

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

ELISA LIZ BELLI CASSA DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE DIETA  
HIPERLIPÍDICA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

VITÓRIA  
2017

ELISA LIZ BELLI CASSA DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE DIETA  
HIPERLIPÍDICA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde, linha de pesquisa em Diagnóstico e Intervenção em Nutrição e Saúde.

Orientador (a): Fabiane Matos dos Santos.

Co-Orientador (a): Mirelle Lomar Viana.

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D671a Domingues, Elisa Liz Belli Cassa, 1993 -  
Avaliação dos efeitos do consumo de dieta hiperlipídica na infecção  
experimental pelo *trypanosoma cruzi* / Elisa Liz Belli Cassa Domingues  
– 2017.  
53 f. : il.

Orientador: Fabiane Matos dos Santos.

Coorientador: Mirelle Lomar Viana.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) – Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Doença de Chagas. 2. Dieta Hiperlipídica. 3. Cardiomiopatia  
Chagásica. I. Santos, Fabiane Matos dos. II. Viana, Mirelle Lomar.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDU: 61

---

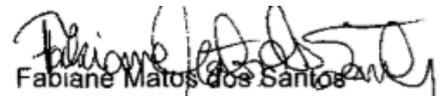
ELISA LIZ BELLI CASSA DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE DIETA  
HIPERLIPÍDICA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde, linha de pesquisa em Diagnóstico e Intervenção em Nutrição e Saúde.

Aprovado em 24 de julho de 2017

**COMISSÃO EXAMINADORA**



Fabiane Matos dos Santos

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Matos dos Santos**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

**Prof. Dr. Fabiano Kenji Haraguchi**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof. Dr. Rogério Graça Pedrosa**  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Blima Fux**  
Universidade Federal do Espírito Santo

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por permitir todos os acontecimentos ao longo de minha vida acadêmica e que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A minha orientadora, Fabiane Matos, por total apoio e suporte na execução do trabalho, pelas suas correções, incentivos e amizade.

Aos colegas de trabalho, Maiara e Germano por tornar cada dia de trabalho mais leve.

Aos meus pais e irmã, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu companheiro e amigo Cássio, por estar presente em todos os momentos com apoio e incentivo emocional.

Aos meus amigos que me proporcionaram momentos inenarráveis durante toda a trajetória acadêmica.

A Universidade Federal do Espírito Santo, seu corpo docente e ao programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde em nome da coordenadora Maria Del Carmen, que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior

A FAPES pelo apoio financeiro concedido.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença parasitária que tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. A cardiopatia chagásica é um importante acometimento da infecção pelo *T. cruzi* e pode manifestar quadros graves de insuficiência cardíaca com evolução para morte súbita. Além da etiologia parasitária, outras são ainda as causas que podem acarretar no desenvolvimento de doenças cardiovasculares com sinais de insuficiência cardíaca, tal como consumo da dieta hiperlipídica e o processo inflamatório corroborado pelas dislipidemias. Dessa forma o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a infecção experimental pelo *T. cruzi*. O peso corporal e a ingestão alimentar foram aferidos semanalmente. A parasitemia foi monitorada diariamente na fase aguda da infecção e parâmetros bioquímicos foram avaliados mensalmente por um período de 3 meses de infecção. Para avaliações histopatológicas, fragmentos do tecido adiposo e do tecido muscular cardíaco foram coletados após eutanásia dos animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo nº 043/2015). A dieta hiperlipídica propiciou redução da parasitemia na fase aguda da infecção ( $p < 0,05$ ), elevação do peso corporal principalmente no grupo não infectado e alimentado com dieta hiperlipídica, redução da ingestão alimentar média e elevação dos teores séricos de colesterol total a partir do 1º mês de infecção ( $p < 0,05$ ). Foram ainda verificados uma maior hipertrofia do tecido adiposo ( $p < 0,001$ ) nos animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica, e um aumento de células inflamatórias no tecido muscular cardíaco ( $p < 0,001$ ) acompanhando os elevados níveis séricos de citocina TNF-alfa dos animais infectados que consumiram dieta hiperlipídica. Esses resultados demonstram que o elevado consumo lipídico acarretou em hipertrofia do tecido adiposo e manutenção do processo inflamatório cardíaco.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Dieta hiperlipídica, Cardiopatia chagásica

## ABSTRACT

Chagas disease (DC) is a parasitic disease with the etiological agent *Trypanosoma cruzi*. Chagasic heart disease is an important infection of *T. cruzi* infection and can manifest severe cases of heart failure with evolution to sudden death. In addition to the parasitic etiology, others are also the causes that can lead to the development of cardiovascular diseases with signs of heart failure, such as consumption of the hyperlipid diet and the inflammatory process corroborated by dyslipidemias. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of the hyperlipidic diet on *T. cruzi* experimental infection. Body weight and food intake were measured weekly. The parasitemia was monitored daily in the acute phase of infection and biochemical parameters were evaluated monthly for a period of 90 days of infection. For histopathological evaluations, fragments of adipose tissue and cardiac muscle tissue were collected after euthanasia of the animals at 90 days of infection. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Espírito Santo (protocol no 043/2015). The hyperlipidic diet led to a reduction of parasitemia in the acute phase of infection ( $p < 0.05$ ), elevation of body weight mainly in the uninfected group and fed a hyperlipid diet, reduction in mean dietary intake and elevation of serum total cholesterol levels Infection ( $p < 0.05$ ). Increased adipose tissue hypertrophy ( $p < 0.001$ ) in uninfected animals fed a hyperlipidic diet, and an increase in inflammatory cells in the cardiac muscle tissue ( $p < 0.001$ ) following the elevated serum levels of TNF-alpha cytokine in animals Infected individuals who consumed a hyperlipidic diet. These results demonstrate that the high lipid consumption resulted in hypertrophy of adipose tissue and maintenance of the cardiac inflammatory process.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, High-fat diet, Chagas heart disease

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Peso aferido nos animais controles não infectados e alimentados dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e nos animais inoculados com  $10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados são relativos ao peso de cada animal aferido antes da infecção (círculos pretos) e após 90 dias da infecção (círculos brancos).....27

Gráfico 2 - Consumo alimentar médio mensurado semanalmente nos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e nos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensurados durante 90 dias de avaliação da ingestão alimentar média de cada grupo experimental.....28

Gráfico 3 - Curvas médias de parasitemia (A) e áreas sob as curvas de parasitemias individuais (B) obtidas dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH).....30

Gráfico 4 - Níveis de colesterol total avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total 90 dias de avaliação.....31

Gráfico 5 - Níveis de LDL-colesterol avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total 90 dias de avaliação.....32

mensalmente mensurados durante um período total de 90 dias de avaliação.....31

Gráfico 6 - Níveis de glicose avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total de 90 dias de avaliação.....32

