hiperexpressão de TNF no tecido adiposo, secundário a um aumento de síntese e a uma estabilização da citocina no adipócito com o aumento da sua vida média (Lopes, 2007).

É sabido que humanos obesos e animais com maior índice de massa corporal têm dificuldades em responder a infecções, como por exemplo, sepse e influenza H1N1 (Karlsson et al., 2010; Tsatsanis et al., 2010). Parker e colaboradores (2009) encontraram resultados parecidos em infecção experimental por *Staphylococcus aureus* de modelo experimental para diabetes e obesidade. Enquanto o modelo não diabético curou a infecção em dez dias, a infecção no modelo obeso foi prolongada e associada com a resposta inflamatória.

Nos últimos anos uma atenção especial tem sido dada aos estudos experimentais envolvendo adipócitos e a infecção com o protozoário *T. cruzi* (Combs et al., 2005; Nagajyothi, 2009; Nagajyothi, 2013). Acredita-se que exista uma correlação entre a infecção pelo *T. cruzi* e o metabolismo de gorduras, uma vez que o tecido adiposo tem se mostrado um importante alvo e reservatório para a infecção, já que durante períodos de imunossupressão, os parasitos podem ser reativados a partir do tecido adiposo (Nagajyothi et al., 2009). Assumindo a característica inflamatória da infecção pelo *T. cruzi*, o tecido adiposo torna-se um promissor foco de investigação para o contexto desta infecção tropical tanto em modelo básico (*in vitro* e *in vivo*) quanto no contexto da clínica da doença de Chagas (Coura, 2007).

Considerando a infecção pelo *T. cruzi* e a consequente resposta inflamatória do hospedeiro, tornam-se alvo de estudo todos os mecanismos que interfiram nessa via de produção e ativação celular e de seus mediadores inflamatórios. A avaliação da resposta inflamatória associada à ingestão de uma dieta hiperlipídica enriquece a compreensão dos mecanismos inflamatórios pertinentes à inflamação induzida pelo *T. cruzi* e, demonstrado se efeitos benéficos das estatinas amenizando tais eventos inflamatórios/clínicos, acredita-se que novos estudos poderão ser propostos para seres humanos para confirmar a hipótese da ação protetora das estatinas em pessoas diagnosticadas com doença de Chagas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica sobre a resposta inflamatória de animais isogênicos infectados experimentalmente pelo *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com sinvastatina.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica sobre a infecção pelo *T. cruzi* (parasitos circulantes) e sobre a mortalidade de camundongos isogênicos.
2. Identificar o percentual de lipídeos hepáticos em animais que receberam ou não a dieta hiperlipídica.
3. Avaliar a relação entre dieta hiperlipídica e infecção pelo *T. cruzi* no perfil bioquímico dos camundongos isogênicos.
4. Avaliar a influência da dieta hiperlipídica e da infecção pelo *T. cruzi* no desenvolvimento de comorbidades como a resistência à insulina.
5. Avaliar a produção de citocinas (TNF, IL-10, CCL2 e Leptina) no plasma para associação da dieta hiperlipídica com a infecção pelo *T. cruzi*.
6. Avaliar a produção de citocinas (TNF, IL-10 e IFN- γ) nos tecidos cardíacos e adiposo para associação da dieta hiperlipídica com a infecção pelo *T. cruzi*.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados 80 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 3 semanas de idade e peso aproximado de 14g. Estes animais foram alocados no biotério central da UFOP, em salas climatizadas em condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ($22,0\pm 2$ °C) e em gaiolas de polipropileno.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e foram mantidos durante todo o experimento sem restrição de água ou ração.

Os animais foram divididos em dois grandes grupos: “Grupo com dieta normolipídica (DN)” (n=40) demonstrado na figura 2 e “Grupo com dieta hiperlipídica (DH)” (n=40) demonstrado na figura 3 de acordo com o tipo de dieta fornecida. Em cada grupo os animais foram novamente divididos entre “infectados” (n=20) e “não infectados” (n=20), e, posteriormente novamente divididos entre “tratados com sinvastatina” (n=10) e “não tratados com sinvastatina” (n=10).

Todos os procedimentos propostos nesse estudo encontram-se de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a metodologia foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA), sob o protocolo 2012/42. O experimento está de acordo com 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.

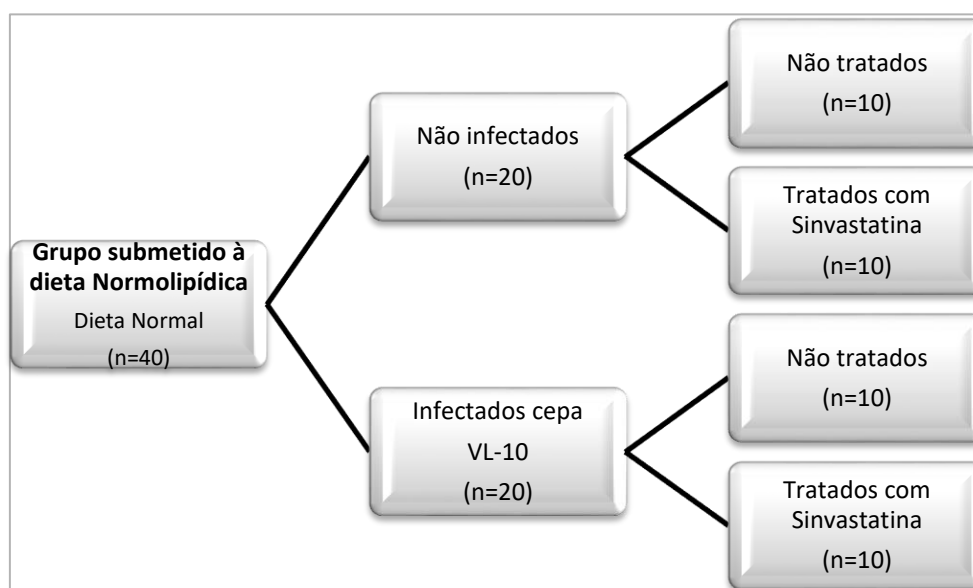


Figura 2. Grupo submetido à dieta normolipídica: distribuição dos animais.

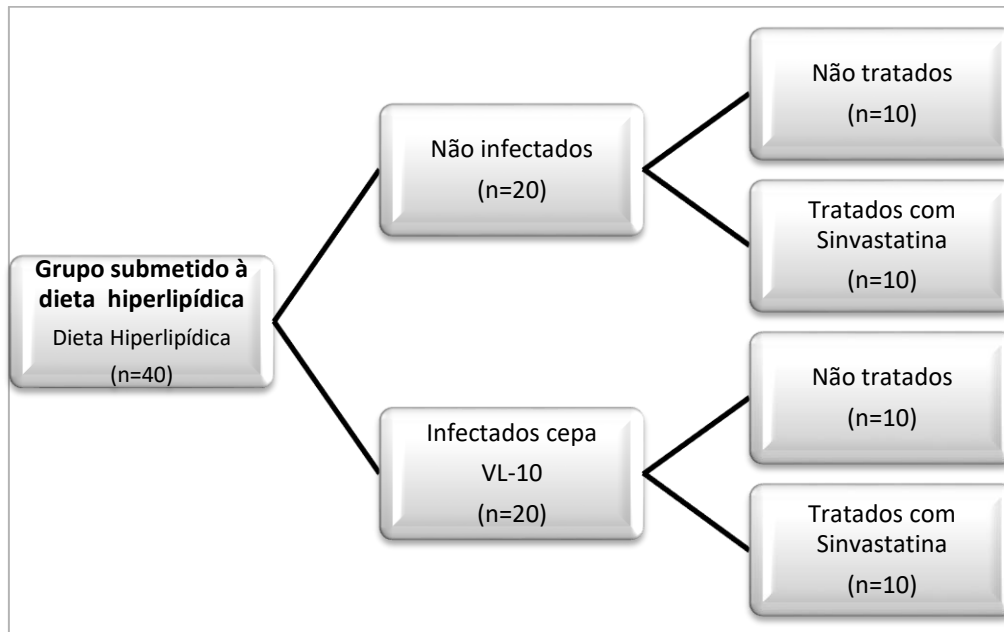


Figura 3. Grupo submetido à dieta hiperlipídica: distribuição dos animais.

3.2. Dietas e controle do peso

Uma DN foi utilizada para manutenção do estado nutricional eutrófico (*American Institute of Nutrition-93M*), assim como sua fórmula alterada para uma DH contendo 60% de lipídios foi utilizada para indução do ganho de peso. A dieta utilizada foi produzida e fornecida pela PragSoluções e Comercio Ltda. São Paulo – SP.

Tabela 1. Composição das dietas oferecidas aos animais durante o experimento. Valores referentes a 100 gramas do produto final

Ingrediente/kg dieta	Normolipídica (8%)	Hiperlipídica (60%)
Amido	619,492	249,492
Banha	-	320,000
BHT (Tert-Butylhidroquinone)	0,008	0,008
Caseína	140,000	190,000
Colina	2,500	2,500
Fibra	50,000	50,000
L-Cistina	3,000	3,000
Mix de Minerais ¹	35,000	35,000
Mix de Vitaminas ²	10,000	10,000
Óleo de Soja	40,000	40,000
Sacarose	100,000	100,000
Valor calórico total	4477.46	5917.5

1. Mistura de minerais (expresso em g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / MgSO₄.7H₂O- 57,3 / CaCO₃- 381,4 / MnSO₄.H₂O – 4,01 / FeSO₄.7H₂O – 0,548 / CuSO₄. 5H₂O – 0,477 / CoCl₂.6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0. 2. Mistura de vitaminas (expresso em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido p- amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; biotina – 40; cianocobalamina – 3; dl- α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000. *Acrescida de 1% de colesterol SIGMA® Fatores de conversão: proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g, açúcares 4 kcal/g.

3.3. Estratégia experimental

Durante os 90 dias de experimento, os animais receberam dieta e água livres. No 60º dia foi realizada a inoculação de formas tripomastigostas do *T. cruzi* cepa VL-10 nos grupos selecionados e o tratamento com Sinvastatina (20mg/kg) foi iniciado 24 horas após a infecção. Ao 90º dia de experimento foi realizada a eutanásia dos animais.

A eutanásia foi realizada por inalação de gás CO₂ e foram retirados os seguintes constituintes biológicos dos animais: sangue, coração, fígado, e tecido adiposo. Estes foram preservados (formalina 10% ou congelamento a -80°C), de acordo com a técnica a ser empregada posteriormente.

3.4. Infecção e parasitemia

Foram inoculados, intraperitonealmente, com 5×10^3 formas tripomastigotas da cepa VL-10 os seguintes grupos experimentais: (i) 10 que receberam a DN; (ii) 10 que receberam a DN e tratados com Sinvastatina; (iii) 10 animais que receberam a DH e (iv) 10 que receberam a DH e tratados com Sinvastatina. Adicionalmente foram utilizados 40 animais não infectados com este mesmo delineamento (n=10 cada).

Para a confirmação da infecção nos animais e parasitemia, foi utilizada a técnica de Brener (1962) por meio de coleta de 5ul de sangue pela secção de veias superficiais da cauda e contagem direta dos parasitos circulantes em lâmina/lamínula.

