



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

CAMILA MARIA DE ARRUDA

Impacto da Obesidade em Camundongos Balb/c machos infectados com *Trypanosoma cruzi* e sua relação com aspectos imunológicos e histopatológicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Doenças Tropicais

Orientador (a): Prof(a). Adjunto Paulo Câmara Marques Pereira

Botucatu
2019

Camila Maria de Arruda

Impacto da Obesidade em Camundongos Balb/c machos infectados com *Trypanosoma cruzi* e sua relação com aspectos imunológicos e histopatológicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Doenças Tropicais

Orientador (a): Prof(a). Adjunto Paulo Câmara Marques Pereira

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Arruda, Camila Maria de.

Impacto da obesidade em Camundongos Balb/c machos infectados com *Trypanosoma cruzi* e sua relação com aspectos imunológicos e histopatológicos / Camila Maria de Arruda. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Paulo Câmara Marques Pereira
Capes: 40101096

1. Citocinas. 2. Doença de Chagas. 3. Obesidade. 4. *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: Citocina IL6 e TNFα Doença de Chagas; Obesidade.

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma patologia infecciosa crônica que apresenta grande incidência no Brasil e, nos últimos anos, passou a ser endêmica em centros urbanos. É acompanhada por alterações no sistema imune com variações nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias. O tratamento disponível no Brasil é o benzonidazol, com baixa eficácia na fase crônica e efeitos colaterais importantes. Sabe-se que os adipocitos são reservatórios de *T. cruzi*, aspecto importante que é a relação com as citocinas pro-inflamatórias e com o aumento de *T. cruzi* nos adipocitos interferindo na evolução da doença. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da obesidade e das citocinas pro inflamatórias em camundongos balb/c machos infectados com *T. cruzi* tratados ou não com benzonidazol. Foram utilizados 120 animais, divididos em seis grupos, sendo 3 com dieta normal e 3 com dieta hipercalórica. Esses foram avaliados em cinco momentos: M1-1º dia, M2-3º dia, M3-5º dia, M4-7º dia e M5-8º dia. Para infecção utilizou a cepa aguda Y, com pico de parasitemia no sétimo dia (M4). A eutanásia foi realizada em cinco animais de cada grupo, em cada momento. Para determinação das citocinas utilizou o Kits de CBA – Cytometric Beads Array, através de citômetro de fluxo. Além disso, foi verificado o peso da gordura. O medicamento foi ofertado na dosagem de 100 mg/Kg/dia. A análise estatística foi realizada por medidas descritivas com o cálculo de média, desvio padrao, minimo, maximo e mediana, testes ANOVA, Tukey, Wald e Qui-quadrado. Dentre os resultados observa-se que houve aumento do peso relativo e de gordura corporal entre os consumiram dieta hipercalórica, classificando-os com obesidade. Além disso, pode-se verificar que as alterações metabólicas e inflamatórias estão mais elevadas nos grupos obesos, sendo eles infectados ou não, com ou sem tratamento. Portanto o estado nutricional tem uma grande influencia no processo infeccioso pelo *T. cruzi*. O presente estudo revelou que a obesidade desencadeia alterações inflamatórias detectadas pelas citocinas pro inflamatórias e metabólicas, e que a associação com o processo infeccioso agravou esse processo. O tratamento com benzonidazol contribuiu para uma resposta melhor com menos alterações metabólicas e inflamatórias

Palavras chave: Obesidade, Citocina IL6 e TNF α e Doença de Chagas

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is a chronic infectious disease that has a high incidence in Brazil and, in recent years, has become endemic in urban centers. It is accompanied by changes in the immune system with variations in serum levels of pro-inflammatory cytokines. The available treatment in Brazil is benznidazole, with low efficacy in the chronic phase and important side effects. It is known that the adipocytes are reservoirs of *T. cruzi*, an important aspect that is the relation with the pro-inflammatory cytokines and with the increase of *T. cruzi* in the adipocytes interfering in the evolution of the disease. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effects of obesity and proinflammatory cytokines in *T. cruzi* infected or non-treated male balb / c mice with benznidazole. A total of 120 animals were used, divided into six groups: 3 with normal diet and 3 with hypercaloric diet. These were evaluated in five moments: M1-1 day, M2-3 day, M3-5 day, M4-7 day and M5-8 day. For infection, the acute Y strain was used, with a peak of parasitemia on the seventh day (M4). Euthanasia was performed in five animals from each group, at each moment. In order to determine the cytokines, the CBA-Cytometric Beads Array Kits were used by flow cytometer. In addition, the fat weight was checked. The drug was offered in the dosage of 100 mg / kg / day. Statistical analysis was performed by descriptive measures with mean, standard deviation, minimum, maximum and median, ANOVA, Tukey, Wald and Chi-square tests. Among the results it was observed that there was an increase in relative weight and body fat among those consuming a hypercaloric diet, classifying them as obese. In addition, it can be verified that the metabolic and inflammatory alterations are higher in the obese groups, being they infected or not, with or without treatment. Therefore, the nutritional status has a great influence on the *T. cruzi* infectious process. The present study revealed that obesity triggers inflammatory changes detected by pro-inflammatory and metabolic cytokines, and that association with the infectious process aggravated this process. Benznidazole treatment contributed to a better response with fewer metabolic and inflammatory changes

Key words: Obesity, Cytokine IL6 and TNF α and Chagas disease

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1.....	1
Revisão de Literatura.....	2
Objetivos.....	9
Referências bibliograficas.....	10
CAPÍTULO 2.....	16
Artigo Científico 1.....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	18
Métodos.....	20
Resultados.....	24
Discussão.....	29
Conclusão.....	33
Referências.....	33
CAPÍTULO 3.....	37
Artigo Científico 2.....	38
Resumo.....	39
Introdução.....	39
Métodos.....	41
Resultados.....	46
Discussão.....	49
Conclusão.....	52
Referências.....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
Considerações finais.....	59

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

A Doença de Chagas (DC) é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública da América Latina¹. Recentes evidências indicam que a doença migrou para regiões não endêmicas que representam uma ameaça social significativa, e atinge em sua maior parte a população com baixo nível socioeconômico².

Essa patologia representa uma condição infecciosa (fase aguda ou crônica) classificada como enfermidade negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS).^{2,3} A DC apresenta elevada carga de morbimortalidade em países endêmicos, incluindo o Brasil, com expressão focal em diferentes contextos epidemiológicos.^{4,5,6}

A OMS estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina.⁷ Estimativas recentes para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2010, indicavam 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da Iniciativa dos Países do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458), seguidos da Bolívia (607.186).⁸

Na Tabela 1 apresentada pelo Consenso Brasileiro de Chagas 2015⁹ é possível verificar mudanças em parâmetros epidemiológicos específicos para a América Latina em anos recentes.^{8,10}

Tabela 1 – Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010

Parâmetros – estimativas	1990	2000	2006	2010
Número de mortes/ano	>45.000	21.000	12.500	12.000
Número de pessoas infectadas	30.000.000	18.000.000	15.000.000	5.742.167
Casos novos/ano – transmissão vetorial	700.000	200.000	41.200	29.925
População total sob risco	100.000.000	40.000.000	28.000.000	70.199.360

Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 2006¹⁷ (TDR/WHO, PAHO, WHO); de World Health Organization, 2015.³

A DC foi descoberta em abril de 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, responsável pela identificação do agente etiológico e, posteriormente, pela determinação das manifestações clínicas, epidemiológicas, do ciclo de vida dos vetores, dos reservatórios silvestres e dos hospedeiros humanos^{4,11}. A doença parasitária causada pelo protozoário *T. cruzi*, são transmitidas por diferentes vias: através das fezes de

triatomíneos de insetos infectados, transfusão de sangue, oral (alimentos contaminados), a transmissão vertical e transplantes. Aproximadamente 60% dos pacientes na fase crônica são clinicamente assintomáticos, cerca de 30% manifesta cardiomiopatia, 8% síndromes megaviscerais e 2% apresentam tanto cardiomiopatia e envolvimento digestivo^{11,12,13,14}.

O parasita apresenta dois estágios no hospedeiro, o amastigota, forma replicante intracelular, e o tripomastigota extracelular, a forma infecciosa. É por isso que o controle da infecção requer uma forte resposta imune humoral e celular; e o resultado da interação parasito-hospedeiro nas fases iniciais da infecção é extremamente importante¹⁵. A doença apresenta diferentes fases clínicas e imunológicas: o período agudo é caracterizado pela presença das tripomastigotas na corrente sanguínea, associada com fenômenos imunossupressores¹⁵, o que é assintomática em 95% dos casos¹⁶ e remete de forma espontânea, para entrar em uma fase indeterminada após 3 ou 4 meses, que pode durar o resto da vida do hospedeiro, sem sinais clínicos.

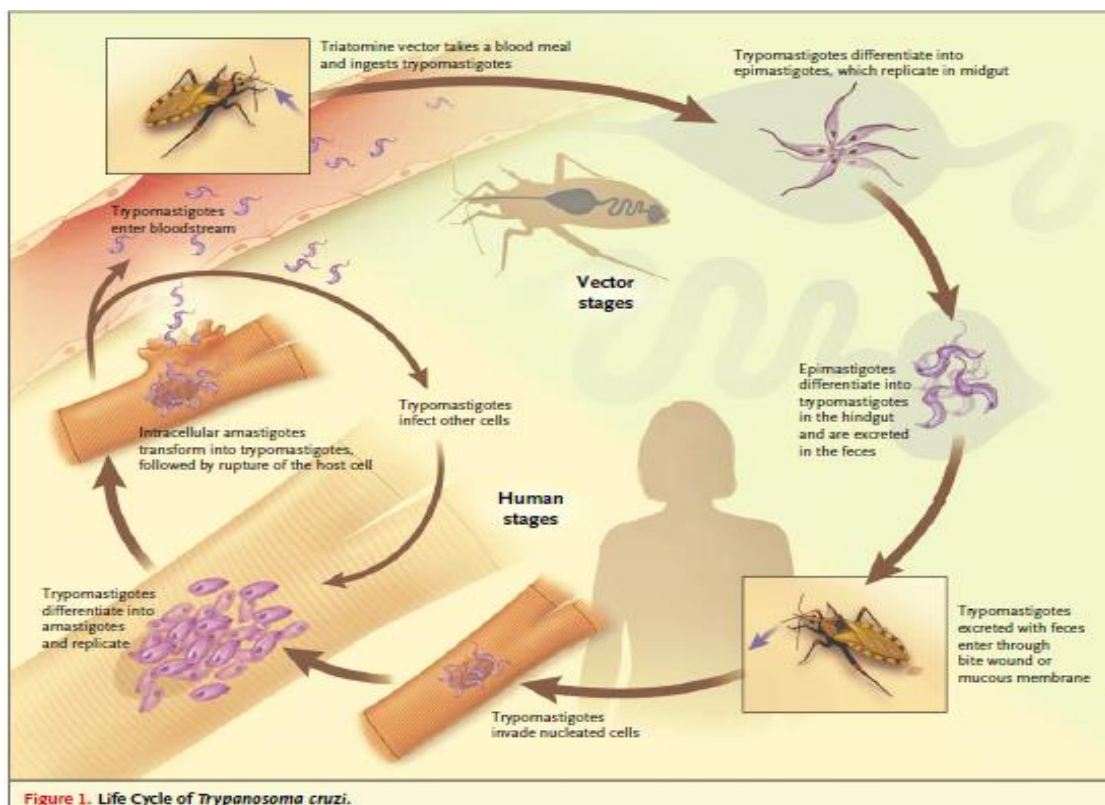


Figura 1 – O Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Bern, 2011)¹⁷

A fase intermediária é caracterizada por baixa parasitemia e sorologia positiva e, nos últimos anos, cerca de 30% de pessoas infectadas desenvolvem algum grau de doença cardíaca ou digestiva, nesse período crônico da infecção. Atualmente também tem sido observado a presença do parasita na célula adiposa de indivíduos obesos, que é uma grande prevalência entre os pacientes com DC ¹⁵.