Gráfico 7 - Níveis séricos de fator de necrose tumoral alfa medidos no 90 ° dia após a infecção em camundongos suíços inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas da cepa Berenice-78 *T. cruzi*, bem como para animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. NI-DP: animais não infectados alimentados com dieta padrão. NI-DH: animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica. IF-DP: animais infectados alimentados com dieta padrão. IF-DH: animais infectados alimentados com dieta hiperlipídica.....33

Gráfico 8 - Intensidade da inflamação no miocárdio na fase crônica dos animais infectados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta padrão x dieta hiperlipídica. Resultados com média mais um desvio padrão. DP-NI: dieta padrão e não infectado; DP-IF: dieta padrão e infectado; DH-NI: dieta hiperlipídica e não infectado; DH-IF: dieta hiperlipídica e infectado.....34

Gráfico 9 - Tamanho das células adiposas mensuradas no tecido adiposo dos animais infectados com ingestão de dieta padrão x dieta hiperlipídica, inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Resultados com média mais um desvio padrão.....35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
Figura 2- Delineamento Experimental do estudo.....	22
Figura 3- Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de animais controles não infectados e de animais inoculados com $5 \times 10^3$ tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Os animais foram alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica e necropsiados aos 90 dias após inoculação. A: DP-NI (animal alimentado com dieta padrão e não infectado); B: DP-IF (animal alimentado com dieta padrão e infectado); C: DH-NI (animal alimentado com dieta hiperlipídica e não infectado); D: DH-IF (animal alimentado com dieta hiperlipídica e infectado).....	34
Figura 4: Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo de animais controles não infectados e de animais inoculados com $5 \times 10^3$ tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Os animais foram alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica e necropsiados aos 90 dias após inoculação. A: DP-NI (animal alimentado com dieta padrão e não infectado); B: DP-IF (animal alimentado com dieta padrão e infectado); C: DH-NI (animal alimentado com dieta hiperlipídica e não infectado); D: DH-IF (animal alimentado com dieta hiperlipídica e infectado).....	36

## LISTA DE SIGLAS

DC – Doença De Chagas

CCC – Cardiopatia Chagásica Crônica

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

*ad libitum* – À Vontade

LDL-c – Colesterol de baixa densidade

NI DP – Não infectado com dieta padrão

NI DH – Não infectado com dieta hiperlipídica

IF DP – Infectado com dieta padrão

IF DH – Infectado com dieta hiperlipídica

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

TNF- alfa – Fator de necrose tumoral

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
1.1 A doença de Chagas.....	13
1.2 A cardiopatia chagásica .....	16
1.3 Dieta hiperlipídica e cardiopatias .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivos específicos .....	21
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	22
3.1 Delineamento Experimental .....	22
3.2 Animais .....	22
3.3 Infecção .....	23
3.4 Dieta.....	23
3.5 Avaliação bioquímica .....	24
3.6 Eutanásia e coleta do material .....	24
3.7 Análises morfométricas .....	24
3.8 Tecido muscular cardíaco .....	25
3.9 Tecido adiposo.....	25
3.10 Ensaio imunoenzimático inflamattório.....	26
3.11 Aspectos éticos.....	26
3.12 Análises estatísticas.....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>ANEXO</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

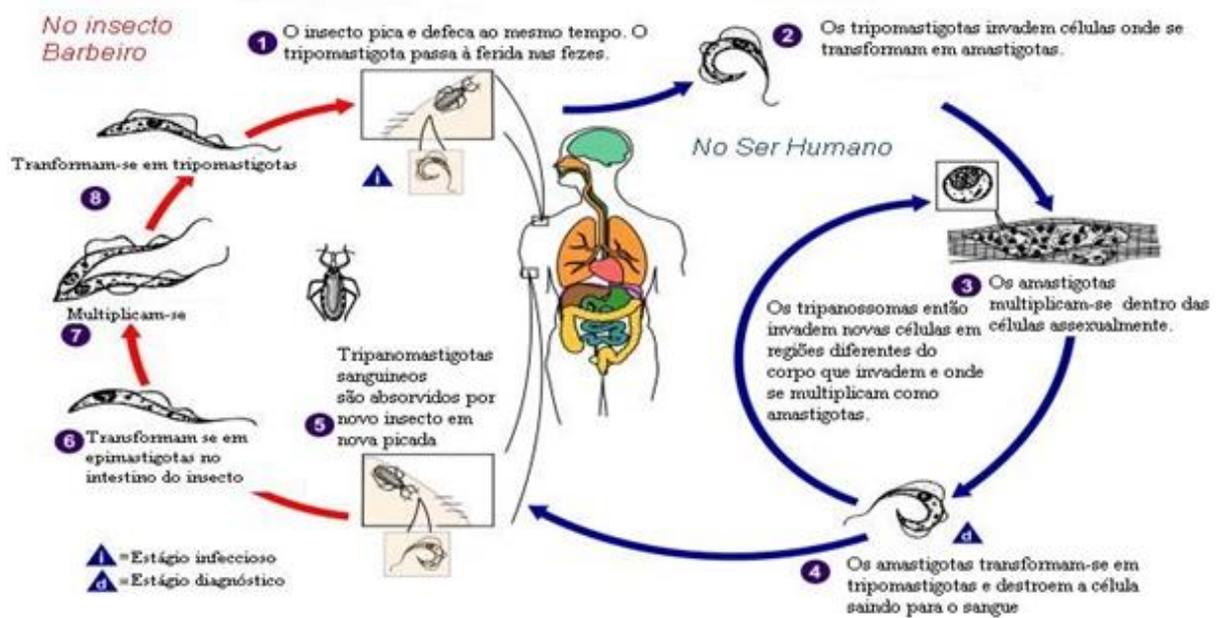
### 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma zoonose causada por um protozoário denominado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), um protozoário flagelado que é transmitido ao ser humano pelas fezes dos triatomíneos vetores da família Reduviidae, vulgarmente, popularmente conhecidos como “barbeiros” (WHO, 2008). Diferentes espécies de animais silvestres e domésticos são considerados reservatórios do parasito nos ciclos silvestre, peridoméstico e doméstico (MACEDO; JUNIOR, 2004).

A infecção chagásica é um problema de saúde pública e de acordo com a Organização mundial de saúde (OMS) (2015), aproximadamente 7 milhões de indivíduos que habitam desde o Chile e Argentina até o sul dos Estados Unidos encontram-se infectados pelo *T. cruzi*. A doença de Chagas apresenta uma mortalidade anual de aproximadamente 12.500 indivíduos e a OMS (2010) estimou o surgimento de 300 mil novos casos/ano da doença de Chagas entre 2007 a 2010. Segundo o Ministério da Saúde (MS) (2010) no Brasil foram notificados cerca de 690 casos de doença de Chagas aguda em 2010.