3.5. Tratamento com Sinvastatina

A dose de Sinvastatina administrada foi de 20mg/kg de peso, já padronizada no Laboratório de doença de Chagas da UFOP (SILVA et al., 2012) e administrada diariamente via gavagem. Os comprimidos de Sinvastatina eram triturados em cadinho de porcelana com o auxílio de um pistilo e posteriormente pesado para determinação da quantidade adequada para atingir a concentração de 20mg do fármaco/kg peso. O medicamento era diluído em solução de carboximetilcelulose (CMC) e posteriormente administrado nos animais. Os grupos de animais não tratados com Sinvastatina receberam somente o tratamento de CMC também via gavagem para minimizar possíveis consequências de lesões ou estresse causados pelo procedimento. O medicamento foi administrado diariamente no início da manhã (07:30 – 08:00 horas) uma vez que as estatinas devem ser administradas em período que antecede ao repouso e no caso do modelo murino, sua maior atividade é noturna.

3.6. Avaliações bioquímicas

▪ Colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL

Foram dosados os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e HDL dos animais. As determinações de colesterol total, triglicerídeos e HDL foram realizadas baseando-se no método enzimático colorimétrico e utilizando os Kits enzimáticos colesterol, triglicerídeos e HDL Liquiform, da Labtest Diagnóstica SA (Lagoa Santa, MG).

Os valores de LDL foram obtidos através da seguinte fórmula de Friedewald e colaboradores (1972), considerada referência pelo *Center for Disease, Control and Prevention* (CDC):

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL Triglicérides}/5.$$

▪ **Quantificação dos níveis de lipídeos totais hepáticos**

Durante a eutanásia o fígado dos animais foi removido, lavado em solução salina fisiológica, seco em papel de filtro e pesado. Foi então colocado em papel alumínio e mantido a -80°C até a realização das dosagens.

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de Folch et al., (1957). Em síntese, foram pesados 100 mg de fígado em tubos de plástico previamente identificados e posteriormente triturados com 1900 μL de solução contendo clorofórmio-metanol (2:1) homogeneizando por 3 minutos à uma velocidade 10000 rpm. 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, 640 μL de solução de NaCl a 0,73% e as amostras foram 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 37°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.

▪ **Teste de tolerância oral à glicose**

O teste de tolerância oral à glicose é um método de referência para o diagnóstico do diabetes ou da intolerância à glicose. Foi administrado por gavagem uma solução de glicose (2g/kg de massa corporal) e a glicemia determinada nos tempos zero (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem, utilizando-se glicosímetro e fitas para glicemia da marca Accu-check Active®. O sangue utilizado nas medições foi retirado da cauda no animal.

- **Teste de tolerância à insulina**

O Teste T de Studentolerância à insulina é usado para medir a resistência periférica à insulina. Este teste mensura a sensibilidade à insulina utilizando a constante do desaparecimento da glicose como índice do metabolismo da glicose mediado pela insulina.

Foi injetado por via subcutânea 1U/kg de massa corporal de insulina regular da marca Humulin® com o animal acordado, sem o uso de anestésico. A glicemia foi mensurada nos tempos 0 (basal), 30, 60, 90 e 120 minutos utilizando-se um glicosímetro e fitas para glicemia da marca Accu-check Active®. O sangue utilizado nas medições foi retirado da cauda no animal.

- **Ensaio imunoenzimático**

Foram realizadas as dosagens de TNF, IL-10, CCL2 e Leptina do plasma e também IFN- γ , IL-10 e TNF dos tecidos cardíaco e adiposo dos animais, pelo método imunoenzimático - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando-se plasma, tecido cardíaco e adiposo dos camundongos infectados ou não pelo *T. cruzi*.

O plasma dos animais obtidos após separação por centrifugação a 4000rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 graus Celsius. O plasma foi coletado e o precipitado descartado. Para avaliação imunoenzimática nos tecidos, foram pesados 0,003 gramas de tecido cardíaco e 0,02 gramas de tecido adiposo, que sofreram maceração e diluição em 1mL de PBS, depois o material foi centrifugado a 1000rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 graus Celsius. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado.

Após a preparação das amostras, utilizou-se kits para detecção dos marcadores inflamatórios (CCL2, IFN- γ , IL-10, Leptina e TNF) da fabricante R&D Systems Inc., Minneapolis, USA. Para a sensibilização das microplacas de 96 poços foram adicionados 100 μ l/poço dos anticorpos monoclonais contra a proteína a ser dosada, diluídos em PBS contendo 0.1% de albumina de soro bovino - BSA (SIGMA), sendo estas placas incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-Tween e as placas bloqueadas com 300 μ l/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 37°C. A seguir as placas foram novamente lavadas. Após o bloqueio foram adicionados 25 μ l das amostras de plasma e de 100 μ l dos padrões para cada marcador. Após 2 horas de incubação realizou-se novamente o processo de lavagem e foram adicionados 100 μ l dos anticorpos biotinilados de detecção, anti-

citocina/quimiocina usando diferentes diluições em PBS, pH 7,4 com 1% de albumina bovina e incubadas duas horas a temperatura ambiente, seguindo-se a lavagem. Em seguida foram adicionados 100µl/poço de estreptoavidina HRP (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) em diluição de 1:200 em PBS com 1% de albumina bovina e posterior incubação a temperatura ambiente durante 20 min. As placas foram novamente lavadas e adicionado 100µl da solução substrato por poço (mistura diluída 1:1 de peróxido do hidrogênio e tetrametilbenzidina), seguido de incubação por 20-30 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida acrescentando-se 50µl de H₂SO₄ 1M por poço. A densidade óptica foi determinada utilizando leitor de microplacas com filtro de 450nm. A quantificação dos mediadores inflamatórios presentes nas amostras foi determinada utilizando a densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas e analisadas pelo *software SOFTmax PRO 4.0*.

3.7. Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism* (versão 5.0) e os dados analisados pelo Teste T de Student de Student. As diferenças foram consideradas significativas para o *p* igual ou menor a 0,05.

4. Resultados

4.1. Mortalidade dos animais

Não houve mortalidade durante todo o experimento.

4.2. Parasitemia

A parasitemia dos animais foi avaliada durante os trinta dias de infecção. A dieta hiperlipídica favoreceu a replicação dos parasitos (Figura 4). Por outro lado, o tratamento com Sinvastatina reduziu o número de parasitos circulantes no grupo submetido à dieta hiperlipídica.

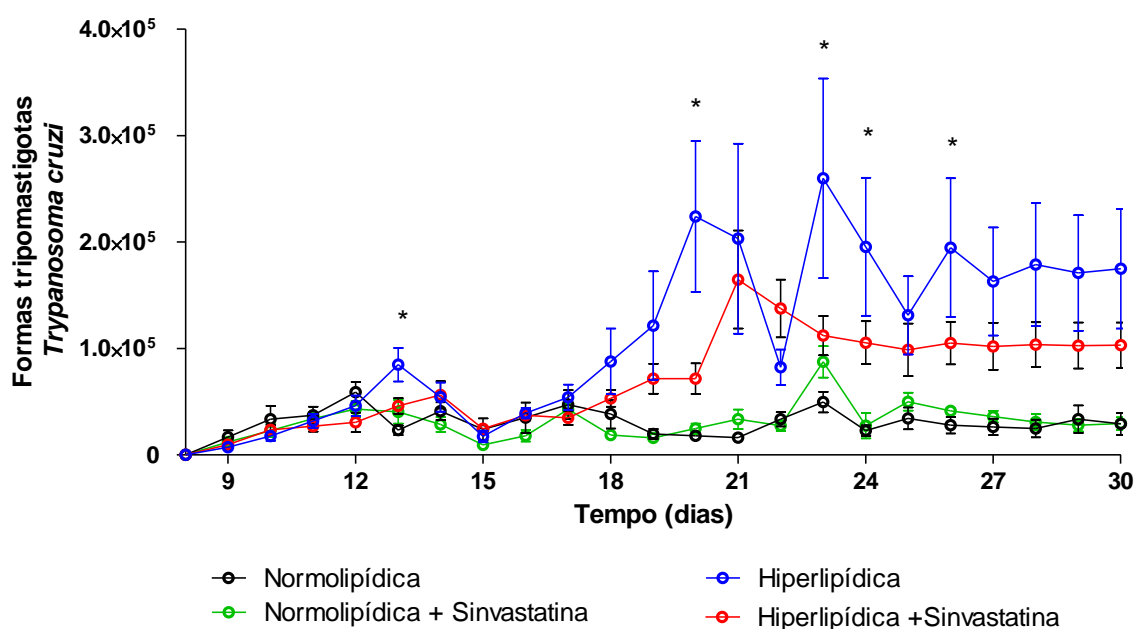


Figura 4. Avaliação da parasitemia durante os 30 dias de infecção. Animais alimentados com DN em preto; alimentados com DN e tratados com sinvastatina em verde; alimentados com DH em azul; e alimentados com DH e tratados com Sinvastatina em vermelho. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo TESTE T DE STUDENT, sendo significativo o $p < 0.05$. Diferenças significativas apresentadas com “*”.

4.3. Peso dos animais

O peso dos animais foi aferido semanalmente durante as treze semanas de experimento. Não foi encontrada diferença entre o peso dos animais.