Apesar de ser uma Doença descoberta a mais de um século, não existe um tratamento medicamentoso seguro para essa patologia, até o momento a única droga disponível e utilizada no Brasil é o benzonidazol, recomendada pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. ^{18,19,20}.

A via de absorção é rápida, sendo através da via gástrica, sendo absorvida em até 2 a 4h, tendo meia vida de eliminação de até 12h em seres humanos, e autores como Docampo (1984) ²¹ e Cançado (2000) ²², citam que a medicação inibi a respiração do *T. cruzi*, inibindo seu crescimento. O medicamento possui efeitos colaterais importantes, como as dermatites por hipersensibilidade, polineurite e depressão da medula óssea ^{23,24}. Portanto Coura e Castro (2002)²⁵ citam que o benzonidazol reduz a gravidade clínica e congênita da fase aguda, sendo esse composto atingindo 60% de cura em média, tendo baixa ação na fase crônica

Atualmente, apesar dos esforços no seu controle a DC continua sendo importante problema de saúde pública, com muitos aspectos a serem esclarecidos, dentre eles, a relação entre nutrição, infecção e imunidade. A Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB / Unesp), no Brasil, tem um ambulatório especializado no atendimento de pacientes com doença, no qual 400 pacientes têm sido periodicamente acompanhados ²⁶. A forma indeterminada da doença é predominante com idade acima de 50 anos, e nessa faixa etária idade os riscos do desenvolvimento de dislipidemia, obesidade e doença cardiovasculares são grandes e a presença da doença de chagas pode ser um agravante.

Corroborando, verifica-se que o Brasil tem experimentado grandes mudanças econômicas e sociais tais como, o grande êxodo rural, por exemplo, que afetou o estilo de vida da população, reduziu a frequência e intensidade de atividades físicas e aumento do consumo de produtos industrializados com alto nível de gordura e açúcar. Esse estilo

de vida predisõe a obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia, e como consequência, aumento da prevalência de síndrome metabólica. Nesse sentido, Navarro et al 2013 ²⁷ estudaram as consequências das alterações no estilo de vida observadas por mudanças nas medidas antropométricas dos indivíduos com DC, dos quais 70% tinham sobrepeso / obesidade, bem como aumento da circunferência da cintura e percentual de massa gorda mais de 30%. Outras conclusões importantes deste estudo foram as mudanças no perfil de lipídios, que estão associados com o aumento do tecido adiposo visceral ²⁸. Em estudo anterior realizado por Geraix et al, 2007, verificou-se a presença de citocinas, pró-inflamatórias e várias mudanças bioquímicas nesses pacientes tornando-os predispostos a desenvolver síndrome metabólica ¹⁶.

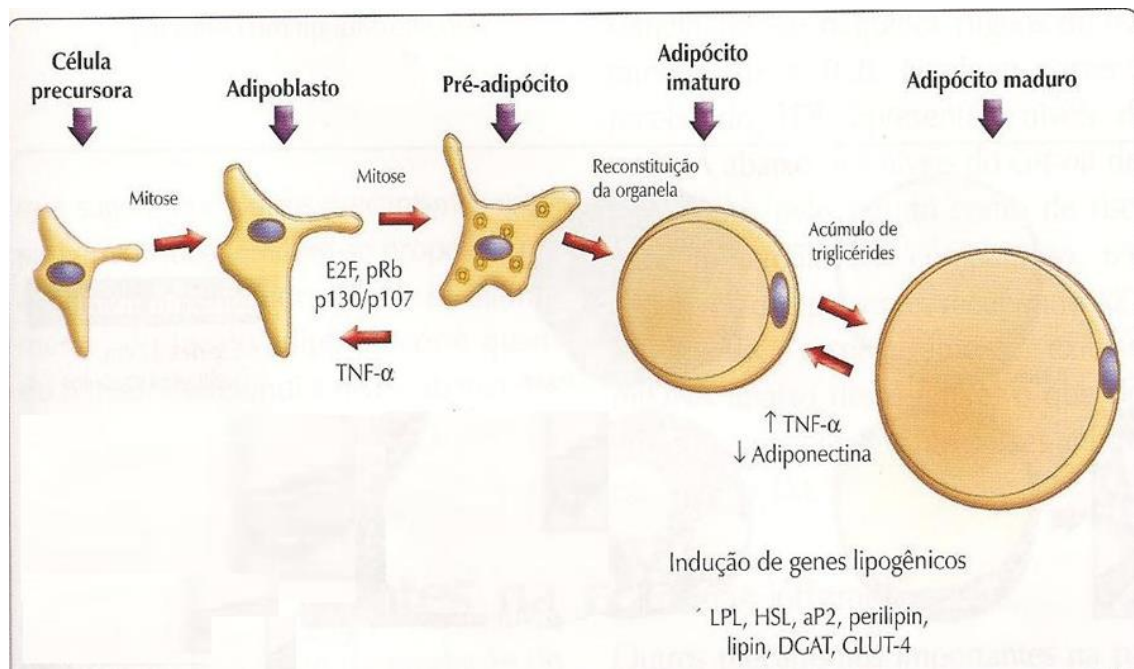


Figura 2. Características básicas da diferenciação do adipócito da célula precursora até o adipócito maduro e seus fatores de regulação. (Wierzbicki,2008) ²⁹

Nesse sentido nota-se que o tecido adiposo não é apenas um reservatório de energia, mas também um órgão endócrino responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, mostrando que a obesidade contribui para esse estado inflamatório e um consequente aumento susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina e eventos trombóticos ²⁹.

O aumento da gordura corporal é um risco importante para indivíduos com DC, pois podem causar maior inflamação e colaborar para o aparecimento de doenças metabólicas e cardiovasculares, sendo possível verificar em alguns estudos que mostram principalmente na fase indeterminada.^{30,31,32} O tecido adiposo é considerado um reservatório de *T. cruzi*, e, responsável pelo aumento da carga parasitária, macrófagos e desequilíbrio na regulação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias levando ao aumento do risco de danos aos tecidos^{33,34,35}. Shoemaker et al^{36,37} e Andrade e Silva³⁸ os observaram nos adipócitos e, analisaram as consequências sobre a patogênese da infecção em rato, e identificaram que o tecido adiposo e os adipócitos são facilmente invadidos por, e que os parasitas persistem no tecido muito tempo após a redução da fase aguda^{39,40}. Em outro estudo com camundongos foi avaliada a resposta do tecido adiposo a infecção por *T. cruzi* e observado que havia evidência de infecção, revelando aumento da expressão inflamatória de mediadores e redução de triglicérides. Recentes descrições das ações do parasita no tecido adiposo e associação inflamatória ainda estão sendo estudadas no sentido de entender a possível relação entre a gordura corporal e índices de doenças cardíacas.^{41,42}

Os adipócitos são células do sistema endócrino ativa que desempenham um papel importante na homeostase da energia e o sistema imune⁴³. Fatores hormonais, mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, e componentes da matriz extracelular também são conhecidos como adipocinas. O forte potencial pró-inflamatório do tecido adiposo sugere um papel importante na resposta imune inata sistêmica⁴³. Dentre as citocinas e adipocitocinas produzidas pelo tecido adiposo, temos a adiponectina, leptina, TNF- α , IL-6, IL-1, sendo algumas também produzidas durante a infecção chagásica, tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , que são responsáveis por uma série de alterações metabólicas como regulação do ritmo metabólico, da resposta imune e da composição corporal, afetando direta e indiretamente o metabolismo^{44,45,46}. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune antigênicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células⁴⁷. A resposta inflamatória da fase aguda é estabelecida nos primeiros dias de infecção, sendo caracterizada por reação não específica do hospedeiro ao agente agressor, que ocorre inicialmente no local, depois, torna-se sistêmica⁴⁸

Estudos experimentais realizados em camundongos com infecção chagásica têm sido fundamentais para determinar o papel dessas citocinas e dos vários tipos celulares, mediadores e protetores contra a infecção aguda.⁴⁹ Dentre as cepas selecionadas para estudo experimental, a cepa Y foi isolada por Pereira (1950), e estudada por Silva e Nussenzweig 1953, as quais apresentam tripomastigotas delgadas, alta virulência e patogenicidade para camundongos, sendo uma cepa de referência para a literatura

As citocinas são mediadoras de uma grande variedade de reações biológicas, algumas essenciais para a resposta metabólica, hemodinâmica, imunológica e reparadora do organismo ao trauma. A complexa interação entre as citocinas, o sistema neuroendócrino clássico e os vários outros fatores humorais secundários estimulam a resposta inflamatória que visa, em última instância, à preservação da vida⁵⁰

A IL-1 tem influência de maneira sinérgica em muitos efeitos do TNF- α , que induz à síntese de IL-1 pelas células endoteliais e pelos monócitos. Por sua vez, a IL-1 aumenta os efeitos do TNF- α , por meio de um provável feedback de auto-regulação. Ambas citocinas influenciam importantes funções imunológicas, como estimulação de interleucina-2 (IL-2) e interleucina-8 (IL-8), amplificação da proliferação de tímócitos ao estímulo antigênico e aumento da proliferação e da resposta de células B. A IL-6, produzida pelos linfócitos, estimula, junto com a IL-2 várias funções dos linfócitos T e B, assim como a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos além de colaborar para alterações metabólicas e o desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares⁵⁰

O TNF- α que é produzido pelos monócitos e macrófagos inibe a atividade da lipase lipoprotéica, e desencadeia liberação de outras citocinas como IL-1 e IL-2⁵⁰. Destaca-se também a importância do TNF- α no controle da parasitemia durante a doença aguda.⁵¹ No entanto, existem poucas informações sobre o papel do TNF- α em parâmetros relacionados à inflamação ou dor durante a DC na fase aguda.

Vários estudos em modelos experimentais e em humanos têm relatado o papel de citocinas como o TNF- α na regulação da resposta imunológica na fase aguda da DC, além de colaborar para o aparecimento das alterações metabólicas e diminuição da adiponectina⁵². Em relação aos níveis de adiponectina, são produzidas exclusivamente

pelos adipócitos e podem sofrer diminuição por conta do aumento do TNF- α , leptina e IL-6, elas também podem reduzir significativamente durante Infecção pelo *T. cruzi* de várias cepas. A redução dos níveis de adiponectina são normalmente associados com a resistência à insulina, hiperglicemia e obesidade^{53,54}.