A transmissão vetorial é a principal forma de transmissão do *T. cruzi* ao ser humano, responsável pela endemicidade da doença de Chagas no continente americano. Ocorre por meio do contato com as fezes de triatomíneos infectados e consequente penetração das formas tripomastigotas metacíclicas infectantes em áreas de continuidade da pele do hospedeiro (OMS, 2002; MS, 2005). Transmissões secundárias do parasito como a transfusional, transplacentária (congênita), por transplante de órgãos e tecidos de pacientes infectados, acidentes de laboratório e aleitamento materno, possuem menor relevância epidemiológica (MS, 2005; DIAS, 2001). A transmissão vetorial do parasito para um hospedeiro vertebrado ocorre quando após o repasto sanguíneo pelo vetor infectado o mesmo defeca no local e a forma infectante tripomastigota metacíclica presente nesses dejetos penetra no hospedeiro. O *T. cruzi* na sua forma tripomastigota metacíclica é capaz de infectar o hospedeiro vertebrado, e uma vez no interior celular transforma-se na forma amastigota, que se divide por fissão binária e libera na circulação sanguínea as formas

tripomastigotas sanguíneas. Por sua vez, em hospedeiros invertebrados o *T. cruzi* inicia seu ciclo quando o inseto vetor durante o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados ingere conjuntamente as formas tripomastigotas sanguíneas infectantes, dando assim continuidade ao ciclo biológico (Figura 1) (NELSON; COUTO, 2006).



**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC.

Atualmente com um maior controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil a transmissão oral de *T. cruzi* vem ampliando a sua relevância epidemiológica, em especial nos contextos da Região Amazônica (COURA, 2015). Essa via de transmissão ocasionada pelo consumo de alimentos que são contaminados pelos dejetos do vetor é um desafio atual ao controle epidemiológico da doença, uma vez que vários casos estão sendo reportados, como aqueles vinculados ao fruto da palmeira de açaí como uma fonte comum de contaminação presente na Floresta Amazônica (OMS, 2015). Casos agudos de transmissão oral foram relatados no Brasil e na Venezuela respectivamente decorrentes da ingestão de caldo de cana-de-açúcar e suco de goiaba, ambos contaminados com fezes de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* (CLAYTON, 2010; MS, 2005). No período de 1965 a 2009, foram registrados 8 surtos fora da região amazônica brasileira, totalizando 106 casos. Destaca-se o surto de doença de chagas pela transmissão oral

ocorrido em Navegantes, na cidade de Santa Catarina em 2015, infectando 24 indivíduos e levando a 3 óbitos após a ingestão de caldo de cana contaminado (FERREIRA et al. 2014). Uma vez infectado pelo *T. cruzi*, pode ser reconhecido no indivíduo a presença de dois estágios da doença de Chagas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda, quando aparente, corresponde aos fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dias ou meses da infecção inicial, podendo ser diagnosticada pelo encontro de formas tripomastigotas no sangue periférico (COURA, 2007).

As manifestações gerais da fase aguda, quando presentes, são geralmente associadas a febre (pouco elevada), mal-estar geral, astenia, cefaleia, anorexia, edema, hipertrofia de linfonodos (VERONESI; FOCACCIA, 2002). Casos mais graves podem ser verificados na fase aguda, até mesmo com detecção de mortalidade em aproximadamente 10% das crianças infectadas menores de dois anos de idade que evoluem com manifestações clínicas de meningoencefalite e insuficiência cardíaca (COURA, 2007). A fase aguda tem duração de aproximadamente três a oito semanas, e em seguida o paciente evolui para fase crônica.

A fase crônica é caracterizada por escassez de parasitos no sangue e apresenta as seguintes formas clínicas: forma indeterminada, cardíaca e digestiva. A forma indeterminada é mais frequente e é caracterizada por ausência de sintomas aparentes (VERONESI; FOCACCIA, 2002, RODRIGUES; CASTRO, 2002). A forma cardíaca é considerada a mais importante pelo impacto de morbimortalidade, podendo ser sintomática ou não; e também por causar grande impacto médico-social, acarretar em perda de produtividade, impedimento ao trabalho e demandar elevados custos com tratamentos e cirurgias cardiovasculares (VERONESI; FOCACCIA, 2002, RODRIGUES; CASTRO, 2002) Por sua vez, a forma digestiva pode afetar a deglutição ao ocasionar regurgitação dos alimentos ingeridos, disfagia, soluços e salivação aumentada, resultando na dificuldade em se alimentar comumente evidenciada nos pacientes com quadros clínicos evolutivos de megaesôfago. Cerca de um terço dos indivíduos podem desenvolver dilatação do trato gastrointestinal e distúrbios motores gastrointestinais, como acalasia da cárdia, distúrbios de esvaziamento gástrico, alterações no trânsito intestinal e alterações motoras do cólon e vesícula biliar, podendo corroborar com a causa das deficiências nutricionais que podem estar

presentes em ambos os quadros clínicos de megaesôfago e megacólon (VERONESI, FOCACCIA, 2002; RODRIGUES; CASTRO, 2002; BOYCE, BAKNEET, 2005).

As formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas são consequências de uma associação prolongada entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, a qual pode acarretar um processo de inflamação e fibrose na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidades no sistema nervoso central (MONCAYO, 1999; TAFURI, 1987). Para todas as manifestações clínicas da doença na fase crônica, não existe um tratamento seguro e eficaz. O fármaco disponível e utilizado no Brasil é o benzonidazol, recomendado pela Fundação Nacional da Saúde, porém apresenta baixa eficácia na fase crônica (ANDRADE et al., 1996; RASSI, 1982; RODRIGUES, CASTRO, 2002). Esse medicamento possui ainda efeitos colaterais importantes, particularmente dermatites por hipersensibilidade, polineurite e depressão da medula óssea (PEREIRA, 1991; PONTES et al., 2010). Diante dessas limitações quimioterápicas, permanece atualmente a busca de opções terapêuticas para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes chagásicos crônicos, principalmente aqueles que evoluem clinicamente para a forma cardíaca.

## **1.2 A cardiopatia chagásica**

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a principal apresentação clínica da doença de Chagas, responsável pela maior morbimortalidade entre os pacientes que manifestam formas clínicas sintomáticas na fase crônica da infecção (PRATA, 2001). A morbimortalidade da CCC é relacionada tanto com a elevada frequência de sua ocorrência verificada entre os pacientes chagásicos crônicos, quanto à gravidade da evolução clínica que pode se manifestar por fibrilações atriais, tromboembolismos, arritmias, bloqueios de condução, falência cardíaca e morte súbita (BIOLO et al., 2010; ROCHA et al., 2003).