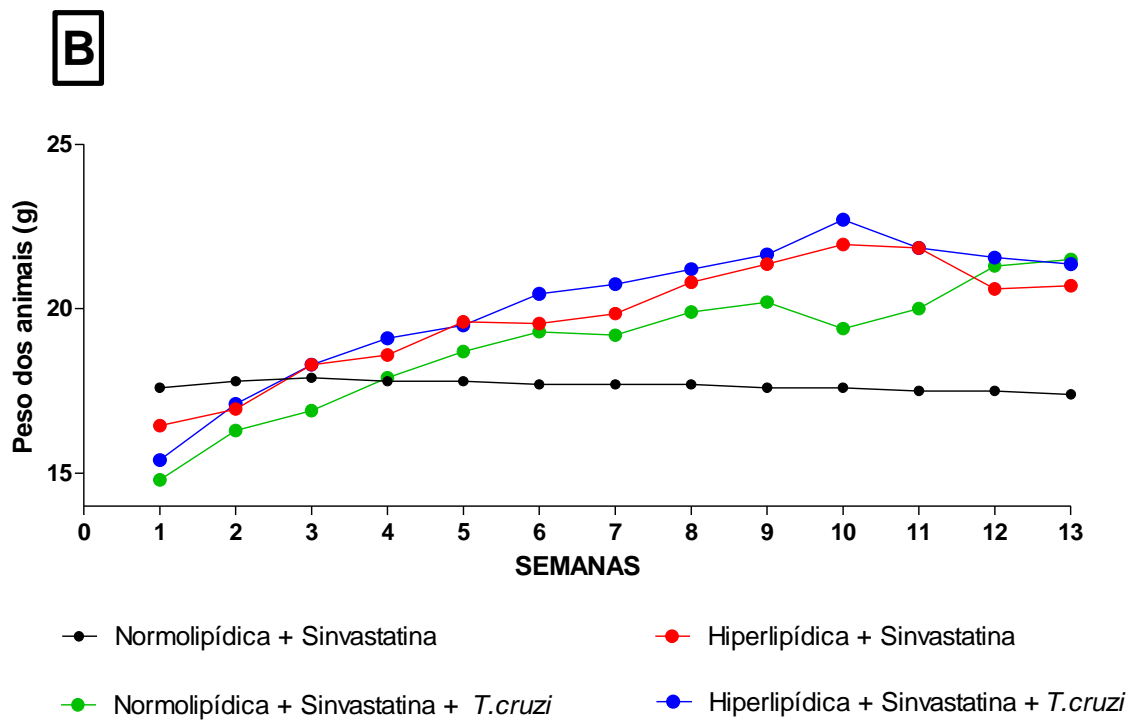
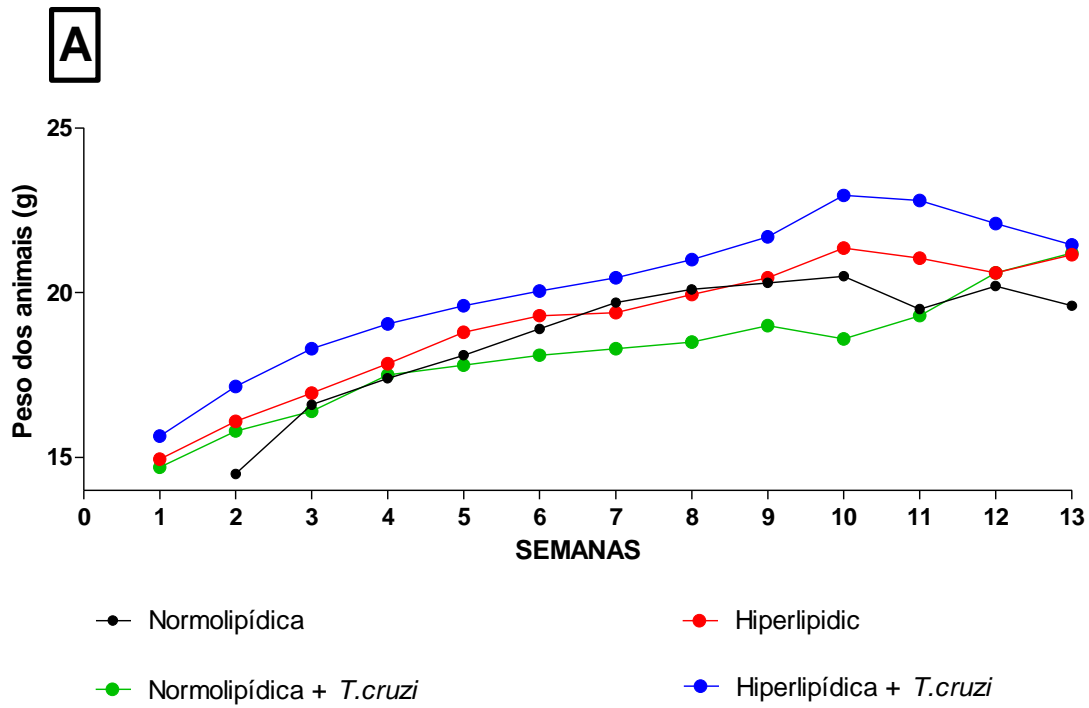


Figura 5. Avaliação do ganho de peso nas 13 semanas de estudo. Figura 5A representa animais não tratados com sinvastatina e figura 5B representa animais tratados com sinvastatina. Animais alimentados com DN em preto, alimentados com DN e infectados pelo *T. cruzi* em verde, alimentados com DH em vermelho e alimentados com DH infectados pelo *T. cruzi* em azul. Dados representam a média de peso semanal média \pm SEM. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$.

4.4. Relação entre peso corporal e peso do fígado

Na tabela 2, encontra-se descrita a média da relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais realizada no momento da eutanásia (30 dias pós-infecção). Os dados mostraram aumento do peso relativo do fígado em todos os grupos de animais infectados quando comparado com o grupo referência não infectado, mas nenhuma alteração em relação ao tratamento com sinvastatina.

Tabela 2. Peso relativo do fígado.

GRUPOS	VALORES MÉDIA +/- SEM
Normolipídica	0,048 ± 0,001*
Normolipídica + <i>T. cruzi</i>	0,058 ± 0,002*
Normolipídica + Sinvastatina	0,045 ± 0,002#
Normolipídica + Sinvastatina + <i>T. cruzi</i>	0,060 ± 0,002#
Hiperlipídica	0,041 ± 0,002 [‡]
Hiperlipídica + <i>T. cruzi</i>	0,061 ± 0,002 [‡]
Hiperlipídica + Sinvastatina	0,040 ± 0,001 ^{&}
Hiperlipídica + Sinvastatina + <i>T. cruzi</i>	0,061 ± 0,002 ^{&}

Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Diferenças significativas relacionadas por símbolos iguais.

4.5. Teste de tolerância oral à glicose

Os dados mostram a concentração de glicose no sangue após a administração nos animais. Foram observados valores de glicose maiores para os animais alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparado com animais alimentados com dieta normolipídica, e também maiores valores de glicose nos animais infectados, quando comparados ao respectivo grupo controle.

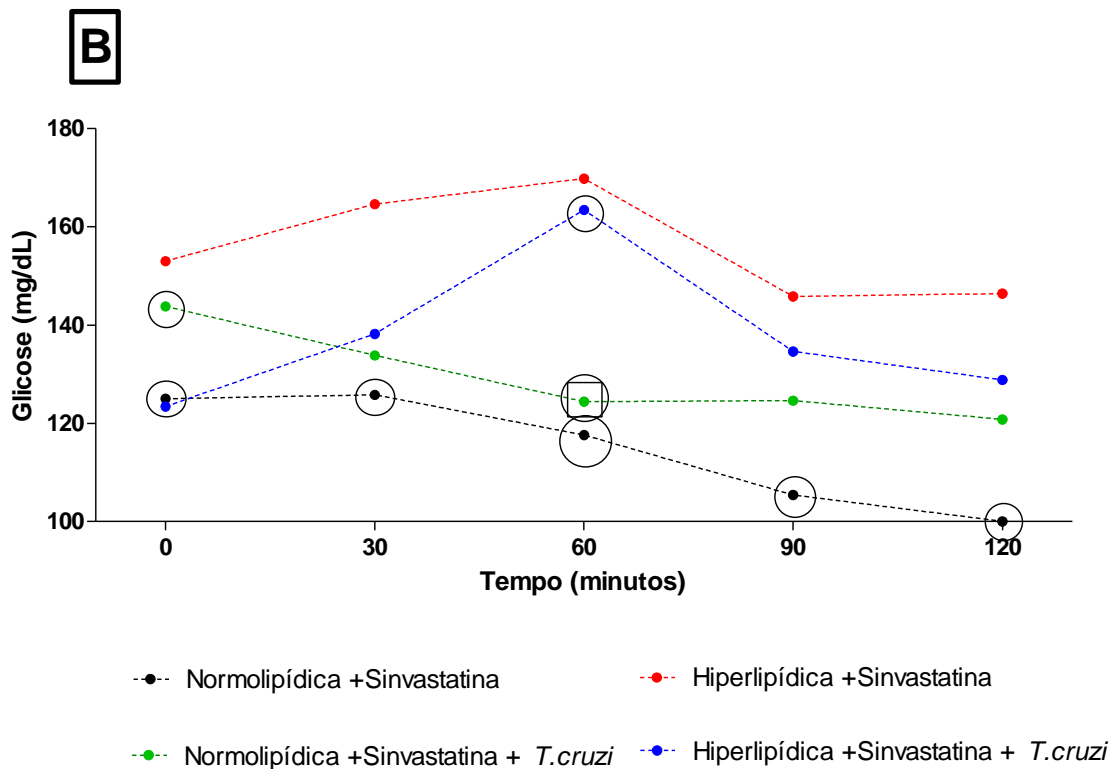
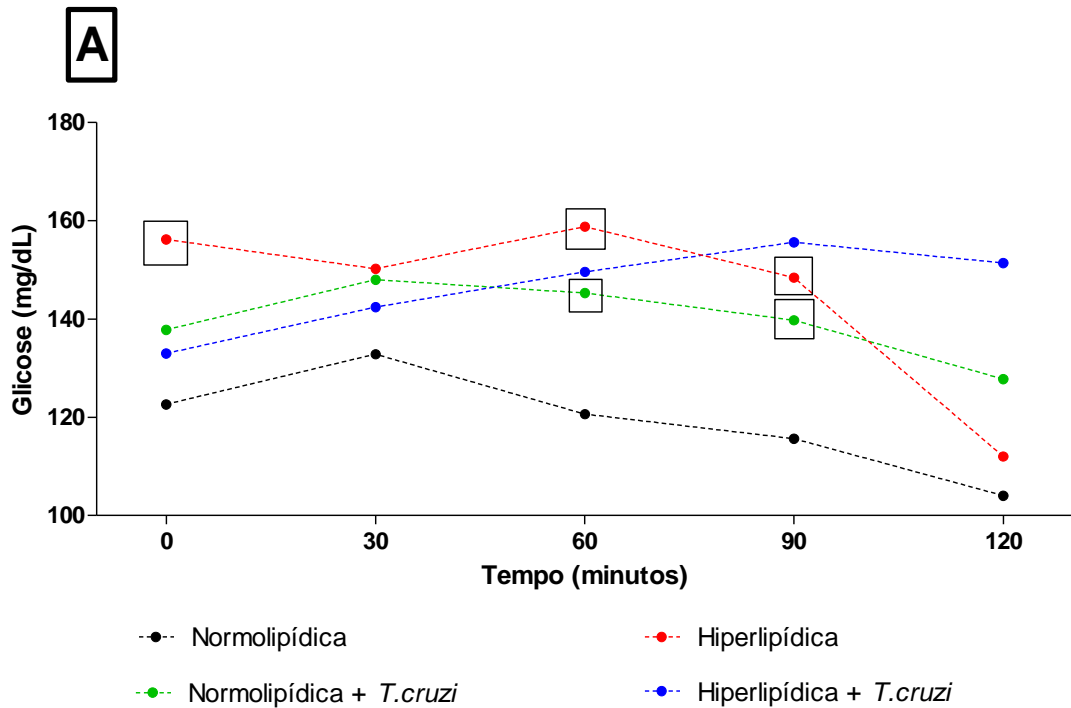


Figura 5. Teste de tolerância à glicose. Avaliação da resposta à ingestão de glicose nos tempos basal, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos. Figura 6A representa animais não tratados com sinvastatina e figura 6B representa animais tratados com sinvastatina. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo TESTE T DE STUDENT, sendo significativo o $p < 0.05$. No gráfico A os dados significativos em relação aos animais alimentados com a dieta normolipídica foram destacados com “quadrado”. No gráfico B os dados significativos em relação à dieta normolipídica foram destacados com “quadrado” e os dados significativos em relação à dieta hiperlipídica foram destacados com “círculo”.

4.6. Teste de tolerância oral à insulina

Os dados mostram a concentração de glicose no sangue após a administração de insulina intraperitoneal nos animais. Foram observados valores de glicose maiores para os animais alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparado com animais alimentados com dieta normolipídica.