Em estudo de Combs 2005³⁰, os marcadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas foram encontrados elevados no tecido adiposo de camundongos infectados com *T. cruzi*, os quais persistiram na fase crônica. A participação dessas citocinas tem sido observada tanto no processo inflamatório agudo quanto no crônico.⁵⁵ Com base nessas considerações, é de suma importância avaliar a obesidade em camundongos Balb/c machos infectados com *T. Cruzi* e a mesma tem relação com as alterações imunológicas e histopatológicas

Título Tese: Impacto da Obesidade em Camundongos Balb/c machos infectados com *Trypanosoma cruzi* e sua relação com aspectos imunológicos e histopatológicos

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da obesidade e das citocinas pro-inflamatórias em camundongos Balb/c machos infectados com *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com benzonidazol.

2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar os efeitos da obesidade com a resposta imune adaptativa mediada por TNF- α e IL-6 através da realização de dosagem dessas citocinas nos diferentes momentos do estudo;
- Identificar os níveis de colesterol, triglicérides, ácido úrico, glicemia nos diferentes grupos e momentos;
- Realizar análise histopatológica do coração e fígado para identificar adipócitos, a presença de parasitas e as respectivas relações com a obesidade no estado infeccioso dos camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26: 275–291.
2. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115: 14–21.
3. WHO (2007) World Health Organization Global health atlas. Available: <http://www.who.int/globalatlas/> Accessed 2008 Mar 2.
4. Ministério da Saúde (Brasil). Portal da Saúde - Doença de Chagas. 2011. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/> >. Acesso em: 15/07/2011
5. World Health Organization. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012. (WHO Technical Report Series, 975).
6. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.
7. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
8. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015 Feb;90(6):33-44.
9. João Carlos Pinto Dias e colaboradores. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015 *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 25(núm. esp.): 7-86, 2016
10. Pan American Health Organization. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Washington: Pan American Health Organization; 2006.

11. Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology* 18: 171–176.
12. Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MAS, et al. (2011) Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development Trypanosoma cruzi Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e976.
13. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ (2004) Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 1–12.
14. Pissetti CW, Correia D, Braga T, Faria GEL, Oliveira RFd, et al. (2009) Associacao entre os niveis plasmaticos de TNF-a, IFN-c, IL-10, Oxido nitrico e os isotipos de IgG especificos nas formas clinicas da doenca de Chagas cronica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 425–430.
15. Kierszenbaum F, Moretti E, Sztejn MB. Molecular basis of Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules which regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. *Biol Res* 1993; 26: 197-207 [PMID: 767 0532]
16. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 Suppl 1: 113-122 [PMID: 17992371 DOI: 10.1590/S0074-0276 2007000900018]
17. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2011; 364: 2527-34.
18. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. 2002; 97(1):3-24.
19. De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. *Lancet*. 1996; 348(9039):1407-13.
20. Rassi A. Etiological treatment of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*.1982; 38(4):277-81.

21. Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis* 6: 223-238, 1984.
22. Cançado, J.R. - Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In: Brener, Z.; Andadre, Z.A. & Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p. 389-405.
23. Pereira PCM, Meira DA. Nutrição e Infecção. In: INTERLIVROS (Ed.). Clínica de Doenças Tropicais e Infeciosas. Rio de Janeiro. 1991, p.29-32.
24. Pontes VMO, de Souza AS Jr, Cruz FMT, et al. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceara. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(2):182-7.
25. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.
26. Geraix J, Ardisson LP, Marcondes-Machado J, et al. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease. *The Braz J Inf Dis* 2007; 11: 411-14.
27. Navarro E.C *et al.*: Indeterminate Form of Chagas' Disease and Metabolic Syndrome: A Dangerous Combination *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 2013, 3(4): 68-73
28. Halcox J, Quyyumi AA. Metabolic Syndrome: Overview and Current Guidelines. *Cardiology* 2005; 11: 1-12.
29. Wierzbicki AS. Um negócio de peixe: ácidos graxos ômega-3 e doenças cardiovasculares. *Int J Clin Pract*, August 2008, 62, 8, 1142-1146.
30. Combs TP, Nagajyothi Mukherjee S, Almeida CJG, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24085- 94.

31. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Weiss LM, et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 2019- 225.
32. Tanowitz HB, Julicks LA, Machado FS, et al. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. *Advances in Parasitology* 2011; 76: 235-50.
33. Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and Infection* 2011; 13: 1002- 5.
34. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, et al. TANOWITZ, HB. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cel Miicrobiol* 2012; 14: 634-43.
35. Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51:524–39.
36. Shoemaker JP, Hoffman RV Jr, Huffman DG. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Exp Parasitol* 1970; 27:403–7.
37. Shoemaker JP, Hoffman RV Jr. *Trypanosoma cruzi*: possible stimulatory factor(s) on brown adipose tissue of mice. *Exp Parasitol* 1974; 35:272–4.
38. Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90:521–2.
39. Combs TP, Nagajyothi , Mukherjee S, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* 2005; 280:24085–94.
40. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Thiruvur N, et al. *Trypanosoma cruzi* infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype. *Obesity* 2008; 16:1992 7.
41. Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect* 2011 Nov;13(12 13):1002–5.

42. Beleigoli AM, Lima-Costa MF, Diniz MF, Ribeiro AL. B-type natriuretic peptide and anthropometric measures in a Brazilian elderly population with a high prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection. *Peptides* 2011 Sep;32(9):1787–92.
43. Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer P.E, “The adipocyte as an endocrine cell,” *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 37, no. 3, pp. 753–768, 2008.
44. Filteau SM, Tomkins AM. Micronutrients and tropical infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88(1):1-3, 26.
45. Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, et al. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998; 152(4):925-34.
46. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000; 102(24):3003-8.
47. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265(3):621-636.
48. Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Immune response to infectious diseases. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2009; 42(2):127-42.
49. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, et al. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Immunology.* 2010; 185(2):1150-1157.
50. Cuppari, L. *Nutrição Clínica no Adulto.* 2º edição. São Paulo: 2006.
51. Cardoni, R.L., 1997. Inflammatory response to acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Medicina (B Aires)* 57, 227–234.

52. Pissetti CW, Correia D, Braga TT, et al. Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(4):425-30.

53. Desruisseaux M S, Nagajyothi, Trujillo M. E, Tanowitz H. B, et al, “Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease,” *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 3, pp. 1066–1078, 2007.

54. Ruan H, and Lodish H.F, “Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α ,” *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 14, pp. 447–455, 2003.

55. Beisel WR. Nutrition in pediatric HIV infection: setting the research agenda. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr.* 1996 ; 126(10): 2611S-2615S.

CAPÍTULO 2

Artigo 1: Normas da Revista Obesity (Qualis A2 – área de Medicina II)

Efeitos da Obesidade e citocinas pro-inflamatórias em camundongos Balb/c infectados com *Trypanossoma Cruzi*.

Camila Maria de Arruda ¹, Fabiane Valentini Francisqueti ², Mariana Gatto³, Jose Eduardo Corrente ⁴, Rodrigo Mattos dos Santos ¹, Paulo Câmara Marques Pereira¹

¹ Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem- Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

² Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

³ Departamento de Clínica Médica- Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

⁴ Departamento de Bioestatística – Instituto de Biociência UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

Palavra chave: Obesidade, Citocinas pró-inflamatórias e *Trypanossoma cruzi*

Título de execução: Obesidade, citocinas e a relação com a infecção por *T.cruzi*

Endereço : Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n Bairro: UNESP Campus de Botucatu 18618687 - Botucatu, SP

Email : Camilamarianutricao@gmail.com

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da obesidade e das citocinas pró-inflamatórias com a infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em camundongos Balb/c. Foram utilizados 60 camundongos machos Balb/c, e separados em 3 grupos, sendo 1 com dieta normal e 2 com dieta hipercalórica para indução a obesidade. Esses foram avaliados em 5 momentos: M1-1º dia, M2-3º dia, M3-5º dia, M4-7º dia e M5-8º dia. Para infecção utilizou a cepa aguda Y, com pico de parasitemia no sétimo dia (M4). A eutanásia foi realizada em cada grupo, e momento da infecção. Para determinação das citocinas utilizou o Kits de CBA –Cytometric Beads Array. A análise estatística foi realizada por medidas descritivas com o cálculo de média, desvio padrão, mínimo, máximo e mediana, testes ANOVA, Tukey, GAMA e Wald considerando nível de significância de 5%. Dentre os resultados houve aumento do peso relativo e de gordura corporal nos grupos induzidos a obesidade, classificando-os com obesidade, os quais apresentaram, principalmente dentre o infectado aumento de citocinas IL-6 e TNF- α e alterações metabólicas. O presente estudo revelou que a obesidade desencadeia alterações e metabólicas inflamatórias, e que a associação com a infecção agravou esse processo.

Introdução

A Doença de Chagas (DC) é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública da América Latina, e estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina.^{1,2}

A patologia é causada pela infecção pelo *T. cruzi*, e para o controle da infecção é necessário uma forte resposta imune humoral e celular; e o resultado da interação parasito-hospedeiro nas fases iniciais da infecção é extremamente importante³. A doença apresenta diferentes fases clínicas e imunológicas: o período agudo é caracterizado pela presença das tripomastigotas na corrente sanguínea, associada com fenômenos imunossupressores, o que é assintomática em 95% dos casos. Sendo assim, vale ressaltar que o pico de infecção da fase aguda, principalmente os infectados pela cepa Y é no 7º dia de infecção, sendo a mesma com alta virulência.^{3,4}

Atualmente, apesar dos esforços no seu controle a doença continua sendo importante problema de saúde pública, com muitos aspectos a serem esclarecidos, dentre eles, a relação entre Nutrição, Infecção e Imunidade. A Faculdade de Medicina de

Botucatu (FMB / Unesp), no Brasil, tem um ambulatório especializado para o acompanhamento desses pacientes. Nesse sentido, Um aspecto importante que deve ser estudado é a possível relação entre a doença de Chagas e obesidade.

O Brasil e diversos países têm experimentado grandes mudanças as quais afetaram o estilo de vida da população, reduziu a frequência de atividades físicas e aumentou o consumo de produtos com alto nível de gordura e açúcar. Esse estilo de vida predispõe a problemas alarmantes como a obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia, e como consequência, aumento da prevalência de síndrome metabólica.^{5,6}

Nesse sentido a obesidade gera uma grande preocupação, destacando que o tecido adiposo não é apenas um reservatório de energia, mas também um órgão endócrino responsável pela produção de citocinas pró-inflamatória, que contribui para o estado inflamatório e um consequente aumento susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica, resistência à insulina e eventos trombóticos.⁶

Além disso, o aumento da gordura corporal pode ser um risco para indivíduos com DC, pois o tecido adiposo é considerado um reservatório de *T. cruzi*, e, responsável pelo aumento da carga parasitária, macrófagos e desequilíbrio na regulação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias levando ao aumento do risco de danos aos tecidos, e agravando o quadro do paciente.^{7,8,9,10,11}

Com base nessas considerações, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da obesidade e das citocinas IL-6 e TNF- α em camundongos Balb/c infectados com *T. Cruzi*.