Na fase aguda pode ser possível encontrar 90% dos indivíduos sintomáticos com danos cardíacos, a depender principalmente de fatores associados à genética do parasito e resposta imunológica do hospedeiro. Esse encontro de danos cardíacos iniciais na fase aguda é relacionado a um pior prognóstico para a evolução crônica da patologia chagásica e forma clínica cardíaca na fase crônica (PARADA et al., 1997).

Entre os indivíduos infectados na fase crônica, cerca de 10% a 40% apresentam sinais clínicos evidentes do envolvimento crônico de vários órgãos, principalmente o

envolvimento cardíaco (PRATA, 2001). Essa variedade na frequência de manifestações clínicas associadas ou não às disfunções cardíacas pode ocorrer devido principalmente a características correspondentes ao parasito, como a variabilidade genética entre as cepas e seus diferentes perfis de tropismo tecidual. Em estudos prévios com camundongos inoculados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* foi observado predomínio de tropismo para células cardíacas e esqueléticas (TAFURI; BRENER, 1966). De modo semelhante, a cepa Colombiana do *T. cruzi* também demonstrou tropismo muscular cardíaco e esquelético em camundongos (FEDERICI et al., 1964). Outras características variáveis relativas à genética do parasito podem ainda culminar em altos picos de parasitemia, elevada virulência e antigenicidade conforme o tamanho do inóculo (MOREIRA, 2009; DIÓGENES, 2012).

Por outro lado, características do hospedeiro, como idade, sexo, o perfil da resposta imune e seu estado nutricional, podem também ser capazes de influenciar na evolução das diferentes manifestações clínicas sintomatológicas da doença de Chagas (DIAS, 2000; ANDRADE, ZICKER, 1995). Nesse contexto, Goto (2012) ao avaliar a influência da desnutrição do hospedeiro sobre a evolução da infecção aguda pelo *T. cruzi*, verificou que as grandes perdas energéticas geradas pelo hipercatabolismo decorrente da infecção foram sinergicamente associadas à desnutrição no favorecimento de uma maior ação do parasito no organismo hospedeiro.

Ainda com relação ao estado nutricional do hospedeiro, alguns estudos já têm sido realizados para avaliar a possibilidade de elevação do risco de morte cardíaca crônicas não transmissíveis, como obesidade, aterosclerose, hipertensão arterial e diabetes mellitus (HIDRON et al., 2010; MARTINS-MELO et al., 2012). Entretanto, poucos são os trabalhos que buscam elucidar a participação dos achados inflamatórios desencadeados pela obesidade na patogênese da cardiopatia chagásica crônica.

Mesmo diante à necessidade de maior esclarecimento dos mecanismos patogênicos que acarretam no envolvimento cardíaco crônico, muitos estudos revelam que a infecção pelo *T. cruzi* provoca uma intensa resposta pró-inflamatória sistêmica em vários órgãos, incluindo o coração. De acordo com Dhiman et al., (2013), a disfunção cardíaca está associada com uma extensa remodelação tecidual causada

pelo processo inflamatório resultante da infecção e consequente fibrose em áreas prévias de tecido muscular cardíaco.

Contudo, maiores elucidações dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas crônica ainda são necessárias. Dada a importância da resposta imunológica para o desenvolvimento da miocardite difusa decorrente de miocitólises e fibroses reparativas, é plausível pensar que o perfil da resposta imune possa estar relacionado com a evolução clínica da doença. Ferreira et al., (2003) demonstraram a associação dos níveis mais elevados da citocina TNF-alfa em pacientes com cardiopatia chagásica crônica e significativa disfunção do ventrículo esquerdo, quando comparados com pacientes na forma indeterminada da infecção. Santos et al., (2012) relataram uma elevação de citocina inflamatória TNF-alfa e diminuição dos níveis séricos da citocina regulatória IL-10 de acordo com a evolução da disfunção sistólica verificada na doença de Chagas experimental no modelo canino. Neste sentido, é ainda necessário melhor elucidar a influência do potencial pró-inflamatório do tecido adiposo sobre a patogênese da cardiopatia chagásica crônica.

### 1.3 Dieta hiperlipídica e cardiopatias

A doença cardiovascular é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, e estudos epidemiológicos associam a composição da dieta aos seus principais fatores de risco. As significativas mudanças nos hábitos alimentares durante esse século, têm sido marcadas pelo aumento do teor de lipídeos da dieta, sendo um fator primordial para a ocorrência de obesidade (CHEIK, 2005).

Concomitante a mudança de hábitos alimentares aumenta-se a incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na população mundial e sua maior prevalência em indivíduos obesos tem chamado atenção dos profissionais da área de saúde (ROSINI et al., 2012). A obesidade resultante de estados contínuos de elevada ingestão de nutrientes concomitante a baixos níveis de gasto energético acarreta no aumento do tecido adiposo pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (MEYER et al., 2013). A hipertrofia do tecido adiposo tem sido associada à disfunção dos adipócitos pela elevação na secreção de citocinas pró-inflamatórias e maior risco de desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (WEYER et al., 2000; SKURK et al., 2007; MEYER et al., 2013). Os adipócitos, células de acondicionamento lipídico, contribuem para a patogênese da diabetes, obesidade e síndrome metabólica (RAJALA et al., 2003) a secreção de seus produtos tem sido implicada em muitos processos fisiológicos (NAWROCKI, SCHERER, 2005; ATTIE, SCHERER, 2009). Até recentemente, o tecido adiposo era considerado um simples compartimento de armazenamento para os triglicerídeos. No entanto, os adipócitos são células endócrinas ativas que desempenham papel central na homeostase energética global e são importantes contribuintes para alguns aspectos do sistema imunológico (HALBERG et al., 2008). Os adipócitos são potencialmente capazes de influenciar a homeostasia do metabolismo energético pela produção e liberação de fatores hormonais específicos e mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e adipocinas (NAGAJYOTHI et al., 2011). Pouca atenção tem sido dada ao tecido adiposo e aos adipócitos no contexto das doenças infecciosas e entre essas a doença de Chagas; contudo o grande potencial pró-inflamatório do tecido adiposo sugere que este possa ter um importante papel na elaboração da resposta imune inata (DESRUISSEAUX et al., 2007). A ingestão de alimentos hiperlipídicos desempenha um

papel importante na regulação sistêmica e nos níveis lipídicos, desempenhando também funções na adipogênese e lipogênese. As recentes mudanças na dieta, e o aumento da obesidade em regiões endêmicas para a doença de Chagas são susceptíveis aos efeitos significativos sobre a interação do parasito com o indivíduo hospedeiro agravando ainda mais a epidemiologia das doenças cardiovasculares (NAGAJYOTHI et al., 2014).