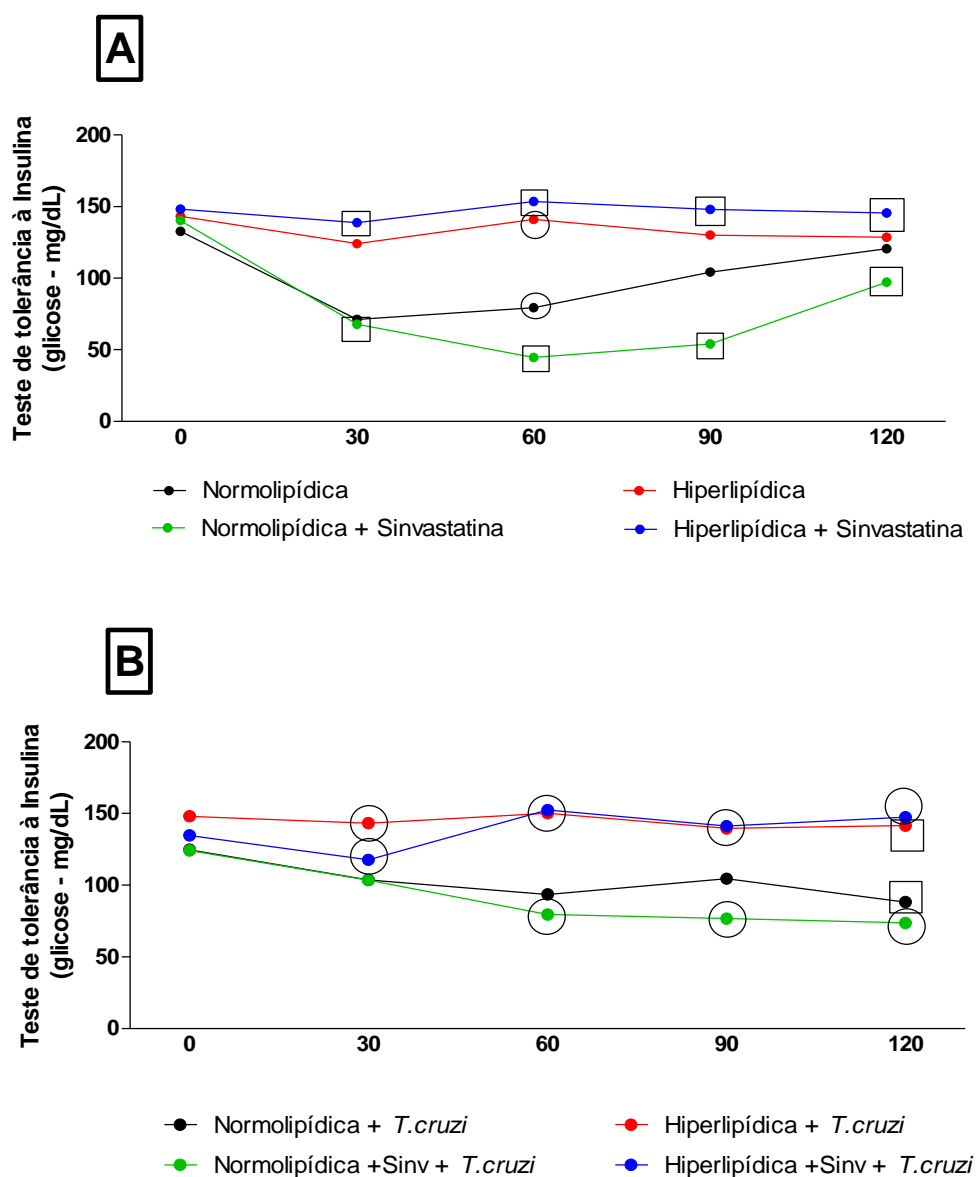


Figura 6. Teste de tolerância à insulina. . Figura 7A representa animais não infectados pelo *T. cruzi* e figura 7B representa animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo TESTE T DE STUDENT, sendo significativo o $p < 0.05$. Nos gráficos A e B, os dados significativos entre os grupos foram destacados com os símbolos iguais em cada tempo analisado. No gráfico A os dados significativos em relação aos animais alimentados com a dieta normolipídica foram destacados com “quadrado”. No gráfico B os dados significativos em relação à dieta normolipídica foram destacados com “quadrado” e os dados significativos em relação à dieta hiperlipídica foram destacados com “círculo”.

4.7. Determinação de lipídeos hepáticos totais

Foram determinados os níveis de lipídeos totais no fígado dos animais após a eutanásia. Foi observada maior quantidade de lipídeos totais no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica quando comparado ao controle normolipídico, tanto em animais infectados, quanto em animais não infectados pelo *T. cruzi*.

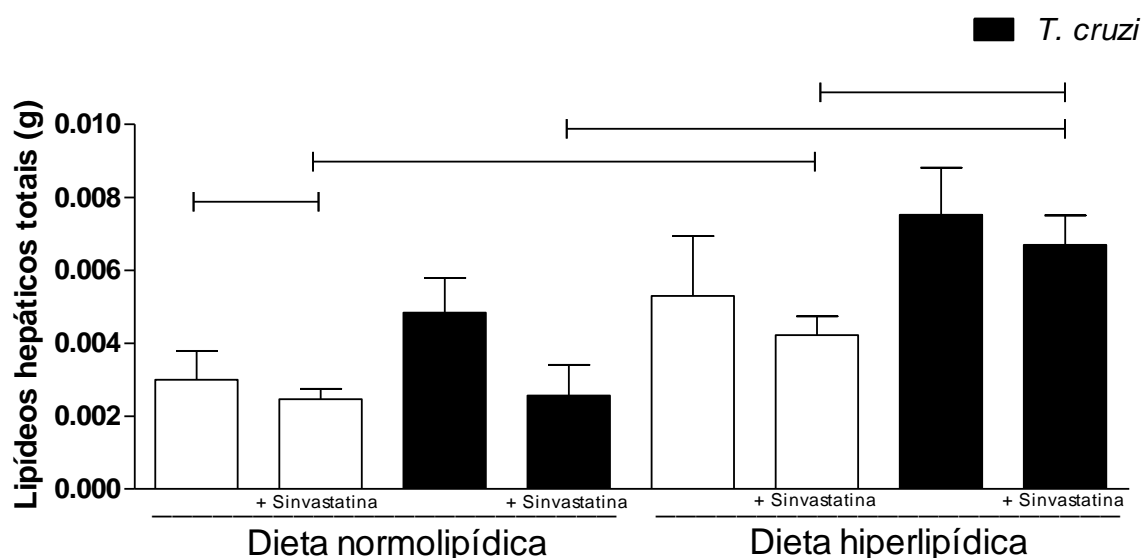


Figura 7. Lipídeos totais hepáticos. Dosagem de lipídeos totais hepáticos realizados pelo método de Folch et al (1957) após a eutanásia dos animais. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0,05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

4.8. Dosagens de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides plasmáticos.

Foram realizadas dosagens de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicérides no plasma dos diferentes grupos de camundongos do presente estudo. A figura 9 mostra os níveis de colesterol total. A sinvastatina atuou favorecendo a redução do colesterol total em todos os grupos, com exceção aos grupos alimentados com dieta normolipídica e não infectados.

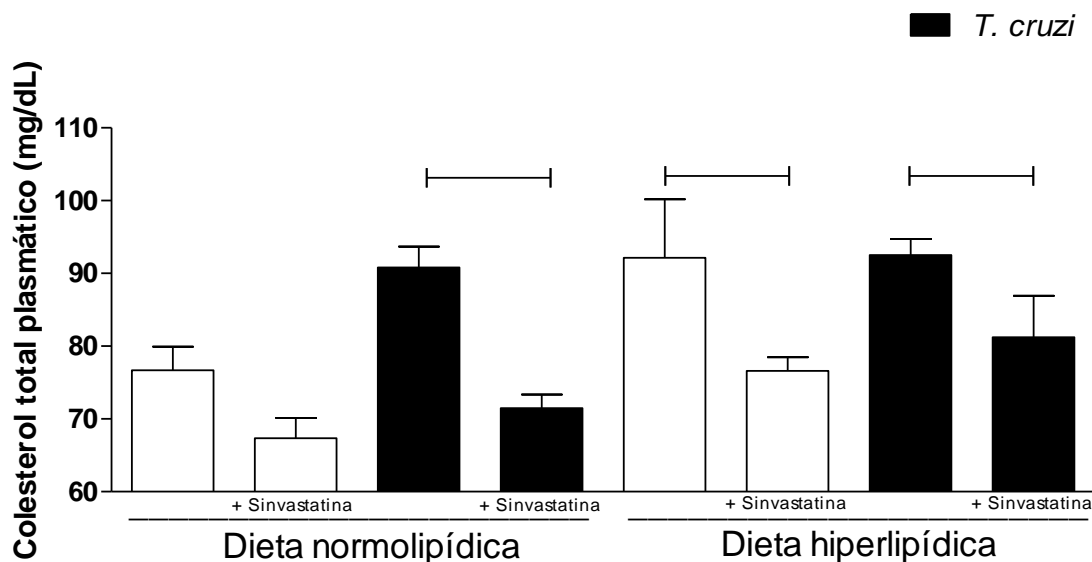


Figura 8. Colesterol total. Dosagens de colesterol total plasmáticos após a eutanásia dos animais. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 10 mostra os resultados das dosagens de colesterol HDL. Animais infectados tratados com sinvastatina e alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menores valores de HDL quando comparado ao respectivo grupo controle normolipídico.

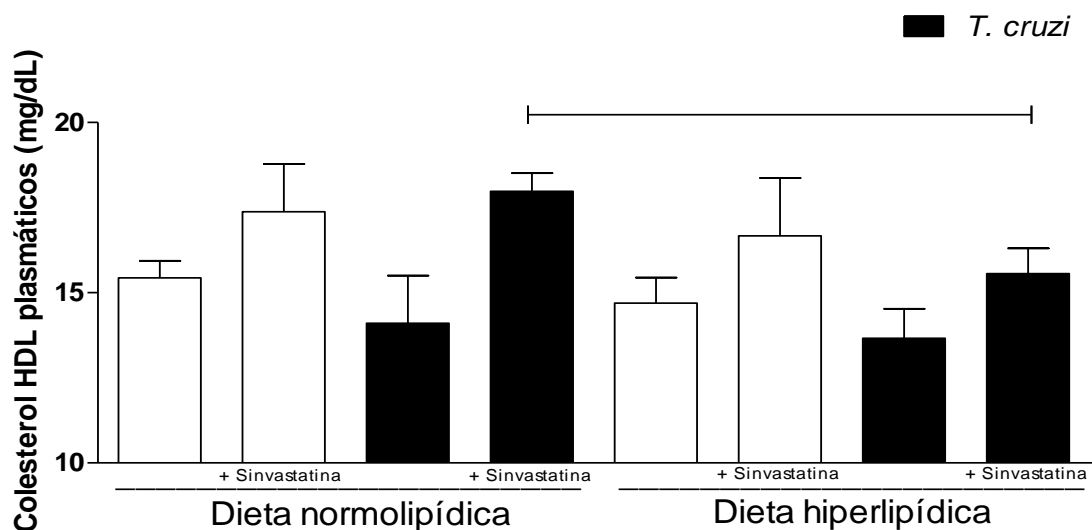


Figura 9. Colesterol HDL. Dosagem de colesterol HDL plasmáticos após a eutanásia dos animais. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 11 apresenta os resultados referentes às dosagens de colesterol LDL. Animais alimentados com dieta hiperlipídica e infectados pelo *T. cruzi* apresenta níveis elevados de LDL quando comparados ao respectivo controle normolipídico. No grupo alimentado com dieta normolipídica e infectado, a sinvastatina atuou reduzindo este lipídeo.