Métodos

Animal e Ambiente de Experimentação

O presente estudo foi desenvolvido com 60 camundongos isogênicos Balb/c, machos, com 8 semanas de vida, mantidos em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) num total de 3 grupos, sendo 1 com dieta normal e 2 com dieta hipercalórica rica em açúcares e lipídeos com água *ad libitum*. Os animais receberam a dieta durante 10 semanas, e após esse período infectados com *T. Cruzi*. Os mesmos foram criados e mantidos no biotério UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O projeto foi encaminhado e aprovado ao Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.(Protocolo 1144/2015)

Grupos de Estudo

Foram constituídos três grupos de estudos (G1 a G3) e todos avaliados em cinco momentos (M1 a M5) (Quadros 1 e 2). A classificação em momentos foi utilizada para a eutanásia e coleta das variáveis, as quais iniciaram 24horas após a infecção pelo *T. cruzi*.

Quadro 1. Descrição das condições dos grupos em estudo, compostos por 20 camundongos cada Grupo		Características
Estado de saúde		Dieta
G1	Controle eutrófico	Normocalórica
G2	Obeso infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i>	Hipercalórica
G3	Obeso infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i>	Hipercalórica

Os parâmetros utilizados no estudo foram:

- Indução da obesidade através da dieta hipercalórica rica em sacarose, gorduras e oferta de água com adição de sacarose a 20%
- Oferta de dieta normocalórica para grupo eutrofos com água sem adição de açúcar
- Infecção pelo *T. cruzi* cepa Y;
- Tratamento com Benzonidazol através do método de gavagem, 100mg/Kg/dia, a partir do primeiro até o quinto dia após infecção;

Quadro 2. Caracterização dos momentos do estudo MOMENTOS	TEMPO
M1 (momento 1)	24 horas após infecção pelo <i>Trypanossoma cruzi</i>
M2 (momento 2)	3° dia de infecção
M3 (momento 3)	5° dia de infecção
M4 (momento 4)	7° dia de infecção (pico de virulência da cepa Y)
M5 (momento 5)	8° dia de infecção

Infecção dos camundongos por *T.cruzi* e Controle da Parasitemia

Os camundongos machos Balb/c foram infectados após 10 semanas de oferta de dieta com as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* pela inoculação intraperitoneal de 10^4 tripomastigotas/mL de sangue, obtidas por punção cardíaca de animais previamente infectados pela cepa e mantidos no Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais. A concentração desejada para a infecção foi pela contagem de parasitas em câmara de Neubauer, sendo considerado 4 animais por campo. Cabe ressaltar que o

controle foi realizado pela contagem a qual é realizada e padronizada semanalmente no Laboratório através do requeipe e manutenção da cepa Y.

Dieta oferecida

A dieta oferecida foi a normocalórica para o grupo de camundongo eutrófico e dieta hipercalórica para os grupos de camundongos induzidos a obesidade. O tempo de início da dieta e oferta foram baseados segundo Lopez *et al*, 2003¹² iniciando com 40 dias de vida e ofertando a dieta por 10 semanas. Já a composição da dieta utilizadas neste estudo foi referenciadas segundo Francisqueti *et al* (2017)¹³, a qual a dieta hipercalórica continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, sacarose, frutose, banha, vitaminas e minerais, além de 20% de sacarose na água potável. Dieta controle continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, óleo de soja, vitaminas e minerais.

Os animais dos grupos G2 e G3 foram submetidos a oferta diária de dieta hipercalórica e água com sacarose *ad libitum* antes da infecção por *T. cruzi*, e a dieta controle ofertada somente ao grupo eutrófico (G1), com água sem sacarose. A dieta foi ofertada 3 vezes na semana (150g), e verificado o consumo da dieta de ambos os grupos, pela pesagem da ração (inicial e final). Decorridos as semanas de indução a obesidade, iniciou o estudo com infecção em ambos os grupos de animais sendo acompanhados por 8 dias.

Peso dos Animais

O peso dos animais foi aferido com balança digital uma vez por semana durante a indução da obesidade e nos cinco momentos (M1, M2, M3, M4 e M5) de cada eutanásia. Os cinco momentos determinados também eram fixados para os animais não infectados. Realizou-se a eutanásia de 04 animais de cada grupo, em cada momento, considerando os 3 grupos de animais.

Obtenção do material de estudo

Os animais foram anestesiados por inoculação intraperitoneal de quetamina e xilazina na proporção de 0,1 mL/Kg de peso. Em seguida realizou punção cardíaca para coleta de sangue, o qual foi centrifugado e armazenado a -80°C para posterior análise. A realização da eutanásia foi com 4 animais de cada grupo por dia, somando um total de 20 animais/dia. Em cada momento além do peso dos animais foi verificado o do tecido adiposo.

Determinação dos níveis séricos de *TNF- α* e IL-6.

Nos dias da eutanásia, foi realizado a coleta de sangue (por punção cardíaca) de 4 animais de cada grupo para determinação das citocinas. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, e armazenado em freezer a - 80°C até o dia da realização da análise por Kits de CBA –Cytometric Beads Array, através de citômetro de fluxo.

Análise bioquímica (Colesterol total, frações e ácido úrico)

As análises foram realizadas no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. As amostras do sangue foram coletadas em tubos e centrifugadas (3000rpm; 1- minutos) e o soro utilizado para as determinações séricas de ácido úrico e ácidos graxos livres o método utilizado foi o enzimático-colorimétrico e as análises realizadas em aparelho automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

Caracterização da Obesidade

Para a caracterização da obesidade foram considerados parâmetros como maior concentração de gordura corporal (gonadal e visceral), peso relativo (peso da gordura dividido pelo peso do animal) e exames laboratoriais de colesterol total e frações.

Análise Estatística

Inicialmente foram obtidas as medidas descritivas com o cálculo de média, desvio padrão, mínimo, máximo e mediana das variáveis quantitativas considerando momentos e grupos. A comparação entre as médias foi feita segundo um delineamento em dois fatores (grupos e momentos) e a interação (grupo versus momentos). Em caso de simetria na distribuição dos dados, foi utilizada a ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para decompor a interação grupos versus momentos. Em caso de assimetria, o mesmo delineamento foi utilizado ajustando um modelo linear generalizado com distribuição gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. As comparações foram feitas avaliando a interação grupo versus momento e as diferenças entre grupos apenas fixando momento.

Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas pelo programa SAS for Windows, v.9.4

Resultados

A **TABELA. 1** revela que em ambos os grupos houve diferença significativa entre o ganho de peso inicial e final dos camundongos *balb-c* no período antes da infecção por *T. cruzi*.

Na **TABELA 2**, verificou-se o peso relativo dos animais em diferentes grupos e momentos após a infecção *T. cruzi*. Independente dos momentos os grupos induzidos a obesidade apresentaram valores maiores de peso relativo em relação ao eutrófico, ou seja, tiveram um ganho de peso e maior quantidade de gordura

Tabela 1. Avaliação de ganho de peso de camundongos balb-c machos após indução de obesidade antes da infecção por *T. Cruzii*

Variáveis	Grupo Eutrófico (n20) Média/DP	Grupo Obeso (n40) Média / DP
Peso inicial (g)	24.52 ±1,82	24.72±2.80
Peso final (g)	29.29±2.11	29.19±2.75
	p<0,001	p<0,001

*valor de p significativo <0,05 teste t-pareado

Tabela 2. Avaliação do peso corporal relativo (peso e gordura) de camundongos balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* com tratamento e sem tratamento em diferentes momentos.

Variável	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)
Peso Relativo(g)			
M1	0.99± 0.22 ^a	1.49±0.56 ^{ac}	1.71±0.42 ^{bc}
M2	1.18± 0.27 ^a	1.39±0.23 ^{ad}	1.76±0.29 ^{ac}
M3	0.78 ± 0.14 ^a	1.69 ±0.37 ^b	1.37±0.44 ^b
M4	0.64± 0.20 ^a	1.56±0.30 ^{bd}	1.81±0.16 ^{bd}
M5	0.73 ± 0.35 ^a	1.88±0.17 ^{bc}	1.15±0.25 ^{bd}

(Grupo 1 – eutrófico controle), G2 (Grupo 2-obeso controle), G3 (Grupo 3-obeso infectado com *T. cruzi*), M1 (momento 1), M2 (momento 2), M3 (momento 3), M4 (momento 4), M5 (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem (p<0,05). Teste ANOVA

Em concordância com o peso relativo, a quantidade de gordura corporal (**TABELA 3**), apresentou maior quantidade nos grupos induzidos a obesidade, podendo assim observar que a dieta teve efeito positivo para a indução.

Tabela 3. Peso de Gordura de camundongos balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* em diferentes momentos

Variáveis	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)
Gordura (g)			
M1	0.30±0.07 ^{ab}	0.40±0.17 ^{ab}	0.46±0.11 ^{ac}
M2	0.32±0.08 ^a	0.38±0.08 ^a	0.52±0.04 ^{bd}
M3	0.22±0.04 ^a	0.48±0.11 ^b	0.38±0.15 ^b
M4	0.18±0.04 ^a	0.44±0.15 ^b	0.48±0.05 ^b
M5	0.22±0.11 ^a	0.56±0.09 ^b	0.32±0.08 ^a

G1 (Grupo 1 – eutrófico controle), G2 (Grupo 2 -obeso controle), G3 (Grupo 3-obeso infectado com T cruzi, M1 (momento 1), M2 (momento 2), M3 (momento 3), M4 (momento 4), M5 (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem (p<0,05). Teste ANOVA.

Os resultados dos exames laboratoriais quanto aos níveis séricos de colesterol total (CT), ácido úrico e HDL (**TABELA. 4**) foram avaliados em ambos os momentos. Em relação aos níveis de CT houve diferenças em ambos os momentos e grupos, destacando maiores níveis de colesterol nos grupos induzidos a obesidade e principalmente no obeso infectado no pico da infecção M4.

Tabela 4. Avaliação de exames laboratoriais de camundongos balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* em diferentes momentos

Variáveis	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)
Colesterol Total (mg/dl)			
M1	107.20±8.01 ^a	191.00±16.51 ^{bc}	193.00±52.33 ^{bc}
M2	94.67±16.86 ^a	160.35±18.75 ^b	164.69±8.15 ^{bc}
M3	91.79±22.32 ^a	188.70±23.61 ^{bc}	174.79±18.74 ^{bc}
M4	94.77±7.21 ^a	130.28±11.31 ^b	159.40±32.37 ^{bc}
M5	90.36±4.82 ^a	181.84±23.40 ^{bc}	140.77±6.94 ^b
Ácido úrico (mg/dl)			
M1	2.91±1.22 ^a	3.70±2.01 ^{ad}	1.61±0.25 ^{ac}
M2	2.86±1.01 ^a	1.80±0.97 ^a	2.48±1.63 ^a
M3	2.76±1.35 ^a	2.31±0.87 ^a	1.32±0.45 ^b
M4	2.52±0.39 ^a	2.60±1.08 ^{ac}	1.02±0.67 ^b
M5	2.39±0.71 ^a	1.19±0.36 ^a	0.72±0.17 ^b
HDL (mg/dl)			
M1	139.80±11.12 ^a	190.80±11.21 ^{bc}	187.50±20.51 ^{bc}
M2	102.00±30.05 ^a	116.42±11.03 ^{ac}	116.84±11.12 ^{acd}
M3	78.46±36.50 ^a	126.86±11.75 ^b	118.89±8.68 ^b
M4	86.49±3.08 ^a	106.57±8.99 ^b	113.73±18.88 ^b
M5	84.28±3.26 ^a	146.84±14.65 ^b	99.27±6.66 ^a

G1 (Grupo 1 – eutrófico controle), G2 (Grupo 2 -obeso controle), G3 (Grupo 3-obeso infectado com T cruzi, M1 (momento 1), M2 (momento 2), M3 (momento 3), M4 (momento 4), M5 (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem (p<0,05). Teste de distribuição GAMA.