A dieta hiperlipídica permite uma maior ingestão energética, uma vez que o lipídeo é o macronutriente que possui maior densidade energética. Dessa forma, sugere-se que a alta prevalência de obesidade está ligada ao consumo de alimentos industrializados e, conseqüentemente, hiperlipídicos (ROSINI et al., 2012).

Já foi bem estabelecido na literatura que a quantidade e o tipo de gordura alimentar exercem influência direta sobre fatores de risco cardiovascular, tais como a concentração de lípidos e de lipoproteínas plasmáticas. O estudo Interheart identificou três padrões alimentares distintos após avaliar a dieta de indivíduos de 52 países, denominados, respectivamente, dieta oriental (rica em proteínas vegetais), dieta ocidental (rica em gordura) e dieta prudente (rica em frutas e hortaliças) onde encontraram aumento de risco para infarto agudo do miocárdio de aproximadamente 30% na população que segue a dieta ocidental e a associação inversa foi obtida com o consumo de dieta denominada prudente (IQBAL et al., 2008).

Contudo, o papel dos lípidos sobre a patogenia da doença de Chagas ainda não está totalmente elucidado e verifica-se a necessidade de um maior esclarecimento sobre os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica sobre o processo inflamatório na cardiopatia chagásica.

## 2. OBJETIVOS

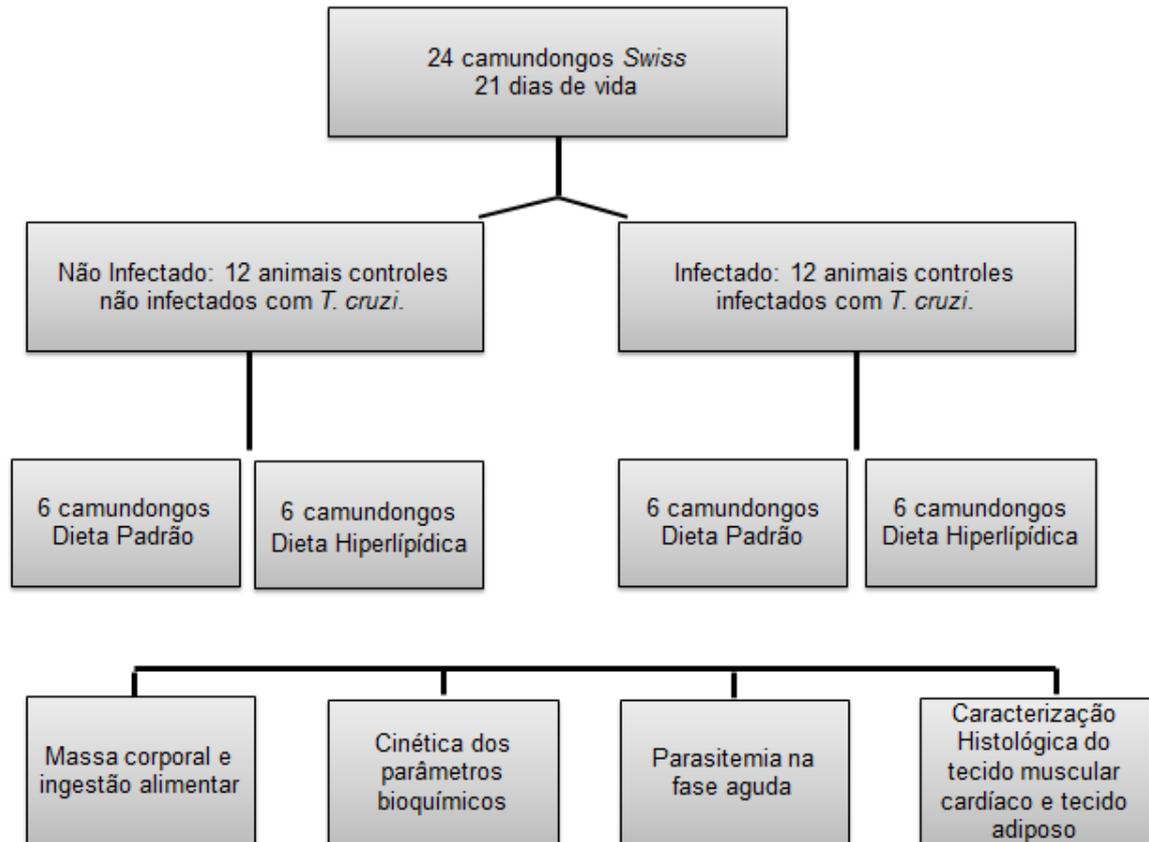
Avaliar o impacto do consumo de uma dieta hiperlipídica sobre a evolução da cardiopatia chagásica em camundongos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a influência da dieta hiperlipídica sobre os níveis de parasitemia causada pelo *T. cruzi* na fase aguda da infecção.
2. Avaliar a influência da dieta hiperlipídica sobre a evolução dos parâmetros bioquímicos, durante as fases aguda e crônica da infecção causada pelo *T. cruzi*.
3. Avaliar a influência da dieta hiperlipídica e da infecção pelo *T. cruzi* na hipertrofia do tecido adiposo e sobre o processo inflamatório no tecido muscular cardíaco.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento Experimental



**Figura 2 .** Delineamento Experimental do estudo

#### 3. 2 Animais

Foram utilizados 24 camundongos Swiss, fêmeas, com 21 dias de vida e peso aproximado de 20g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais: (1) seis animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão, (2) seis animais infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta padrão, (3) seis animais controles não infectados alimentados com dieta hiperlipídica e (4) seis animais infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta hiperlipídica. Os animais foram agrupados separadamente em quatro gaiolas de polipropileno, em

sala fechada, com temperatura controlada a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em um ciclo 12 horas claro/escuro, recebendo ração e água *ad libitum*. A massa corporal dos animais e a ingestão alimentar foram avaliadas semanalmente durante o todo o período experimental.

### 3.3 Infecção

A infecção chagásica experimental no modelo murino ocorreu com a utilização da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, classificada como *T. cruzi* II. Essa cepa foi isolada, por meio de xenodiagnóstico, da paciente Berenice no Brasil em 1978. Este foi o primeiro caso clínico humano descrito da doença de Chagas. (VELOSO et al., 2001).

A infecção dos animais pelo *T. cruzi* foi realizada via intraperitoneal com um inoculo de  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue.

A parasitemia foi avaliada diariamente na fase aguda da infecção, utilizando-se 5 $\mu$ l de sangue fresco entre lâmina e lamínula, coletadas pela veia caudal dos animais e examinado ao microscópio óptico. A quantificação das formas tripomastigotas sanguíneos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

### 3.4 Dieta

Os animais foram submetidos à ingestão de dieta padrão comercial para camundongos ou à dieta experimental hiperlipídica.