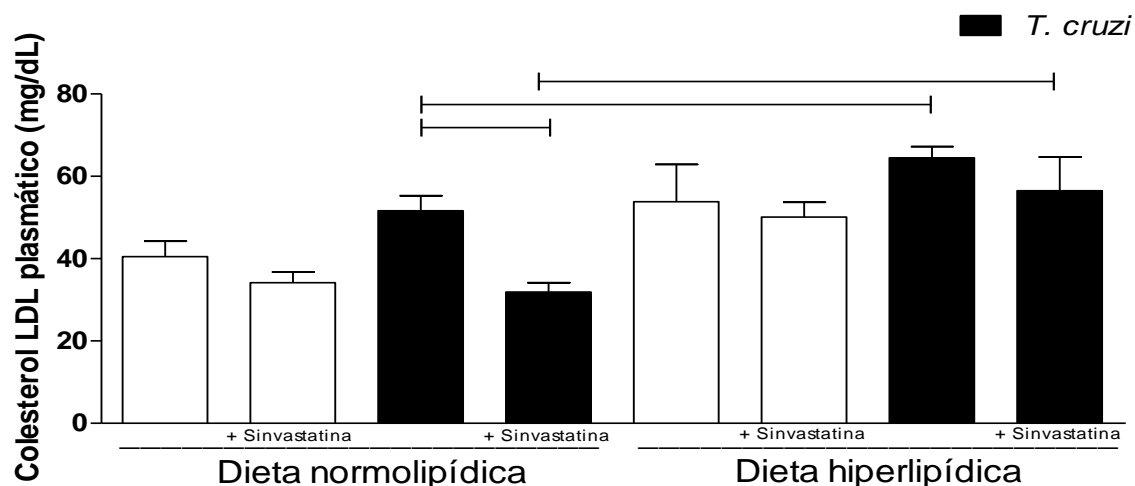


Figura 10. Colesterol LDL. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 12 mostra os resultados das dosagens dos triglicerídeos plasmáticos. Animais infectados tratados com dieta hiperlipídica apresentaram menores valores de triglicerídeos quando comparados ao respectivo controle normolipídico.

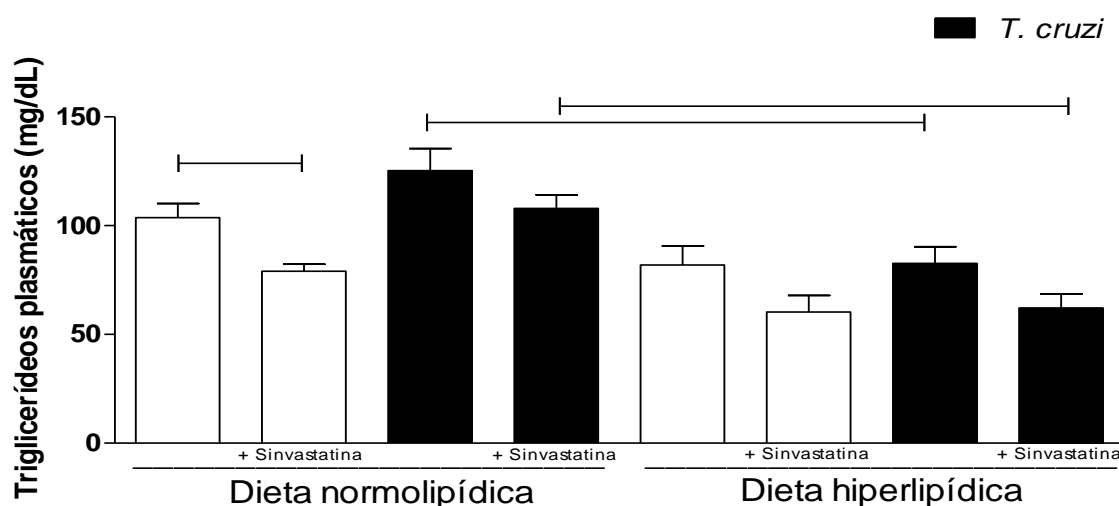


Figura 11. Triglicerídeos. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

4.9. Dosagens plasmáticas de TNF, CCL2, IL-10 e leptina

Os ensaios imunoenzimáticos realizados no plasma dos camundongos avaliaram os níveis de TNF, CCL2, IL-10 e leptina. A produção de TNF foi maior em animais infectados (figura 13).

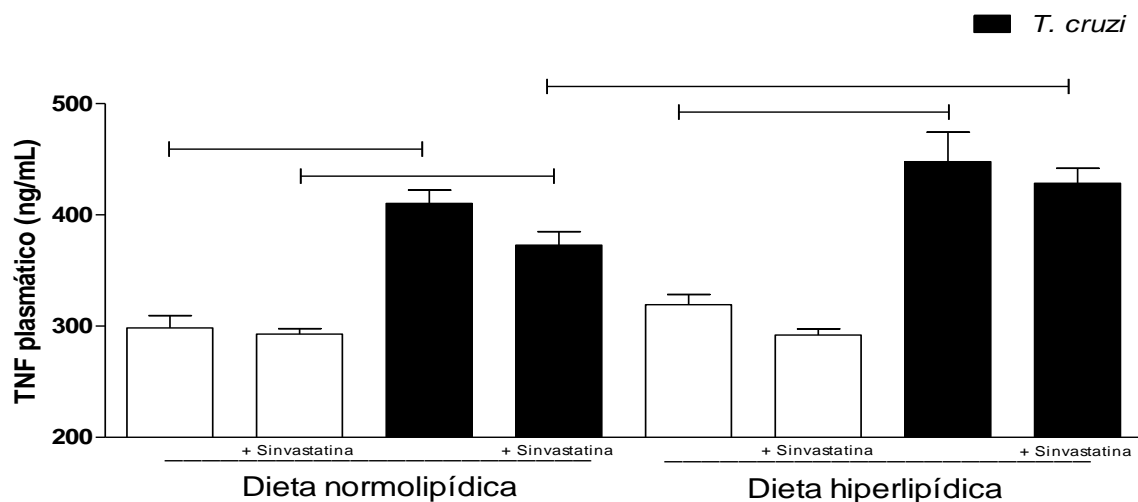


Figura 123. TNF plasmático. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 14 mostra a produção de CCL2. Foi evidenciado que a infecção aumenta os níveis dessa proteína. Por outro lado, a sinvastatina atuou reduzindo os níveis desta quimiocina.

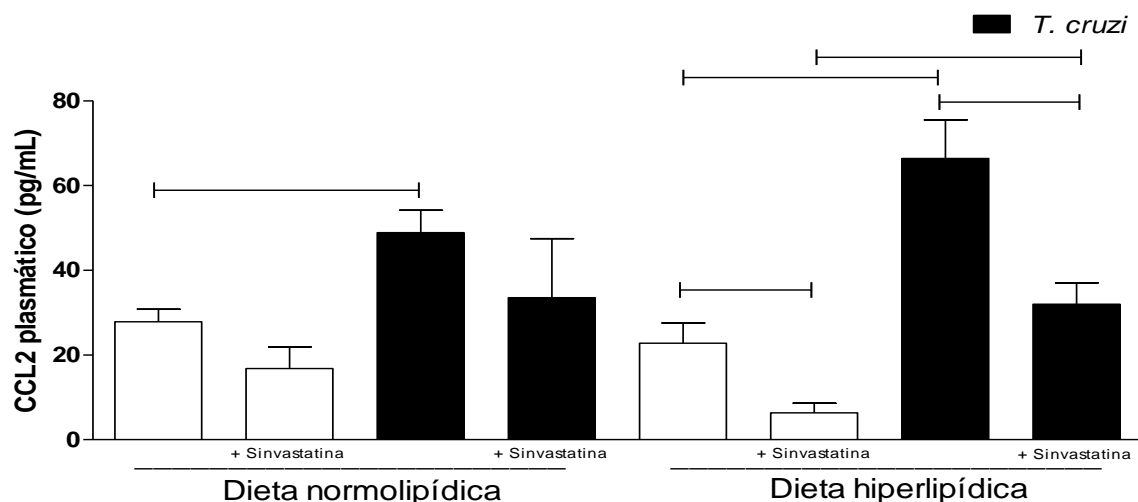


Figura 134. CCL2 plasmático. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 15 mostra os níveis plasmáticos de IL-10. O grupo alimentado com dieta hiperlipídica produziu menor quantidade da citocina quando comparado ao grupo alimentado com dieta normolipídica.

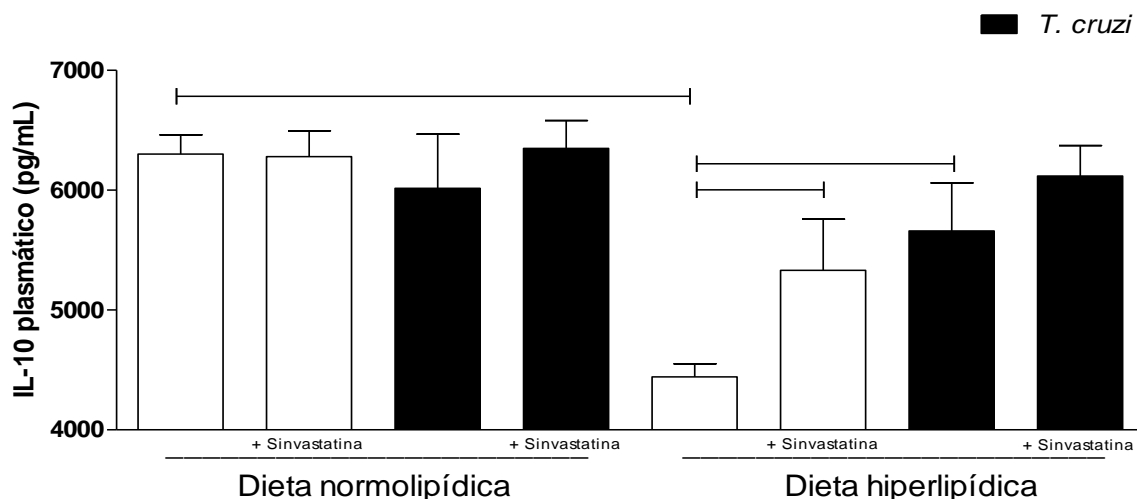


Figura 145. IL-10 plasmática. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas

A figura 16 apresenta a produção de leptina no experimento. Não foram evidenciados efeitos da dieta sobre a produção de leptina. Porém, a infecção reduziu a produção desse marcador no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. A sinvastatina aumentou os níveis de Leptina nos grupos infectados e submetidos à dieta hiperlipídica.