Tabela 5. Níveis de citocinas inflamatórias de camundongos balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* em diferentes momentos

Variáveis	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)
TNF-α (fn/mL)			
M1	5066.18 \pm 889.85 ^a	6587.46 \pm 2791.19 ^{ac}	4547.92 \pm 2247.42 ^a
M2	4559.47 \pm 1346.42 ^a	5841.08 \pm 1861.51 ^a	6360.99 \pm 5153.81 ^a
M3	4428.81 \pm 1252.95 ^a	5101.62 \pm 4959.76 ^{ac}	15020.53 \pm 9371.44 ^{bd}
M4	4907.82 \pm 2241.92 ^a	6535.21 \pm 6228.33 ^{abd}	37232.62 \pm 44947.23 ^{bd}
M5	5249.73 \pm 788.57 ^a	5163.41 \pm 2880.25 ^{ac}	22014.94 \pm 17204.51 ^{bd}
IL-6 (fn/mL)			
M1	1903.05 \pm 1086.28 ^a	935.30 \pm 537.75 ^{abc}	1050.98 \pm 869.98 ^{ab}
M2	1139.55 \pm 883.34 ^a	927.43 \pm 375.73 ^{ad}	3472.87 \pm 2605.80 ^{ac}
M3	861.90 \pm 801.63 ^a	3277.68 \pm 5322.98 ^b	8798.22 \pm 5250.53 ^b
M4	3743.95 \pm 975.39 ^a	1129.02 \pm 777.47 ^a	32414.19 \pm 37807.41 ^b
M5	960.23 \pm 412.37 ^a	1704.53 \pm 1023.38 ^{ac}	41037.24 \pm 34530.42 ^b

TNF- α (Fator Necrosante Tumoral alfa), *IL-6* (Interleucina-6), *G1* (Grupo 1 eutrófico controle), *G2* (Grupo 2-obeso controle), *G3* (Grupo 3-obeso infectado com *T cruzi*), *M1* (momento 1), *M2* (momento 2), *M3* (momento 3), *M4* (momento 4), *M5* (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem ($p < 0,05$). Teste Distribuição GAMA.

O ácido úrico sérico dos animais apresentou poucas alterações significativas entre os diferentes grupos e momentos, sendo entre os grupos controle eutrófico e obeso (*G1* e *2*), e valores maiores no grupo obeso principalmente no

M1. Os valores de referência do HDL mostraram-se maior nos grupos induzidos a obesidade, principalmente no *M4*, que foi o pico da infecção, para os grupos com *T. cruzi*

Os níveis de citocinas séricos encontrados nos diferentes grupos e momentos mostraram resultados diferentes, principalmente entre os grupos com a infecção (TABELA. 5).

A TNF- α entre os grupos controle eutrofico e obeso, os níveis estavam ligeiramente aumentados no obeso, sendo nitidamente elevados principalmente em relação ao grupo obeso infectado. Vale destacar que os valores de citocina estava muito mais elevado no grupo obeso infectado no pico da infecção M4.

A citocina IL-6 foi avaliada entre os grupos nos diversos momentos também, e entre o G1 e G3, o grupo obeso controle foi menor em alguns momentos em relação ao eutrofico controle. Já quanto ao grupo infectado G3, os níveis de IL-6 foi aumentado no grupo obeso, sendo os valores progredindo conforme os dias de infecção, com maior valor no M4.

Portanto dentre os resultados apresentados até o momento há diversas alterações metabólicas e inflamatórias nos diferentes grupos em seus respectivos momentos da infecção pelo *T. cruzi*. Sendo assim, pode-se verificar que os grupos induzido a obesidade apresentaram maiores concentrações de gordura corporal, alterações laboratoriais e de IL-6 e TNF- α particularmente no M4 que é o pico da infecção.

Discussão

A infecção pelo *T. cruzi* continua sendo um importante problema de saúde pública, assim como a obesidade, particularmente porque a maioria dos indivíduos tem a forma crônica da doença e são adultos com mais de 50 anos período no qual aumenta o risco de doenças cardiovasculares e a obesidade. Sendo assim, estudos experimentais na fase aguda e posteriormente crônica, devem contribuir para o melhor conhecimento dessas interações. O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito da obesidade e citocinas pro inflamatórias em camundongos balb/c infectados por *T. cruzi* na fase aguda.

Nesse sentido observou-se principalmente nos grupos obesos infectados ou não, diversas alterações metabólicas e de citocinas pro-inflamatórias. A indução da obesidade

em camundongos Balb-c foi comprovada através da análise de gordura corporal, do peso relativo dos animais e exames laboratoriais, demonstrando que a dieta hipercalórica, rica em glicídeos e lipídeos foi eficaz.

Diferenças no peso foram observadas entre o G1 (controle eutrófico) e G2 (controle obeso), no qual o peso da gordura foi maior nos grupos induzidos a obesidade, conforme o esperado. Francisqueti et.al (2017)¹³, verificaram ganho de peso acentuado no grupo de animais com dieta hiperglicídica e lipídica em relação ao controle, concordando com o presente estudo no qual foi utilizada a mesma dieta, apenas a proporção de água com sacarose em menor quantidade.

Essa dieta rica em glicídeos e lipídeos colaborou para o aparecimento da obesidade, bem como alterações metabólicas (colesterol total) encontradas nos diferentes grupos. Houseknecht et al.¹⁴ revelam que em regiões endêmicas para doenças de chagas, bem como na população em geral apresentam grande número de obesos em consequência de hábitos alimentares inadequados associados ao sedentarismo o que tem como consequência efeitos significativos associados a presença deste parasita no hospedeiro humano.

O uso da dieta hiperlipídica desencadeia modificações no metabolismo dos animais ocasionando obesidade¹⁴. O presente estudo concorda com os dados da literatura, os quais sugerem a presença da obesidade entre os animais associados a alimentação hipercalórica que além de rica em gordura, apresenta também aumento de glicídeos.

De certa forma os grupos induzidos a obesidade revelaram níveis mais elevados nos exames bioquímicos, com destaque no momento do pico da infecção (M4), além de

elevação dos níveis de citocinas pro inflamatórias , o que se justifica além do processo infeccioso pelo acúmulo de gordura corporal.

Sabe-se que os adipócitos são considerados reservatórios de *T. cruzi* e responsável pelo aumento da carga parasitária, além do desequilíbrio de citocinas levando ao aumento de riscos e danos. ^{8,9}

Autores relatam que *T. cruzi* tem alta afinidade com frações de colesterol, e que na fase aguda da patologia o protozoário atinge principalmente o tecido adiposo e causa lipólise ^{15,16,17}. Sendo assim os níveis de Colesterol Total elevados no presente estudo podem estar associados com a infecção pelo parasita, sugerindo uma potencialização desses níveis nos grupos obesos infectados.

Portanto o tecido adiposo é considerado atualmente como órgão endócrino, e o adipócito continua a ser o foco de atenção, principalmente na DC em associação com a infecção pelo parasita pode estar ligadas a diversas alterações. ^{18,19}

Dentre os exames bioquímicos o ácido urico mesmo não tendo resultados expressantes no presente estudo, é um biomarcador muito utilizado, o qual tem função de auxiliar a inibir a ação de radicais livres , mas o aumento crônico está associado ao risco de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente em indivíduos com aumento de gordura corporal. ^{20,21,22}

Estudos epidemiológicos anteriores revelaram uma associação do aumento das concentrações de ácido úrico com a inflamação, e o aumento do risco de doenças cardiovasculares. ^{23,24}. Entretanto, são poucos os estudos que investigaram o papel preditor das concentrações do ácido úrico. ^{21, 25,23}

Outro aspecto importante além das alterações bioquímicas são as imunológicas, particularmente as citocinas IL-6 e TNF- α . Valores elevados de citocinas nos grupos obesos, principalmente infectados foram observados, destacando principalmente o TNF- α . Sabe-se que o TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, linfócitos B e T, bem como outras linhagens celulares, em resposta a estímulos inflamatórios e infecciosos.

Cada vez mais há especulação sobre o papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na inflamação aguda e desfecho clínico da doença de chagas.²⁶ Autores^{27,28,29} também relatam que as citocinas podem ser utilizadas como biomarcadores, a fim de identificar os fatores imunológicos influenciar a progressão da doença de chagas. O aumento dessa citocina deve-se a condição inflamatória pela obesidade e principalmente pelo *T. Cruzi*.

Observa-se que o grupo infectado (G3), mostrou níveis mais elevados de citocinas sejam elas TNF- α ou IL-6. Esse fato pode ser justificado pela presença do processo infeccioso agudo e do tecido adiposo em maior quantidade, o qual eleva a produção de citocinas resultando em um nível de inflamação maior principalmente durante o pico da infecção (M4).

É de suma importância destacar que o TNF- α é uma citocina com ação endócrina, a qual tem forte correlação com a obesidade, ou seja, quantidades elevadas de gordura corporal, e age no adipócito, desempenhando um papel regulador no acúmulo de gordura corporal.^{30, 31, 32}

Quanto aos resultados de IL-6, os níveis se encontram elevados no grupo obeso infectado, tendo sua progressão conforme o desenvolvimento da infecção, com destaca que para o pico. Cabe salientar que a citocina IL-6 é de suma importância na avaliação de processos infecciosos agudos e alterações nutricionais já que também é produzida pelos

adipócitos, as quais têm valores aumentados em indivíduos com quantidades elevadas de gordura corporal, colaborando para aparecimento de síndrome metabólica.^{33, 34}

Aspecto de suma importância é o estado nutricional, sendo a obesidade como cascata e fonte de origem de alterações metabólicas e inflamatórias, agravadas pelo processo infeccioso.

Conclusão

O estado nutricional tem uma grande influência no processo infeccioso pelo *T. cruzi*. O presente estudo revelou que a obesidade desencadeia alterações inflamatórias detectadas pelas citocinas pró inflamatórias e metabólicas, e que a associação com o processo infeccioso agravou esse processo.

Referências Bibliográficas

1. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26: 275–291.
2. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115: 14–21.
3. Kierszenbaum F, Moretti E, Szein MB. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules which regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. *Biol Res* 1993; 26: 197-207 [PMID: 767 0532]
4. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 Suppl 1: 113-122 [PMID: 17992371 DOI: 10.1590/S0074-0276 2007000900018]
5. Navarro E C *et al.*: Indeterminate Form of Chagas' Disease and Metabolic Syndrome: A Dangerous Combination *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 2013, 3(4): 68-73
6. Halcox J, Quyyumi AA. Metabolic Syndrome: Overview and Current Guidelines. *Cardiology* 2005; 11: 1-12.