A dieta padrão utilizada consistiu de ração comercial para ratos, da marca Primor<sup>®</sup>. A composição centesimal da dieta encontra-se demonstrada na Tabela 1 de acordo com o fabricante, totalizando 20,72 kcal/dia. Já a dieta hiperlipídica foi constituída de mistura de alimentos hiperenergéticos seguindo a proporção: 15g de ração padrão, 10g de amendoim torrado, 10g de chocolate ao leite e 5g de biscoito de amido de milho. Estes ingredientes foram triturados e misturados, formando *pellets*, ofertados aos animais, fornecendo 31,89kcal/dia, estimando a ingestão média de cada animal como sendo 6,24 g/dia.

A dieta experimental foi baseada em Estadella et al. (2004), e todo o procedimento de fabricação dessa dieta foi realizado pela empresa Pragsoluções Biociências.

Tabela 1. Análise da composição centesimal (%) das dietas ofertadas no experimento / 100g)

NUTRIENTES	DIETA HIPERLIPÍDICA	DIETA PADRÃO
Lipídeos	20%	4%
Proteínas	20 %	23%
Carboidratos	48%	51%
Fibras	4%	4,5%
Umidade	8%	17,5%

### 3.5 Avaliação bioquímica

Os parâmetros bioquímicos de colesterol total, glicose sérica e LDL-colesterol foram cineticamente avaliados durante as fases aguda e crônica da infecção, englobando coletas de soro realizadas antes da infecção e após 15, 30, 60, 90 dias da infecção.

O sangue foi obtido por extração de 0,4 - 0,5 mL no seio venoso retro orbital, onde para obtenção do soro, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, posteriormente e o soro separado e colocado em microtubo tipo eppendorf identificado com os dados dos animais, e armazenados em freezer - 80° C até a avaliação.

As dosagens foram obtidas por meio de um analisador automático SINNOWA® pela espectrofotometria, utilizando-se *Kits* comerciais *Bioclin*. (FREITAS et al., 2013).

### 3.6 Eutanásia e coleta do material

Todos animais foram eutanaziados aos 90 dias após o início dos experimentos. Posteriormente à eutanásia foi realizada a coleta do tecido muscular cardíaco e tecido adiposo para análise histológica dos órgãos.

### 3.7 Análises morfométricas

Os fragmentos obtidos do coração foram conservados em formalina 10% e os fragmentos do tecido adiposo foram mantidos em álcool 70% por uma hora e em seguida passaram a ser conservados em formalina 10% até o processamento para avaliação histológica

Para a preparação das amostras e confecção das lâminas histológicas o material permaneceu durante 40 minutos em álcool 70%, 80%, 90%, absoluto I (100%) e absoluto II (100%), permanecendo 40 minutos em cada; posteriormente ocorreu a penetração da parafina no tecido utilizando o xilol para facilitar o processo e seguir para a fase de clareamento, onde, o material entrou em contato com xilol I e xilol II por 30 minutos em cada. O material já clareado foi colocado em parafina líquida à temperatura de aproximadamente 60° C, permanecendo durante 24 horas, posteriormente cada peça foi colocada em um molde com parafina líquida dentro, após a parafina endurecer, desenformou-se a peça, e realizou-se o corte.

Após o corte a parafina foi para a água a temperatura ambiente e logo após foi passada para a água quente, onde ocorreu a distensão da parafina. Após esse procedimento, utilizando uma lâmina coberta com clara de ovo, já seca, retirou-se a lasca de parafina e a posicionou sobre a mesma, sendo encaminhada para estufa com temperatura de 60° C durante aproximadamente 24 horas para o derretimento da parafina. Para avaliação histológica convencional por meio de coloração (I) Hematoxilina e Eosina (HE) a parafina foi retirada dos tecidos utilizando xilol, onde a lâmina passou por xilol I e xilol II, permanecendo durante 30 minutos em cada. Para a hidratação das lâminas, utilizou-se álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% e água, permanecendo durante 5 minutos em cada solução.

A lâmina permaneceu em hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos, foi mergulhada em água corrente por 30 minutos. Posteriormente a lâmina ficou em eosina por 40 segundos, e para retirada do excesso lavado em água e seca ao ar livre. Em seguida foi realizado a montagem da lâmina, onde adicionou-se uma gota de resina ao lado de cada corte e inseriu a lamínula sobre a lâmina e análise.

### **3.8 Tecido muscular cardíaco**

Para análise do material fotografou-se 20 campos de cada lâmina no aumento de 40x. Tal procedimento foi realizado com o auxílio do microscópio Leica e do programa LAS (Leica Application Suite). As fotos foram para análises da quantificação de inflamação.

### **3.9 Tecido adiposo**

Foram fotografados 20 campos de cada lâmina no aumento de 40x. Para analisar o tecido adiposo, avaliou-se o tamanho de cinco células adiposas (uma de cada

extremidade e uma central) de cada uma das 20 fotos com o auxílio do programa Image J.

### **3.10 Ensaio imunoenzimático inflamatório**

Os níveis de citocinas TNF-alfa no soro coletado de cada animal aos 90 dias após a infecção foram quantificados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA). A reação foi detectada pela adição de estreptavidina conjugada com peroxidase seguida pela adição de uma mistura de substrato contendo peróxido de hidrogênio e o cromogênio Tetrametilbenzidina (TMB).

### **3.11 Aspectos éticos**

Todos os procedimentos e protocolos foram realizados de acordo com a conduta preconizada pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram devidamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (Protocolo nº 43/2015).