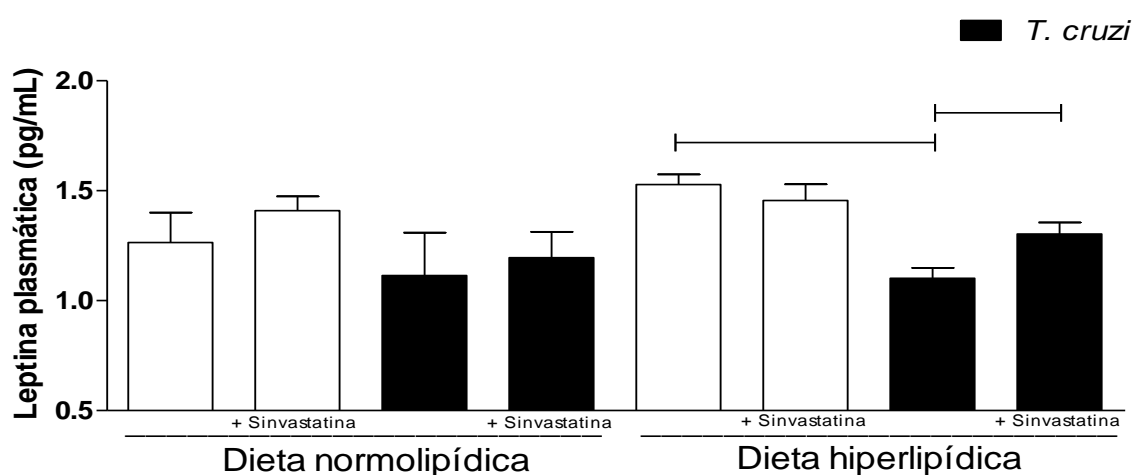


Figura 156. Leptina plasmática. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas

4.10. Dosagens de IFN- γ , IL-10 e TNF no tecido cardíaco.

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos realizados no tecido cardíaco dos camundongos para verificação dos níveis de IFN- γ , TNF e IL-10. As concentrações de IFN- γ no sobrenadante cardíaco são mostradas na figura 17. Não foram evidenciadas diferenças estatísticas da produção da citocina influenciada pela dieta, infecção pelo *T. cruzi* ou sinvastatina.

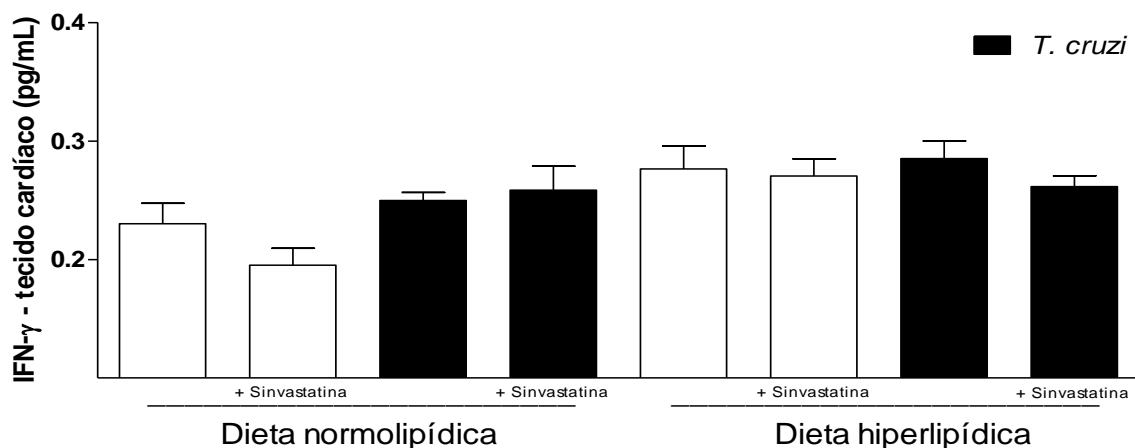


Figura 167. IFN- γ tecido cardíaco. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A produção de TNF no tecido cardíaco é mostrada na figura 18. A dieta foi determinante na produção da citocina, assim como a infecção. A sinvastatina não atuou reduzindo a produção da citocina.

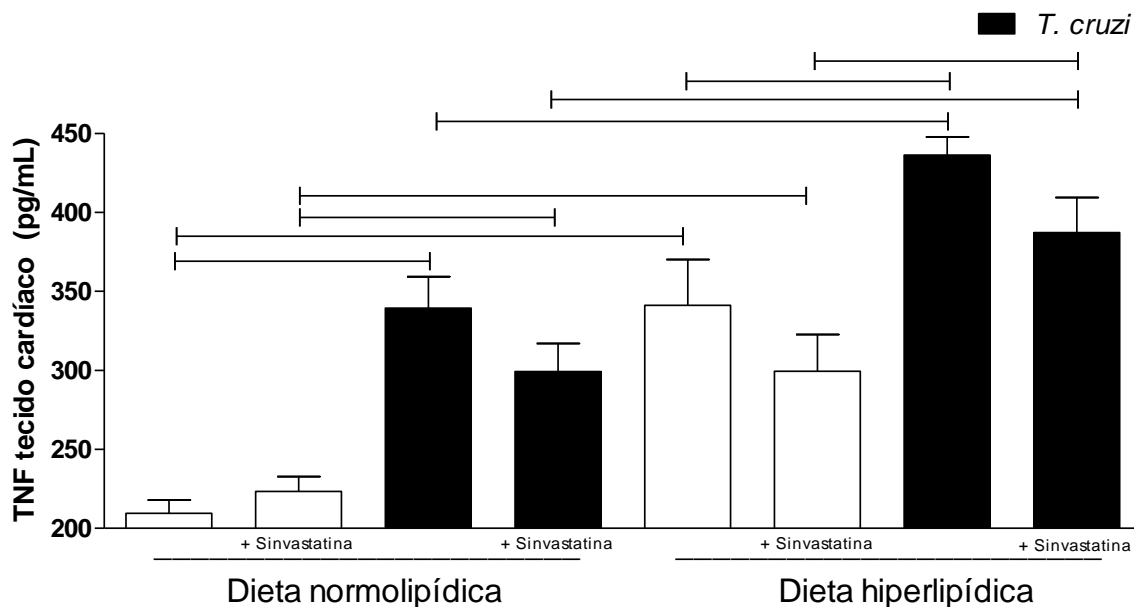


Figura 17. TNF tecido cardíaco. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A dosagem de IL-10 no tecido cardíaco é mostrada na figura 19. Houve menor produção da citocina em animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparado ao controle normolipídico. A dieta hiperlipídica e infecção contribuíram para a baixa produção desta citocina. A Sinvastatina não apresentou ação sobre essa citocina.

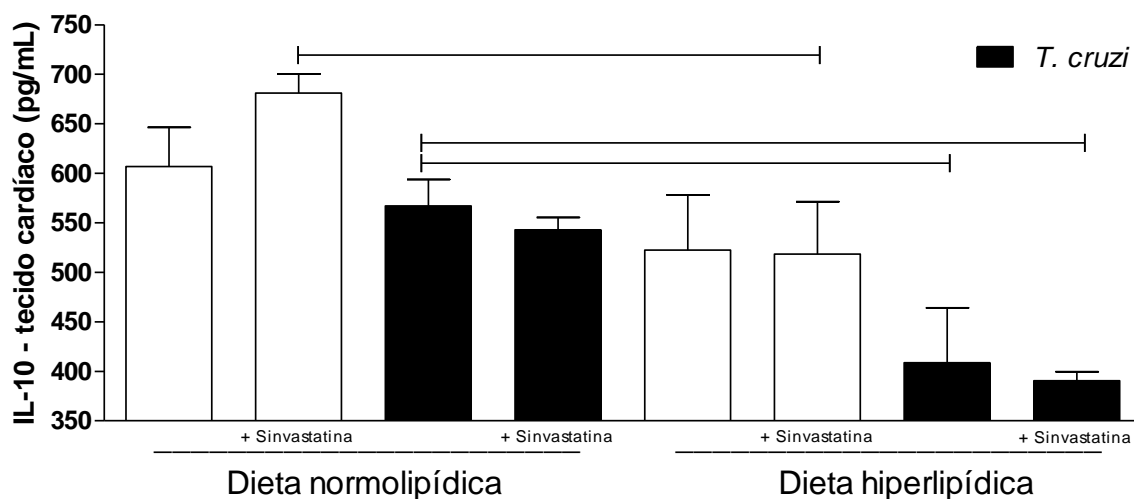


Figura 19. Dosagem de IL-10 no tecido cardíaco. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média +/- SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

4.11. Dosagens de IFN- γ , IL-10 e TNF no tecido adiposo.

Os ensaios imunoenzimáticos realizados no tecido adiposo dos camundongos avaliaram os níveis de IFN- γ , TNF e IL-10. A dosagem de IFN- γ (figura 2) foi maior nos animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparado ao controle normolipídico.

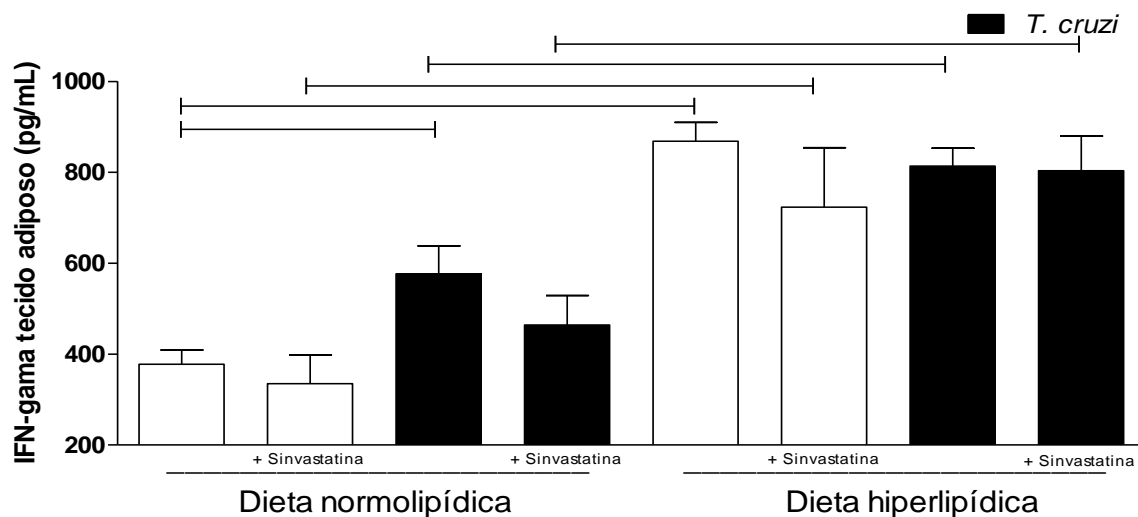


Figura 18. Dosagem de IFN- γ tecido adiposo. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

A figura 21 apresenta os resultados da dosagem de TNF em sobrenadante de tecido adiposo. Os animais não infectados submetidos à DH tiveram maior produção da citocina quando comparado ao controle normolipídico. A infecção também aumentou níveis desta citocina

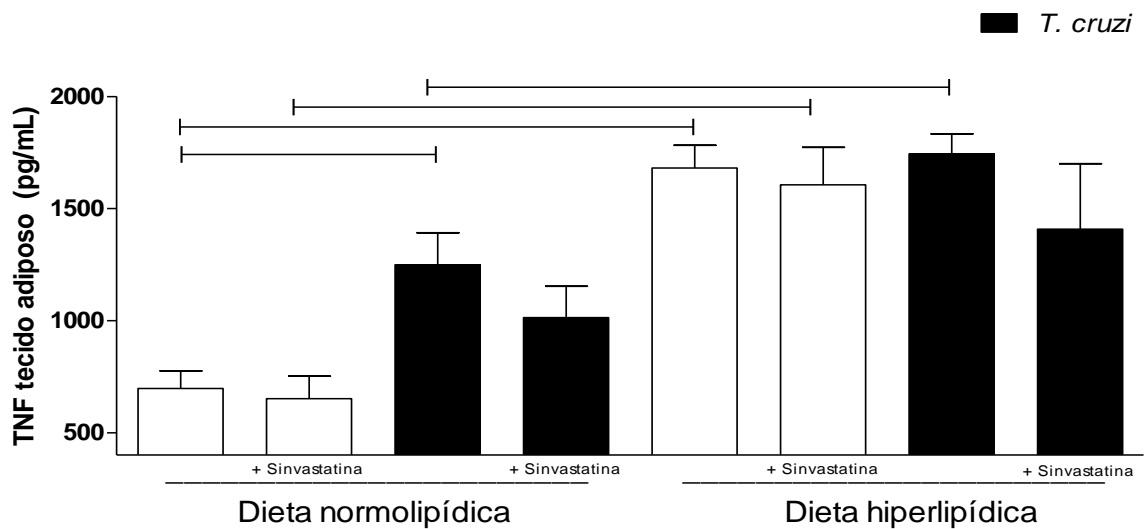


Figura 19. Dosagem de TNF tecido adiposo. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

No tecido adiposo, a produção de IL-10 (figura 22) também foi menor entre os animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparado ao controle normolipídico.