7. Combs TP, Nagajyothi Mukherjee S, Almeida CJG, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24085- 94.
8. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Weiss LM, et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 2019- 225.
9. Tanowitz HB, Julicks LA, Machado FS, et al. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. *Advances in Parasitology* 2011; 76: 235-50.
10. Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z, et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and Infection* 2011; 13: 1002- 5.
11. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, et al. TANOWITZ, HB. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cel Microbiol* 2012; 14: 634-43.
12. Lopez IP, Marti A, Milagro FI, Zulet Md Mde L, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA *et al.* DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res.* 2003;11(2):188-94.
13. Francisqueti F.V, Minatel I.O, Ferron A.J.T et al. Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet Nutrients 2017, 9, 1299; doi:10.3390/nu9121299.
14. Houseknecht, Karen L, and Michael ES (2003) Leptin regulation of lipid homeostasis: dietary and metabolic implications. *Nutrition research rev* 16: 83–96.
15. Combs TP, Nagajyothi F, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, et al. (2005) The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem* 280: 24085–24094.
16. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhya R, Zhao D, et al. (2012) Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J Infect Dis* 205: 830–840.
17. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e953.
18. Desruisseaux MS, Nagajyothi, Trujillo ME, Tanowitz HB, Scherer PE. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun* 2007;75:1066–1078. [PubMed:17118983]
19. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006;55:1537–1545. [PubMed: 16731815]
20. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic

- encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(2):675-80.
21. Tsouli SG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Athyros VG, Elisaf MS. Elevated serum uric acid levels in metabolic syndrome: an active component or an innocent bystander? *Metabolism*. 2006;55(10):1293-301. Review.
 22. Serpa Neto A, Rossi FM, Valle LG, Teixeira GK, Rossi M. Relation of uric acid with components of metabolic syndrome before and after roux-en-y gastric bypass in morbidly obese subject. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011; 55(1):38-45.
 23. Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2009; 202(1):11-7. Review.
 24. Oliveira EP, Moreto F, Silveira LV, Burini RC. Dietary, anthropometric, and biochemical determinants of uric acid in free-living adults. *Nutr J*. 2013;12:11
 25. Barbosa MC, Brandão AA, Pozzan R, Magalhães ME, Campana EM, Fonseca FL, et al. Associação entre ácido úrico e variáveis de risco cardiovascular em uma população não hospitalar. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(3):212-8.
 26. Kollias, G., Sfikakis, P.P., 2010. *TNF pathophysiology: molecular and cellular mechanisms*. Karger, Basel, Switzerland.
 27. Armah H, Wilson N, Sarfo B, Powell M, Bond V, et al. (2007) Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malaria Journal* 6: 147.
 28. Erdman LK, Dhabangi A, Musoke C, Conroy AL, Hawkes M, et al. (2011) Combinations of Host Biomarkers Predict Mortality among Ugandan Children with Severe Malaria: A Retrospective Case-Control Study. *PLoS ONE* 6: e17440.
 29. Boulware DR, Meya DB, Bergemann TL, Wiesner DL, Rhein J, et al. (2010) Clinical Features and Serum Biomarkers in HIV Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome after Cryptococcal Meningitis: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med* 7: e1000384
 30. Shoemaker JP, Hoffman RV Jr, Huffman DG. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Exp Parasitol* 1970; 27:403–7.
 31. Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90:521–2.
 32. Combs TP, Nagajyothi , Mukherjee S, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* 2005; 280:24085–94.
 33. Carson WE. Pretreatment of malignant melanoma tumor with interferongamma potentiates IFN α jakstat signaling: potential role for IL12 therapy. *Am Soc Clin Oncol*. 1998;20:420430.

34. Bolon B, Campagnuolo G, Hu Y, Durynea D, Feigne V (California). Arthritis patterns in rats with adjuvantinduced arthritis define distinct mechanisms of joint protection for IL1 ra, PEG, sFRI and OPG. 2000 Eur Cong Rheumatol Annual Meeting, day 1.

CAPÍTULO 3

Artigo 2: Normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Qualis B3 – área de Medicina II)

Efeito do tratamento com benzonidazol sobre camundongos balb/c obesos infectados com *Trypanossoma Cruzi*.

Camila Maria de Arruda ¹, Fabiane Valentini Francisqueti ², Mariana Gatto³, Jose Eduardo Corrente ⁴, Alessandre Hataka ⁵ Rodrigo Mattos dos Santos ¹, Paulo Câmara Marques Pereira¹

¹ Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem- Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

² Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

³ Departamento de Clínica Médica- Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

⁴ Departamento de Bioestatística – Instituto de Biociência UNESP, Botucatu, São Paulo – Brasil

⁵ Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu UNESP, Botucatu, São Paulo - Brasil

Palavra chave: Obesidade, *Trypanossoma cruzi* e *Benzonidazol*

Título de execução: Obesidade, infecção por *T.cruzi* e Tratamento com *Benzonidazol*

Endereço : Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n Bairro: UNESP Campus de Botucatu 18618687 - Botucatu, SP

Email : Camilamarianutricao@gmail.com

Resumo

Introdução: A Doença de Chagas (DC), causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma patologia infecciosa crônica que apresenta grande incidência no Brasil. É acompanhada por alterações no sistema imune com variações nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias. O tratamento disponível no Brasil é o benzonidazol, com baixa eficácia na fase crônica e efeitos colaterais importantes. Além de toda a relação tratamento, infecção e nutrição, grandes mudanças afetaram o estilo de vida da população, e predispõe o aumento da obesidade. Portanto o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com benzonidazol sobre camundongos Balb/c obesos infectados com *T. Cruzi*. **Métodos:** Foram utilizados 80 camundongos machos Balb/c, e separados em 4 grupos, sendo 2 com dieta normocalórica e 2 com dieta hipercalórica. Esses foram avaliados em 5 momentos: M1-1º dia, M2-3º dia, M3-5º dia, M4-7º dia e M5-8º dia. Para infecção utilizou a cepa aguda Y, com pico de parasitemia no sétimo dia (M4) e tratamento com benzonidazol durante 8 dias. A eutanásia foi realizada em cada grupo, e momento. Para determinação das citocinas utilizou o Kits de CBA –Cytometric Beads Array. A análise estatística foi realizada pelos testes de Poisson, distribuição GAMA, Wald, ANOVA, Tukey e Teste T, sendo significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Houve aumento do peso relativo e de gordura corporal entre os que consumiram dieta hipercalórica, classificando-os com obesidade. Observa-se que as alterações inflamatórias estão mais elevadas nos grupos obesos, principalmente os sem tratamento. **Conclusão:** O estado nutricional tem uma grande influencia no processo infeccioso pelo *T. Cruzi*, sendo a obesidade um fator para auxiliar a desencadear o processo inflamatório. Portanto pode-se verificar que o tratamento com benzonidazol contribuiu para uma resposta melhor com menos alterações inflamatórias, principalmente em relação a IL6.

Introdução

A Doença de Chagas (DC) é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública da América Latina¹. Essa patologia representa uma condição infecciosa classificada como enfermidade “negligenciada” pela Organização Mundial de Saúde (OMS).^{2,3} A OMS estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina.⁴

Apesar de ser uma Doença descoberta a mais de um século, não existe um tratamento medicamentoso seguro para essa patologia, até o momento a única droga disponível e utilizada no Brasil é o benzonidazol, recomendada pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.^{5,6,7} Coura e Castro (2002)⁸ citam que o

benzonidazol reduz a gravidade clínica e congênita da fase aguda, sendo esse composto atingindo 60% de cura em média, tendo baixa ação na fase crônica.

Apesar dos esforços no seu controle a doença continua sendo importante problema de saúde pública, com muitos aspectos a serem esclarecidos, dentre eles, a relação entre Nutrição, Infecção e Imunidade. A Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB / Unesp), no Brasil, tem um ambulatório especializado para o acompanhamento desses pacientes. Mudanças afetam o estilo de vida da população que predispõe a obesidade, sendo assim, um aspecto importante que deve ser estudado é a possível relação entre a DC e obesidade. ³

A obesidade gera uma grande preocupação, destacando que o tecido adiposo não é apenas um reservatório de energia, mas também um órgão endócrino responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, que contribui para o estado inflamatório e consequente aumento na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e metabólicas. ⁹

Além disso, o aumento da gordura corporal pode ser um risco para indivíduos com DC, pois o tecido adiposo é considerado um reservatório de *T. cruzi*, e, responsável pelo aumento da carga parasitária, macrófagos e desequilíbrio na regulação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias levando ao aumento do risco de danos aos tecidos, e agravando o quadro do paciente. ^{10,11,12,13,14}

Com base nessas considerações, o objetivo do presente estudo foi o efeito do tratamento com benzonidazol sobre camundongos Balb/c obesos infectados com *T. Cruzi*.

Métodos

Animal e Ambiente de Experimentação

O presente estudo foi desenvolvido com 80 camundongos isogênicos Balb/c, machos, com 8 semanas de vida, mantidos em temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) num total de 4 grupos, sendo 2 com dieta normal e 2 com dieta hipercalórica rica em açúcares e lipídeos com água *ad libitum* tratados ou não com benzonidazol. Os mesmos foram criados e mantidos no biotério UNIPLEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O projeto foi encaminhado e aprovado ao Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP.

Grupos de Estudo

Foram constituídos 4 grupos de estudos (G1 a G4) e todos avaliados em cinco momentos (M1 a M5) (Quadros 1 e 2). A classificação em momentos foi utilizada para a eutanásia e coleta das variáveis, as quais iniciaram 24 horas após a infecção pelo *T. cruzi*.

Quadro 1. Descrição das condições dos grupos em estudo, compostos por 20 camundongos cada Grupo		Características
Estado de saúde		Dieta
G1	Eutrófico infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i> sem tratamento	Normocalórica
G2	Eutrófico infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i> com tratamento	Normocalórica
G3	Obeso infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i> sem tratamento	Dieta Hipercalórica
G4	Obeso infectado com <i>Trypanossoma cruzi</i> com tratamento	Dieta Hipercalórica

Os parâmetros utilizados no estudo foram:

- Indução da obesidade através da dieta hipercalórica rica em sacarose, gorduras e oferta de água com adição de sacarose a 20%
- Oferta de dieta normocalórica para grupo eutrófico com água sem adição de açúcar

- Infecção pelo *T. cruzi* cepa Y;
- Tratamento com Benzonidazol através do método de gavagem, 100mg/Kg/dia, a partir do primeiro até o quinto dia após infecção;

Quadro 2. Caracterização dos momentos do estudo MOMENTOS	TEMPO
M1 (momento 1)	24 horas após infecção pelo <i>Trypanossoma cruzi</i>
M2 (momento 2)	3° dia de infecção
M3 (momento 3)	5° dia de infecção
M4 (momento 4)	7° dia de infecção (pico de virulência da cepa Y)
M5 (momento 5)	8° dia de infecção

Infecção dos camundongos por *T.cruzi* e Controle da Parasitemia

Os camundongos machos Balb/c foram infectados após 10 semanas de oferta de dieta com as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* pela inoculação intraperitoneal de 10^4 tripomastigotas/mL de sangue, obtidas por punção cardíaca de animais previamente infectados pela cepa e mantidos no Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais. A concentração desejada para a infecção foi pela contagem de parasitas em câmara de Neubauer, sendo considerado 4 animais por campo. Cabe ressaltar que o controle foi realizado pela contagem a qual é realizada e padronizada semanalmente no Laboratório através do requeipe e manutenção da cepa Y.