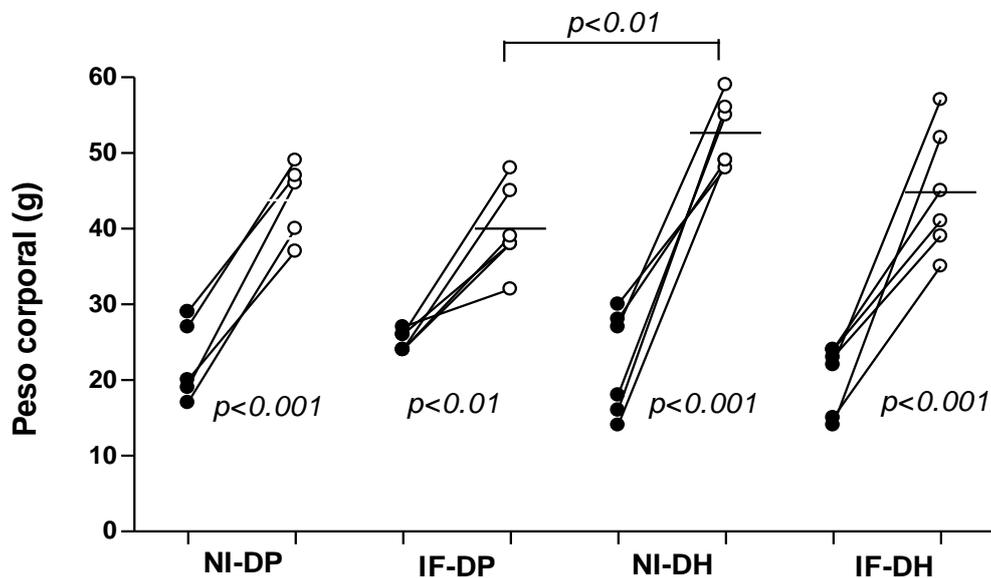
### **3.12 Análises estatísticas**

Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivos erros médios padrões ou então, pelos valores absolutos com respectiva média (gráficos de dispersão). Utilizou-se ANOVA para múltiplas comparações e Tukey, quando ANOVA apresentou variância. A análise das áreas sob as curvas de parasitemia foi realizada pelo cálculo individual da área da curva média de parasitemia de cada camundongo individualmente, seguido pelo teste T não-pareado para comparação entre os grupos. Todas as análises foram realizadas pelo do programa *GraphPadPrism*, com 5% de significância.

#### 4. RESULTADOS

O peso dos animais foi aferido semanalmente durante 90 dias de manutenção em oferta alimentar com dieta padrão ou dieta hiperlipídica

A avaliação possibilitou observar que houve um aumento significativo do peso corporal final em relação ao peso basal em todos os grupos. Nos grupos alimentados com dieta padrão foram observadas variações médias dos valores basais e finais do peso corporal expressos em médias e respectivos desvios padrões de  $23,50 \pm 5,43$  para  $43,80 \pm 5,07$  e de  $25,17 \pm 1,33$  para  $40,0 \pm 5,69$ , respectivamente nos grupos NI-DP e IF-DP. Por sua vez, o peso médio basal e final dos animais dos grupos NI-DH e IF-DH variou respectivamente de  $22,17 \pm 6,94$  para  $52,67 \pm 4,59$  e de  $20,33 \pm 4,59$  para  $44,83 \pm 8,31$ . Não foi verificada a existência de diferença significativa entre os pesos médios apresentados pelos diferentes grupos no momento basal, o qual antecedeu o início da oferta alimentar. Por outro lado, foi possível observar que o peso médio final dos animais do grupo NI-DH foi significativamente mais elevado que o peso médio final apresentado pelos animais do grupo IF-DP (Gráfico 1).

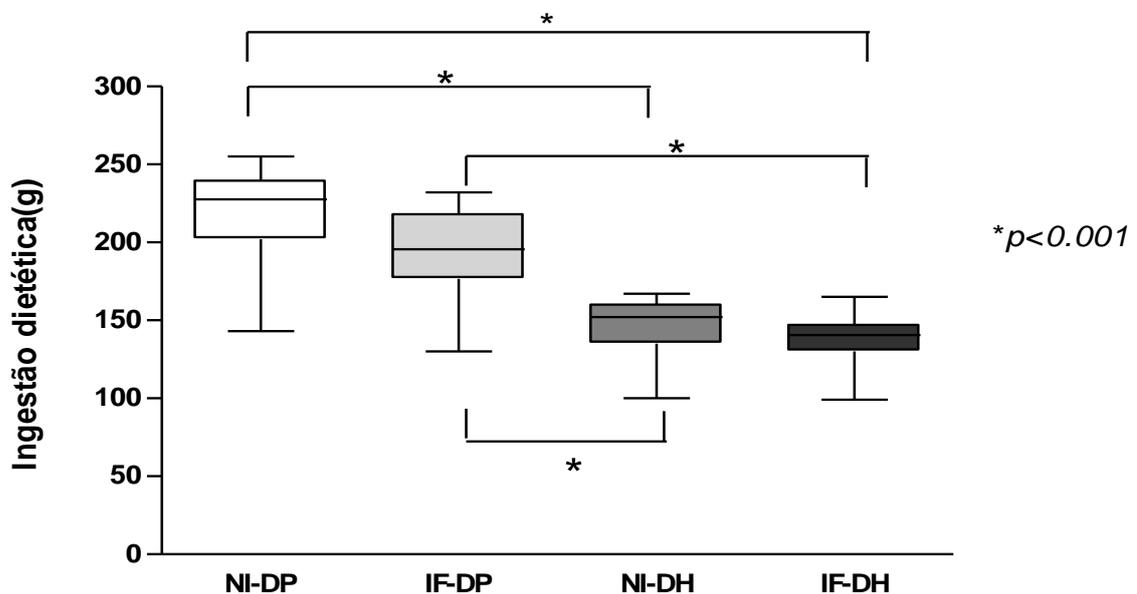


**Gráfico 1:** Peso aferido nos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e nos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados são relativos ao peso de cada animal aferido antes da infecção (círculos pretos) e após 90 dias da infecção (círculos brancos).

A ingestão alimentar média semanal dos grupos alimentados com dieta padrão e com dieta hiperlipídica foi avaliada durante 90 dias consecutivos. No Gráfico 2 são

demonstrados os valores médios mensurados entre os diferentes grupos experimentais.

A avaliação semanal da quantidade média da ingestão alimentar de cada grupo demonstrou valores significativamente mais elevados nos grupos alimentados com dieta padrão (NI-DP e IF-DP) quando comparados aos grupos alimentados com dieta hiperlipídica (NI-DH e IF-DH). Não houve diferença significativa dentro de ambos os grupos alimentados com dieta padrão (NI-DP e IF-DP) ou com dieta hiperlipídica (NI-DH e IF-DH), quando foram avaliados os animais infectados comparativamente aos animais controles e alimentados com a mesma dieta experimental (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Consumo alimentar médio mensurado semanalmente nos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e nos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensurados durante 90 dias de avaliação da ingestão alimentar média de cada grupo experimental.