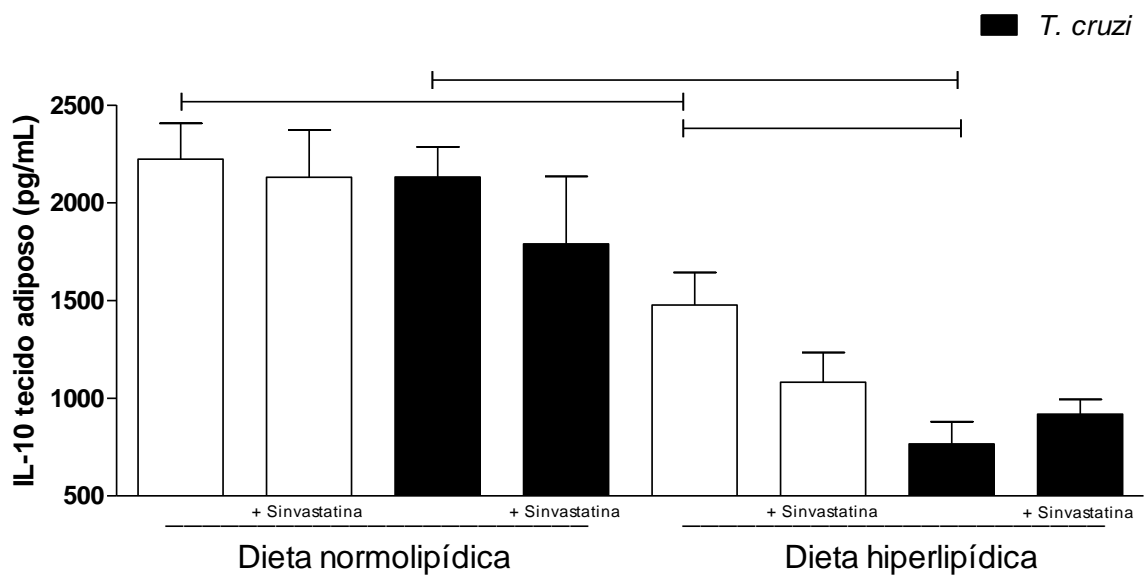


Figura 202. Dosagem de IL-10 tecido adiposo. Barras brancas significam animais não infectados e barras pretas significam animais infectados pelo *T. cruzi*. Dados apresentados como média \pm SEM e analisados pelo *TESTE T DE STUDENT*, sendo significativo o $p < 0.05$. Foram encontrados resultados significativos entre os grupos unidos pelas linhas.

5. Discussão

Na última década, atenção especial tem sido dada à relação entre a infecção pelo *T. cruzi* e o metabolismo de lipídios do hospedeiro mamífero (Machado et al., 2011; Tanowitz et al., 2011; Novaes et al., 2012; Nagajyothi et al., 2014). Nesta mesma linha de investigação, o presente estudo reforçou a importância da qualidade das dietas (neste caso, da dieta hiperlipídica) na infecção experimental pelo *T. cruzi* e sob a interferência da terapia diária com Sinvastatina.

A Sinvastatina é amplamente utilizada no tratamento de hiperlipidemias por possuir efeito protetor ao sistema cardiovascular uma vez que atua diretamente no impedimento da formação do colesterol pela via do mevalonato (Spósito et al., 2011; Vaughan, 2010). Nosso grupo tem investigado suas ações no processo inflamatório utilizando dose de 20mg/kg/dia comumente utilizada no tratamento das dislipidemias. A saber, Silva e colaboradores (2012) demonstraram que a Sinvastatina era capaz de modular os níveis sistêmicos e cardíacos de CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES em camundongos isogênicos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Esta estratégia terapêutica também reduziu os níveis circulantes dos parasitos no sangue e nos tecidos (formas amastigotas), diminuiu os mediadores inflamatórios solúveis (TNF e IFN- γ) e também a infiltração de leucócitos no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Avançando-se na complexidade do modelo animal, avaliou-se também essas propriedades cardioprotetoras e anti-inflamatórias das baixas doses de Sinvastatina em cães infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (Melo et al. 2011). Neste estudo, observou-se melhoria na progressão do quadro de cardiopatia destes animais, além da modulação da resposta imune do hospedeiro durante as etapas iniciais da infecção.

A associação da obesidade com a infecção pelo *T. cruzi* tem despertado interesse na comunidade científica pelo viés inflamatório. Muitos desses efeitos independentes de colesterol refletem a habilidade das estatinas em afetar processos anti-inflamatórios (redução da ativação do fator de transcrição nuclear κ B, modulação do óxido nítrico, citocinas inflamatórias e endotelina-1, assim como o bloqueio da síntese de importantes intermediários isoprenóides) (Cheng et al., 2005; Brown et al., 2008; Robinson, 2008). Em tripanosomatídeos a importância dos isoprenóides para a viabilidade celular e proliferação já foi demonstrada e a combinação de inibidores que atuam em diferentes pontos da via mostram ser úteis contra o *T. cruzi* (Concepcion, 1998). No presente estudo com dieta hiperlipídica associada ao *T. cruzi*, a Sinvastatina apresentou propriedade anti-inflamatória capaz de reduzir a produção de CCL2, além de reduzir a quantidade de lipídeos totais no fígado e colesterol total. Além disso, o uso diário de Sinvastatina mostrou-se eficaz no controle das formas

tripomastigotas circulantes no sangue, possivelmente por diminuir a concentração de colesterol LDL circulante, lipoproteína utilizada como facilitador no processo de internalização do parasito no citoplasma de células de mamíferos (Miao & Ndao, 2014). É sabido, ainda, que a interação do *T. cruzi* com o receptor de LDL leva ao acúmulo de colesterol LDL nos tecidos do hospedeiro, tanto na fase crônica quanto na fase aguda da infecção (Johndrow et al., 2014).

Apesar do crescimento dos estudos nas áreas de obesidade e infecção pelo *T. cruzi*, pouco se sabe sobre a relação do metabolismo de lipídios na infecção por este parasito. A dieta representa um papel importante na regulação dos níveis de lipídios no corpo, incluindo a adipogênese e a lipogênese (Houseknecht, 2003). A concentração de lipídeos da dieta pode ser determinante nos níveis do colesterol total e triglicerídeos do corpo. Fraulob e colaboradores (2010) demonstraram a predisposição genética dos camundongos C57BL/6 em acumular tecido adiposo e desenvolver a obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia e esteatose hepática quando submetidos à dieta rica em gordura saturada. Além disso, a fonte de lipídeos ingeridos é mais importante para a lipogênese e adipogênese do que a quantidade de lipídeos propriamente ingerida (Catta-Preta, 2012). Nagajyothi (2014) demonstrou que uma dieta com 17% de gordura pode induzir uma redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos em animais CD-1 infectados pela cepa Brasil do *T. cruzi* enquanto animais alimentados com uma dieta rica em gordura (60% lipídeos) são capazes de elevar os valores de LDL circulantes. Em nosso estudo com animais C57BL/6 infectados pela cepa VL-10 do *T. cruzi* e alimentados com uma dieta com 60% de lipídeos, os níveis de colesterol e triglicerídeos não foram aumentados em relação ao grupo submetido à dieta normolipídica, provavelmente pelo pouco tempo de exposição à dieta.

Também no atual estudo com dieta hiperlipídica, os animais apresentaram um consumo de ração igual entre os grupos, assim como peso corporal semelhante. No nosso estudo, quando comparamos a produção dos marcadores inflamatórios entre os grupos com dieta normolipídica x dieta hiperlipídica, observamos que a segunda foi determinante para uma maior quantidade de TNF e CCL2 no plasma e uma relação inversa sobre a citocina regulatória IL-10. Além disso, a dieta hiperlipídica também esteve intimamente relacionada aos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL, além dos valores de lipídeos totais no fígado. Quando associada à infecção pelo *T. cruzi*, a dieta hiperlipídica mostrou-se capaz de intensificar a produção de marcadores inflamatórios no plasma dos animais, além de elevar as concentrações de glicose e insulina nos testes de dosagem de resistência. Segundo Nagajyothi e colaboradores (2014), as células inflamatórias utilizam a glicose como fonte primária de

energia e, assim, o aumento da captação de glicose e altos índices de glicólise são características de infiltração de células inflamatórias para os tecidos.

Outra alteração observada, possivelmente influenciada pela composição da dieta foi a quantidade de parasitos circulantes. A dieta hiperlipídica parece ter contribuído para o aumento da parasitemia em concordância com os dados de Nagajyothi e colaboradores (2014), cujo trabalho sugere que o tecido adiposo participa do sequestro de parasitos da circulação, onde as formas tripomastigotas teriam preferência pelo tecido adiposo e não pelo coração. Tal hipótese já havia sido descrita por Beleigoli e colaboradores (2013) e chamada de “Hipótese do paradoxo da obesidade”, como um estado de proteção do tecido adiposo ao tecido cardíaco, levando a um aumento da sobrevida de pacientes devido a uma redução nas lesões cardíacas causadas pelo parasito. Infelizmente, no presente estudo, não avaliamos os danos teciduais causados pelo *T. cruzi* para confrontar tal hipótese. Por outro lado, avaliamos a produção de citocinas inflamatórias no tecido cardíaco. Nossos resultados demonstraram moderada produção de IFN- γ no tecido cardíaco, mas no tecido adiposo foram encontrados valores elevados dessa produção nos animais alimentados com dieta hiperlipídica do que nos alimentados com dieta normolipídica. Da mesma forma, observamos que a produção de TNF, no tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica mostrou-se elevada em relação aos animais submetidos à dieta normolipídica. Em paralelo a este processo inflamatório associado à dieta normolipídica, houve elevada produção da citocina IL-10 como tentativa de regulação do processo inflamatório.