Tratamento com Benzonidazol

Tratamento com Benzonidazol foi iniciado 24 horas após a infecção com o *T.cruzi*. A oferta foi através do método de gavagem, 100mg/Kg/dia, a partir do primeiro até o quinto dia após infecção;, sendo o comprimido macerado e diluído em água potável.

Dieta oferecida

A dieta oferecida foi a normocalórica para os grupos de camundongos eutróficos e dieta hipercalórica para o grupo de camundongos que serão induzidos a obesidade. O tempo de início da dieta e oferta foram baseados segundo Lopez *et al*, 2003¹⁵ iniciando com 40 dias de vida e ofertando a dieta por 10 semanas. Já a composição da dieta utilizadas neste estudo foi referenciadas segundo Francisqueti *et al* (2017)¹⁶, a qual a dieta hipercalórica continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, sacarose, frutose, banha, vitaminas e minerais, além de 20% de sacarose na água potável. Dieta controle continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, óleo de soja, vitaminas e minerais.

Os animais dos grupos G3 e G4 foram submetidos a oferta diária de dieta hipercalórica e água com sacarose *ad libitum* antes da infecção por *T. cruzi*, e a dieta controle ofertada somente aos grupos eutróficos (G1 e G2), com água sem sacarose. A dieta foi ofertada 3 vezes na semana (150g), e verificado o consumo da dieta de ambos os grupos, pela pesagem da ração (inicial e final). Decorridos as semanas de indução a obesidade, iniciou o estudo com infecção em ambos os grupos de animais sendo acompanhados por 8 dias.

Peso dos Animais

O peso dos animais foi aferido com balança digital uma vez por semana durante a indução da obesidade e nos cinco momentos (M1, M2, M3, M4 e M5) de cada eutanásia. Os cinco momentos determinados também eram fixados para os animais não infectados. Realizou-se a eutanásia de 04 animais de cada grupo, em cada momento, considerando os 4 grupos de animais.

Obtenção do material de estudo

Os animais foram anestesiados por inoculação intraperitoneal de quetamina e xilazina na proporção de 01 mL/Kg de peso. Em seguida realizou punção cardíaca para coleta de sangue, o qual foi centrifugado e armazenado a -80°C para posterior análise. A realização da eutanásia foi com 4 animais de cada grupo por dia, somando um total de 20 animais/dia. Em cada momento além do peso dos animais foi verificado o do tecido adiposo.

Determinação dos níveis séricos de TNF- α e IL-6.

Nos dias da eutanásia, foi realizado a coleta de sangue (por punção cardíaca) de 4 animais de cada grupo para determinação das citocinas. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, e armazenado em freezer a - 80°C até o dia da realização da análise por Kits de CBA –Cytometric Beads Array, através de citômetro de fluxo.

Caracterização da Obesidade

Para a caracterização da obesidade foram considerados parametros como maior concentração de gordura corporal (gonadal e visceral), peso relativo (peso da gordura dividido pelo peso do animal).

Coleta dos órgãos e histologia

Foram retirados órgãos como Fígado e Coração, os quais eram pesados em balança digital e conservados em frascos contendo formol tamponado a 10% por 24 horas. Após este período, a solução de formol tamponado 10% foi trocada para acondicionar os órgãos até o momento do processamento.

O preparo das lâminas foi realizado pela Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, no departamento de Histologia. O material foi submetido a álcool absoluto por uma hora, repetindo o processo por seis vezes. Na sequência, as amostras foram submersas em mistura de álcool e xilol (1:1), e depois somente em xilol (1 hora). Então as amostras eram colocadas em cubas de parafina para obtenção de cortes histológicos no micrótomo. Posteriormente foi realizado a coloração com hematoxilina-eosina. Para a leitura das lâminas para identificação de infiltrados inflamatórios e esteatose hepática as mesmas foram encaminhadas para o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu - UNESP

Análise Estatística

Inicialmente foram obtidas as medidas descritivas com o cálculo de média, desvio padrão, mínimo, máximo e mediana das variáveis quantitativas considerando momentos e grupos. A comparação entre as médias foi feita segundo um delineamento em dois fatores (grupos e momentos) e a interação (grupo *versus* momentos). Em caso de simetria na distribuição dos dados, foi utilizada a ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para decompor a interação grupos *versus* momentos. Em caso de assimetria, o mesmo delineamento foi utilizado ajustando um modelo linear generalizado com distribuição gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. As comparações foram feitas avaliando a interação grupo *versus* momento e as diferenças entre grupos apenas fixando momento.

Para análise das lâminas foram utilizados o Teste estatístico de Poisson. Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. Todas as análises foram feitas pelo programa SAS for Windows, v.9.4

Resultados

É possível observar na **Tabela 1** que em ambos os grupos houve diferença significativa entre o ganho de peso inicial e final dos camundongos Balb/c no período antes da infecção por *T. cruzi*.

Tabela 1. Avaliação de ganho de peso de camundongos Balb-c machos após indução de obesidade antes da infecção por *T. Cruzii*

Variáveis	Grupo Eutrófico (n40)	Grupo Obeso (n40)
	Média/DP	Média / DP
Peso inicial (g)	24.52 ±1,82	24.72±2.80
Peso final (g)	29.29±2.11	29.19±2.75
	p<0,001	p<0,001

*valor de *p* significativo <0,05 teste *t*-pareado

Tabela 2. Avaliação do peso corporal relativo (peso e gordura) de camundongos Balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* com tratamento e sem tratamento em diferentes momentos.

Variável	G1	G2	G3	G4
Peso Relativo(g)	(n20)	(n20)	(n20)	(n20)
M1	0.70±0.03 ^{ab}	1.23 ±0.71 ^a	1.71±0.42 ^{bc}	1.50 ±0.29 ^{ac}
M2	0.96±0.17 ^{ab}	0.59 ±0.21 ^b	1.76±0.29 ^{ac}	1.52 ±0.37 ^{ac}
M3	0.96±0.20 ^{ac}	0.63±0.15 ^{ac}	1.37±0.44 ^b	1.30 ±0.47 ^{ad}
M4	0.93±0.18 ^{ac}	0.92 ±0.46 ^a	1.81±0.16 ^{bd}	1.27±0.41 ^b
M5	1.18 ±0.15 ^b	1.01 ±0.24 ^a	1.15±0.25 ^{bd}	1.17±0.15 ^{bd}

G1 (Grupo 1- eutrófico infectado com *T cruzi*) *G2* (Grupo2-eutrófico infectado com *T cruzi* tratado com benzonidazol), *G4* (Grupo 4-obeso infectado com *T cruzi*), *G5* (Grupo5-obeso infectado com *T cruzi* e tratado com benzonidazol), *M1* (momento 1), *M2* (momento 2), *M3* (momento 3), *M4* (momento 4), *M5* (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem ($p < 0,05$). Teste ANOVA

Tabela 3. Peso da Gordura de camundongos Balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* com tratamento e sem tratamento em diferentes momentos

Variável	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)	G4 (n20)
Gordura (g)				
M1	0.20±0.00 ^a	0.36±0.22 ^{ab}	0.46±0.11 ^{ac}	0.40±0.07 ^{ab}
M2	0.28±0.04 ^a	0.16±0.05 ^b	0.52±0.04 ^{bd}	0.44±0.11 ^{bc}
M3	0.28±0.05 ^a	0.18±0.04 ^{ab}	0.38±0.15 ^b	0.36±0.11 ^{bc}
M4	0.26±0.05 ^a	0.28±0.15 ^a	0.48±0.05 ^b	0.34±0.11 ^{bc}
M5	0.34±0.05 ^b	0.30±0.07 ^a	0.32±0.08 ^a	0.33±0.05 ^a

G1 (Grupo 1- eutrófico infectado com T cruzi) G2 (Grupo 2-eutrófico infectado com T cruzi tratado com benzonidazol), G3 (Grupo 3-obeso infectado com T cruzi), G4 (Grupo 4-obeso infectado com T cruzi e tratado com benzonidazol), M1 (momento 1), M2 (momento 2), M3 (momento 3), M4 (momento 4), M5 (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem (p<0,05). Teste ANOVA.

Na **Tabela 2**, verificou-se que os grupos induzidos a obesidade apresentaram valores maiores de peso relativo em relação aos eutróficos, ou seja, tiveram um ganho de peso e maior quantidade de gordura

Em concordância com o peso relativo, a quantidade de gordura corporal (**Tabela 3**), apresentou maior quantidade nos grupos induzidos a obesidade, sejam eles infectados tratados ou não.

Os níveis de citocinas séricos encontrados nos diferentes grupos e momentos mostraram resultados diferentes, principalmente entre os grupos com a infecção pelo *T.cruzi* e sem tratamento (**TABELA. 4**).

Tabela 4. Níveis de citocinas IL-6 e TNF- α de camundongos Balb-c machos induzidos a obesidade, infectados e não infectados com *T. cruzi* com tratamento e sem tratamento em diferentes momentos

Variáveis	G1 (n20)	G2 (n20)	G3 (n20)	G4 (n20)
TNFα(fn/mL)				
M1	4160.60 \pm 1403.82 ^a	2410.57 \pm 1929.18 ^{ab}	4547.92 \pm 2247.42 ^a	5495.18 \pm 1261.22 ^a
M2	4418.48 \pm 1393.99 ^a	5173.99 \pm 2713.49 ^a	6360.99 \pm 5153.81 ^a	3048.91 \pm 2508.64 ^a
M3	9733.88 \pm 3830.91 ^a	15778.44 \pm 4513.76 ^{bc}	15020.53 \pm 9371.44 ^{bd}	16589.13 \pm 6250.27 ^{bd}
M4	26999.13 \pm 44468.72 ^b	20465.27 \pm 25352.71 ^{bc}	37232.62 \pm 44947.23 ^{bd}	22198.31 \pm 14806.18 ^{bd}
M5	23530.68 \pm 11787.45 ^b	29335.17 \pm 10986.09 ^b	22014.94 \pm 17204.51 ^{bd}	24381.35 \pm 22866.15 ^{bd}
IL6(fn/mL)				
M1	6323.35 \pm 5577.08 ^{ab}	12526.7619246.97 ^{bd}	1050.98 \pm 869.98 ^{ab}	265.46 \pm 44.47 ^{bc}
M2	734.81 \pm 520.00 ^{ab}	10800.78 \pm 6554.75 ^{ac}	3472.87 \pm 2605.80 ^{ac}	5072.05 \pm 8237.69 ^{ac}
M3	3354.64 \pm 1364.10 ^a	10984.62 \pm 3290.07 ^b	8798.22 \pm 5250.53 ^b	3073.80 \pm 1609.21 ^a
M4	13838.46 \pm 24127.51 ^a	15826.09 \pm 17019.62 ^{bd}	32414.19 \pm 37807.41 ^b	7518.11 \pm 5869.46 ^{ac}
M5	60633.78 \pm 50242.88 ^b	14999.91 \pm 4460.93 ^b	41037.24 \pm 34530.42 ^b	40400.22 \pm 24649.48 ^b

TNF α (Fator Necrosante Tumoral alfa), IL6 (Interleucina 6), G1(Grupo 1- eutrófico infectado com T cruzi) G2 (Grupo 2-eutrófico infectado com T cruzi tratado com benzonidazol), G3 (Grupo 3-obeso infectado com T cruzi), G4 (Grupo 4-obeso infectado com T cruzi e tratado com benzonidazol), M1 (momento 1), M2 (momento 2), M3 (momento 3), M4 (momento 4), M5 (momento 5). Médias seguidas de letras minúscula iguais na linha fixando grupo não diferem ($p < 0,05$) Teste de distribuição GAMA.

A TNF α encontra-se mais elevado no grupo obeso infectado sem tratamento, principalmente no pico da infecção (M4). Em relação ao grupo obeso e eutrofico infectados com tratamento, os níveis estavam também aumentados no pico da infecção no grupo obeso.

A citocina IL6 foi avaliada entre os grupos nos diversos momentos e nos grupos infectados sem tratamento (G1 e G3). Os níveis de IL6 estiveram aumentado no grupo obeso infectado principalmente no pico de infecção.

Para as análises de coração e fígado, obteve-se os resultados em avaliação de escores de positividade e negatividade, e usando o mesmo modelo para grupos e momentos não foram observados variações significativas (Teste estatístico de Poissan). Contudo a infecção não causou lesões significativas no tecido de coração, e o tempo de indução da dieta não ocasionou alterações hepáticas.

Sendo assim, pode-se verificar que os grupos com tratamento, principalmente o obeso tiveram menos inflamação, ou seja, mostra um efeito positivo do uso do benzonidazol.

Discussão

A DC é um problema de saúde pública ainda nos dias de hoje, ainda mais associado as mudanças atuais como a grande prevalência da obesidade. Sendo assim, estudos experimentais na fase aguda devem contribuir para o melhor conhecimento dessas interações, principalmente associado ao uso da única medicação para o tratamento, o benzonidazol. Nesse sentido o presente estudo teve como intuito avaliar os efeitos do tratamento com benzonidazol sobre camundongos obesos infectados com *T. cruzi*

Dentre os resultados apresentados os camundongos foram caracterizados como obesos, comprovando a indução da obesidade em camundongos Balb-c pela análise de

gordura corporal e do peso relativo dos animais, demonstrando eficácia da dieta hipercalórica.

Diferenças no peso foram observadas entre os eutrofos e obesos, no qual o peso da gordura foi maior nos grupos induzidos a obesidade, conforme o esperado. Francisqueti et.al (2017) ¹⁶, verificaram ganho de peso acentuado no grupo de animais com dieta hiperglicídica e lipídica concordando com o presente estudo no qual foi utilizada a mesma dieta.

Autores como Houseknecht et al.¹⁷ revelam que em regiões endêmicas para a DC, bem como na população em geral apresentam grande número de obesos em consequência de hábitos alimentares inadequados associados ao sedentarismo, e assim ocasionando efeitos significativos associados a presença deste parasita no hospedeiro humano.

Os adipócitos são considerados reservatórios de *T. cruzi* e responsável pelo aumento da carga parasitária, além do desequilíbrio de citocinas levando ao aumento de riscos e danos. ^{18,19} Autores relatam que *T. cruzi* na fase aguda da patologia atinge principalmente o tecido adiposo e causa lipólise ^{20,21,22}. Sendo assim, é possível observar no presente estudo que a concentração de gordura nos grupos obesos é maior, podendo assim colaborar para maior lipólise levando a alterações metabólicas e principalmente inflamatórias visualizadas no estudo

Valores elevados de citocinas nos grupos infectados eutrofos e nos obesos foram observados, destacando principalmente o TNF- α . Sabe-se que o TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, linfócitos B e T, bem como outras linhagens celulares, em resposta a estímulos inflamatórios e infecciosos.

Cada vez mais há especulação sobre o papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na inflamação aguda e desfecho clínico da doença de chagas.²³ Autores^{24,25,26} também relatam que as citocinas podem ser utilizadas como biomarcadores, a fim de identificar os fatores imunológicos influenciar a progressão da doença de chagas, o que dessa forma pode justificar o aumento das citocinas em animais não tratados.

O aumento dessa citocina deve-se a condição inflamatória pela obesidade e principalmente pelo *T. Cruzi*. Mas é importante destacar as diferentes alterações observadas nos grupos com e sem tratamento com benzonidazol.

Observa-se que entre os grupos infectados sem tratamento (G2 e G5), o obeso mostrou níveis mais elevados de citocinas sejam elas TNF- α ou IL-6. Esse fato pode ser justificado pela presença do processo infeccioso agudo e do tecido adiposo em maior quantidade, o qual eleva a produção de citocinas resultando em um nível de inflamação maior principalmente durante o pico da infecção (M4).

Em relação aos grupos de animais infectados com tratamento com benzonidazol, os níveis séricos de TNF- α revelaram-se mais elevados no grupo obeso até o pico da infecção mesmo com o uso da medicação que tem por intuito diminuir o número de parasitas circulantes na fase aguda²⁷ sugerindo assim a grande participação do tecido adiposo. Mas é de suma importância destacar que entre os grupos eutróficos e obesos, o obeso mesmo com uso de medicação tem uma maior inflamação.

Quanto aos resultados de IL-6, a mesma apresentou níveis elevados no grupo eutrófico com tratamento em relação ao obeso. Vale salientar que o uso da medicação, deve ter contribuído para a redução dos níveis dessa citocina, fato esse que concorda com o estudo de Revelli et al²⁸, o qual relatam que o tratamento in vitro com benzonidazol ativados em camundongo regulou negativamente a síntese de IL-6, ocasionando a inibição da produção.

Cabe salientar que a citocina IL-6 é de suma importância na avaliação de processos infecciosos agudos e alterações nutricionais já que também é produzida pelos adipócitos, as quais têm valores aumentados em indivíduos com quantidades elevadas de gordura corporal.^{29,30}

Portanto é possível dizer que o tratamento com benzonidazol reduziu o processo infeccioso principalmente em relação a citocina IL-6. Outro aspecto a ser considerado é o estado nutricional dos grupos, no qual o grupo eutrofico mostrou menos alterações inflamatórias, sendo um fator importante nas respostas inflamatórias observadas, e que a obesidade pode influenciar na patologia.

Conclusão

O estado nutricional tem uma grande influência no processo infeccioso pelo *T. Cruzi*, sendo a obesidade um fator para auxiliar a desencadear o processo inflamatório. Portanto pode-se verificar que o tratamento com benzonidazol contribuiu para uma resposta melhor com menos alterações inflamatórias, principalmente em relação a IL-6.

Referências

1. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J (2012) American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26: 275–291.
2. Schmunis GA, Yadon ZE (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115: 14–21.

3. WHO (2007) World Health Organization Global health atlas. Available: <http://www.who.int/globalatlas/> Accessed 2008 Mar 2.
4. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
5. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. 2002; 97(1):3-24.
6. De Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996; 348(9039):1407-13.
7. Rassi A. Etiological treatment of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 1982; 38(4):277-81.
8. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.
9. Ministério da Saúde (Brasil). Portal da Saúde - Doença de Chagas. 2011. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/> >. Acesso em: 15/07/2011

10. World Health Organization. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012. (WHO Technical Report Series, 975).
11. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.
12. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
13. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015 Feb;90(6):33-44.
14. João Carlos Pinto Dias e colaboradores. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015 *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília*, 25(núm. esp.): 7-86, 2016
15. Lopez IP, Marti A, Milagro FI, Zulet Md Mde L, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA *et al*. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in dietinduced (cafeteria) obese rats. *Obes Res*. 2003;11(2):188-94.

16. Francisqueti F.V, Minatel I.O, Ferron A.J.T et al. Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet *Nutrients* 2017, 9, 1299; doi:10.3390/nu9121299.
17. Houseknecht, Karen L, and Michael ES (2003) Leptin regulation of lipid homeostasis: dietary and metabolic implications. *Nutrition research rev* 16: 83–96.
18. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Weiss LM, et al. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 2019- 225.
19. Tanowitz HB, Julicks LA, Machado FS, et al. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. *Advances in Parasitology* 2011; 76: 235-50.
20. Combs TP, Nagajyothi F, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, et al. (2005) The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem* 280: 24085–24094.
21. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Machado FS, Upadhya R, Zhao D, et al. (2012) Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J Infect Dis* 205: 830–840.
22. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e953.

23. Kollias, G., Sfikakis, P.P., 2010. TNF pathophysiology: molecular and cellular mechanisms. Karger, Basel, Switzerland.
24. Armah H, Wilson N, Sarfo B, Powell M, Bond V, et al. (2007) Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malaria Journal* 6: 147.
25. Erdman LK, Dhabangi A, Musoke C, Conroy AL, Hawkes M, et al. (2011) Combinations of Host Biomarkers Predict Mortality among Ugandan Children with Severe Malaria: A Retrospective Case-Control Study. *PLoS ONE* 6: e17440.
26. Boulware DR, Meya DB, Bergemann TL, Wiesner DL, Rhein J, et al. (2010) Clinical Features and Serum Biomarkers in HIV Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome after Cryptococcal Meningitis: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med* 7: e1000384
27. Cançado, J.R. - Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benznidazole. In: Brener, Z.; Andadre, Z.A. & Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. p. 389-405.
28. Revelli S, Page C.L, Piaggio E, et al. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages *J Clin Exp Immunol* 1999; 118:27.

29. Carson WE. Pretreatment of malignant melanoma tumor with interferongamma potetiates IFNa jaksatat signaling: potential role for IL12 therapy. Am Soc Clin Oncol. 1998;20:420430.

30. Bolon B, Campagnualo G, Hu Y, Durynea D, Feigne V (California). Arthritis patterns in rats with adjuvantinduced arthritis define distinat mechanisms of joint protection for IL1 ra, PEG, sFRI and OPG. 2000 Eur Cong Rheumatol Annual Meeting, day 1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações finais

A DC é uma patologia com grande incidência e prevalência, com alterações imunológicas e histopatológicas, sendo assim com a necessidade de conhecer melhor a participação da obesidade nessa patologia e suas repercussões na fase aguda da infecção com ou sem tratamento pode-se observar que:

- Os níveis de citocinas IL-6 e TNF- α mostraram-se aumentados durante a infecção, mas principalmente entre os grupos obesos infectados.
- Os níveis de exames bioquímicos, dentre eles o colesterol total expressou níveis elevados nos grupos obesos e obeso infectado, mostrando uma relação da com o acúmulo de *T. Cruzi* nos adipócitos que levam a lipólise.
- A análise histopatológica do coração e fígado não demonstrou alterações significativas entre os diferentes grupos, em relação a infiltrados inflamatórios no coração, e de presença de adipócitos no fígado.

Portando o estado nutricional tem uma grande influencia no processo infeccioso pelo *T. Cruzi*, sendo possível observar a obesidade desencadeia alterações metabólicas e inflamatórias