No contexto inflamatório da dieta hiperlipídica associada à infecção pelo *T. cruzi*, a leptina surge como uma citocina denominada como “hormônio da obesidade”. A leptina encontra-se envolvida na regulação de outras citocinas como o aumento da produção de IFN- γ , TNF e CCL2 (Procacciini et al., 2011). No atual estudo com dieta hiperlipídica em camundongos infectados pela cepa VL-10 do *T. cruzi*, não houve diferença quanto a produção de leptina entre os grupos avaliados. De forma interessante, os níveis das citocinas TNF, IFN- γ e CCL2 não estão necessariamente relacionados aos níveis de leptina, fato que pode ter relação com os níveis de insulina, uma vez que o quadro de resistência insulínica favorece à redução dos valores de leptina circulantes (Hermsdorff et al., 2006).

Finalmente, as análises diretas no tecido adiposo apontaram para maior quantidade de citocinas inflamatórias associadas à dieta hiperlipídica. Além disso, os efeitos pleiotrópicos da Sinvastatina sob o sistema imune mostraram-se controlar parcialmente a replicação do *T. cruzi* gerando, de forma secundária, proteção ao sistema cardiovascular do hospedeiro.

6. Conclusão

A dieta hiperlipídica pode favorecer a maior produção de marcadores inflamatórios em camundongos C57BL6 infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* e, a sinvastatina pode atuar como fator protetor ao sistema cardiovascular, uma vez que reduz os níveis de lipoproteínas de baixa densidade e reduz a replicação de parasitos durante a fase aguda da infecção.

7. Referências

- ANDRADE, DV, KENNETH JG, WALDEREZ, OD. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8(7): e3010, jul, 2014.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World journal of experimental medicine*. 20; 3(1): 1–10, feb, 2013.
- BELEIGOLI, AM. 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*. 20; 166(2): 523-6. jun, 2013.
- BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 6ª edição, Brasília, Brasil, 2009, 816 páginas.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista Internacional de Medicina Tropical*. Sao Paulo, 4:389-96, nov-dec, 1962.
- BRENER, Z, GAZZINELLI, RT. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, 10; 9 (2): e0003464, feb, 1997.
- BRENER, Z, ALVARENGA, NJ. Life cycle of *T. cruzi* in the vector. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research: Proceedings of an International Symposium*, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 18-21 March 1975. No. 318. Pan American Health Organization, 1976.
- BROWN, MS., GOLDSTEIN, JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl: S15-27, apr, 2009.
- CAMPO, VL, CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química nova*, Vol. 30, No. 2, 425-430, 2007.
- CATTA-PRETA, M. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition*, 28 (2): 212-9, feb, 2012.
- CHENG, X. Effects of Atorvastatin on Th polarization in patients with acute myocardial infarction. *European journal of heart failure*, 7(7):1099-104, dec, 2005.
- CONCEPCION, JL, GONZALEZ-PACANOWSKA, D, URBINA, JA. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: Subcellular Localization and Kinetic Properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1;352(1):114-20, apr, 1998.
- COURA, JR, BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115(1-2):5-13, jul-aug 2010.
- COURA, JR. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 30;102 Suppl 1:113-22, oct 2007.

COURA, JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3):277-82, may, 2015.

CUNHA-NETO, E. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1:252-8, jul, 2009.

DA SILVA, JB. Papel das citocinas e quimiocinas na resposta imunológica murina na infecção por *Leptospira interrogans sorovar*. (Biotecnologia) 2012. 95 folhas. Tese – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

DIAS, JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(2):81-87, 2006.

DIAS, JVL. Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em municípios pertencentes à Gerência Regional de Saúde de Diamantina. 2010. 100 páginas. Dissertação. Centro de Pesquisas René Rachou, 2010.

FANTUZZI, G, FAGGIONI, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(4):437-46, oct, 2000.

FERREIRA GA, SATO EI. Efeitos pleitrópicos das estatinas. Disponível em: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3413. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

FOLCH, JML, SLOANE-STANLEY, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1):497-509, may, 1957.

FRAULOB, JC. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46(3):212-23, may, 2010.

FRIEDEWALD, WT, LEVY, IR, FREDRICKSON, DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6):499-502, jun, 1972.

FUKUDA, K. Statins meditate anti-atherosclerotic action in smooth muscle cells by peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 30;457(1):23-30, jan, 2015.

FURTADO, J. Avaliação da associação entre níveis de omentina sérica e doença arterial coronariana em pacientes com síndrome metabólica. 2013. Dissertação de Mestrado. Clínica Médica – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

HEMMIGE, V, TANOWITZ, H, SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. *International Journal of Dermatology*, 51(5):501-8, may, 2012.

HOUSEKNECHT, KL, SPURLOCK, ME. Leptin regulation of lipid homeostasis: dietary and metabolic implications. *Nutrition Research Reviews*, 16(1):83-96, jun, 2003.

HOVSEPIAN, E, PENAS, F, SIFFO, S, MIRKIN, GA, GOREN, NB. IL-10 Inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes. PLoS ONE, 18;8(11): e79445, nov, 2013.

JOHNDROW, C. *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. Microbes and Infection, 16(4):337-44, apr, 2014.

KARLSSON, EA, SHERIDAN, PA, BECK, MA. Diet-induced obesity in mice reduces the maintenance of influenza-specific CD8⁺ memory T cells. The Journal of Nutrition, 140(9):1691-7, sep, 2010.

LOPES, HF. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. Revista Brasileira de Hipertensão, vol14(4): 239-244, apr, 2007.

MACHADO, FS. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. Advances in Parasitology, 76:1-31, 2011.

MACHADO, FS. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. Frontiers in Bioscience (Elite edition), 1;4:1743-58, jan, 2012.

MANCINI, GBJ. Reduction of morbidity and mortality by statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Journal of the American College of Cardiology, 47, 12, 2554-2560, jun, 2006.

MELO, L; CALDAS, IS; AZEVEDO, MA; GONÇALVES, KR; TALVANI, A. Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 84(2):325-31, feb, 2011.

MIAO, Q, NDAO, M. *Trypanosoma cruzi* Infection and Host Lipid Metabolism. Mediators of Inflammation, vol 2014, 10 pages, 2014.

MILANSKI, M; DEGASPERI, G; COOPE, A; VELLOSO, LA. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. The Journal of Neuroscience, 14;29(2):359-70, jan, 2009.

NAGAJYOTHI, F; DESRUISSEAU, MS; WEISS, LM; TANOWITZ, HB. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1:219-25, jul, 2009.

NAGAJYOTHI, F; ZHAO, D; WEISS, LM; TANOWITZ, HB. High Fat Diet Modulates *Trypanosoma cruzi* Infection Associated Myocarditis. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2;8(10): e3118, oct, 2014.

NAGAJYOTHI, F; DESRUISSEAU, MS; THIRUVUR, N; TANOWITZ, HB. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. Obesity, 16(9):1992-7, sep, 2008.

NISSEN, SE. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *Jama*, 3;291(9):1071-80, mar, 2004.

NOVAES, RD; GOMÇALVES, RV; PENITENTE, AR; TALVANI, A; MALDONADO IRSC. *Trypanosoma cruzi* infection alters glucose metabolism at rest and during exercise without modifying the morphology of pancreatic islets in rats. *Pathology-Research and Practice*, 15;208(8):480-8, aug, 2012.

PAIVA, CN. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5):1239-46, nov, 2009.

PARK, S. Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Leprdb/Leprdb mice to infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 77(3):1008-14, mar, 2009.

PROCACCINI, C, JIRILLO, E, MATARESE, G. Leptin as an immunomodulator. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1):35-45, feb, 2012.

QUIST-PAULSEN, P. Statins and inflammation: an update. *Current opinion in Cardiology*, 25(4): 399-405, 2010.

ROBINSON, JG. Models for describing relations among the various statin drugs, low-density lipoprotein cholesterol lowering, pleiotropic effects, and cardiovascular risk. *The American Journal of Cardiology*, 1;101(7):1009-15, apr, 2008.

ROCHA, MOC, TEIXEIRA, MM, RIBEIRO, AL. An update on the management of Chagas Cardiomyopathy, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 5(4):727-43, aug, 2007.

ROGGERO, E. Neuroendocrine-immunology of Experimental Chagas' Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153:264-71, feb, 2009.

ROMAÑA, C, MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol 37, 1, 1942.

ROSENDO, AB. Farmacogenética e efeito antiinflamatório dos inibidores da HMG-CoA redutase. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, 51(4):520-5, jun, 2007.

ROSINI, TC, SILVA, ASR, MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58(3):383-387, 2012.

SANTANA, RA; MAGALHÃES, LKC; BARBOSA, MG. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*, 11;7:267, jun, 2014.

SANTOS, LN, SILVA, FV. Reações adversas às estatinas: mecanismo de ação e evidências clínicas. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9(1):79-86, 2010.

SILVA JCQ. Ação da sinvastatina na resposta inflamatória aguda após infarto agudo do miocárdio com supra desnivelamento do segmento st. Brasília: Universidade De Brasília-UNB; 2009.

SILVA, RR. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4):513-21, jun, 2012.

SOUZA-LIMA, RC. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4):510-4, jul-aug, 2013.

SPOSITO, AR, FILHO, GBA, AARÃO, AR. Estatinas en los Síndromes Coronarios Agudos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 97(4):350-356, 2011.

TALVANI, A; ROCHA, MO; BARCELOS, LS; GOMES, YM; RIBEIRO, AL; TEIXEIRA, MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases*, 38(7):943-50, mar, 2004.

TALVANI, A; TEIXEIRA, MM. Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. *Advances in Parasitology*, 76:171-94, 2011.

TALVANI, A; RIBEIRO, CS; ALIBERTI, J; GAZZINELLI, R. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, 2(8):851-66, jul, 2000.

TANOWITZ, H; JELICKS, LA; MACHADO, FS; ESPER, L; SCHERER, PE. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. *Advances in Parasitology*, 76, 235-250, 2011.

TEIXEIRA, MM, GAZZINELLI, RT, SILVA, JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*, 18(6), 262-265, jun, 2002.

TORRECILHAS, ACT. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1):29-39, jan, 2009.

TSATSANIS, CANM, KONTOYIANNIS, DP. Association between H1N1 infection severity and obesity—adiponectin as a potential etiologic factor. *Journal of Infectious Diseases*, 15;202(3):459-60, aug, 2010.

VAUGHAN, CJ, GOTTO, AM, BASSON, CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(1) 10 pag, jan, 2000.

VELLOSO, LA. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(2):151-8, mar, 2009.

VILLELA, MPC. Avaliação do efeito da sinvastatina sobre a homocisteína plasmática em mulheres obesas: modulação por variáveis clínicas e genética. 2013. 75 páginas. (Dissertação-Ciências da Saúde) Hospital Santa Casa de Misericórdia. Belo Horizonte, 2013.

WEIS, M. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation*, 12;105(6):739-45, feb, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N°340 Updated March 2013. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acessado em 09 de janeiro de 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. – Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS. 92 p.: il. (Serie de Manuais Técnicos, 12) 2009.

ZEYDA, M, THOMAS MS. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*, 55(4):379-86, apr, 2008.