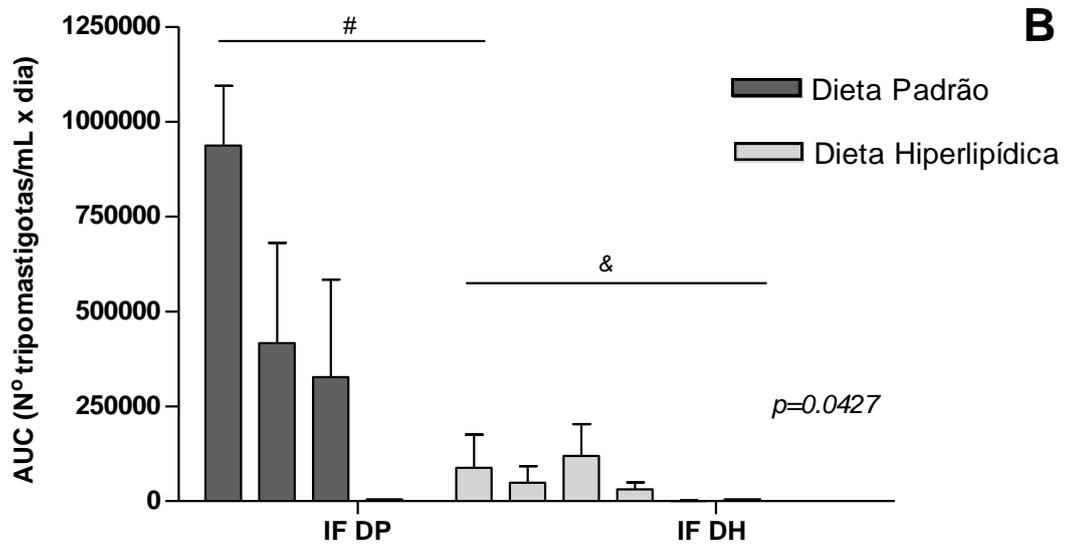
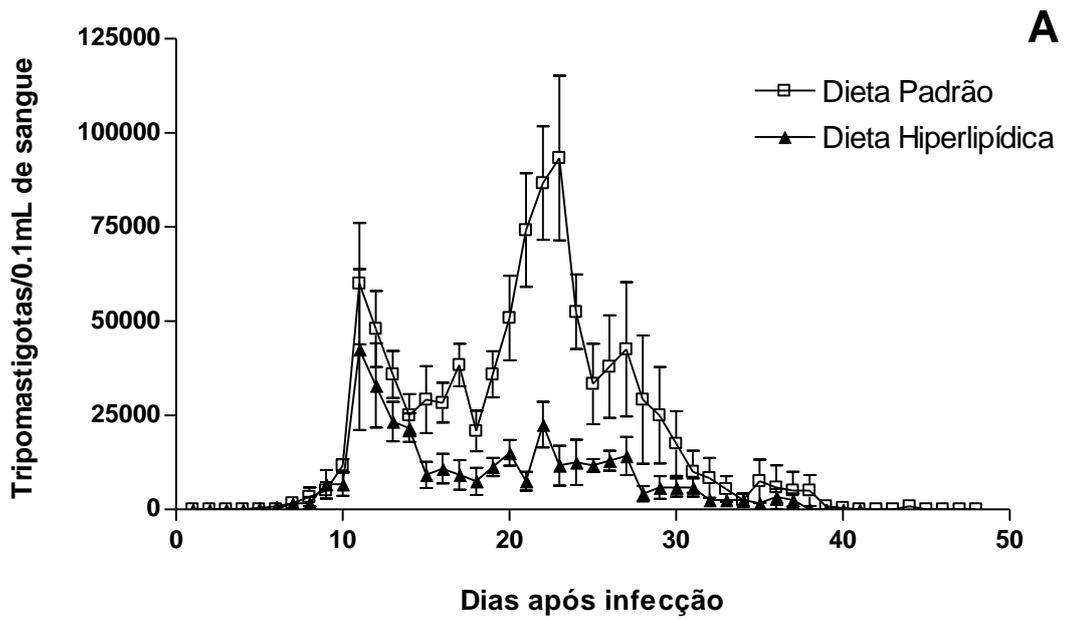
A parasitemia dos animais incluídos nos diferentes grupos experimentais infectados foi avaliada diariamente pelo exame de sangue a fresco, conforme técnica descrita por Brener (1962). Foi observado um período pré-patente similar entre ambos os grupos infectados, variando apenas de 4 a 6 dias respectivamente no grupo IF-DH e no grupo IF-DP. Por outro lado, um menor período patente foi verificado no grupo IF-DH (33 dias) em relação ao grupo IF-DP (38 dias) que demonstrou a presença do parasito até o 44<sup>o</sup> dia de infecção. No grupo IF-DP foram ainda detectados picos de parasitemia mais elevados no 11<sup>o</sup> e no 24<sup>o</sup> dia de infecção, com uma média de

respectivamente 65.000 e 90.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue. Por sua vez, picos de parasitemia mais brandos foram observados no 11<sup>o</sup> e no 22<sup>o</sup> dia de infecção entre os animais do grupo IF-DH, com valores médios de 45.000 e 20.000 tripomastigotas/0,1 mL de sangue respectivamente (Gráfico 3A).

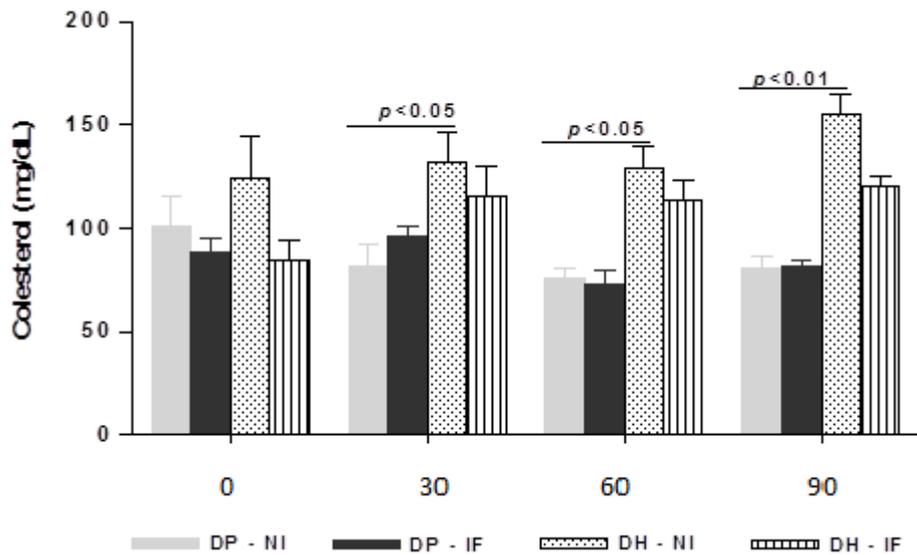
De modo interessante foi verificada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as áreas das curvas médias de parasitemia, a qual foi menor no grupo IF-DH (Gráfico 3B).

No Gráfico 4 são apresentados os dados obtidos nas dosagens de colesterol total no soro proveniente dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os resultados mostraram que a ingestão da dieta hiperlipídica acarretou na elevação significativa dos níveis de colesterol total nos animais dos grupos DH-IF e DH-NI em relação aos animais dos grupos alimentados com a dieta padrão (DP-NI e DP-IF), a partir do 1<sup>o</sup> mês de infecção.

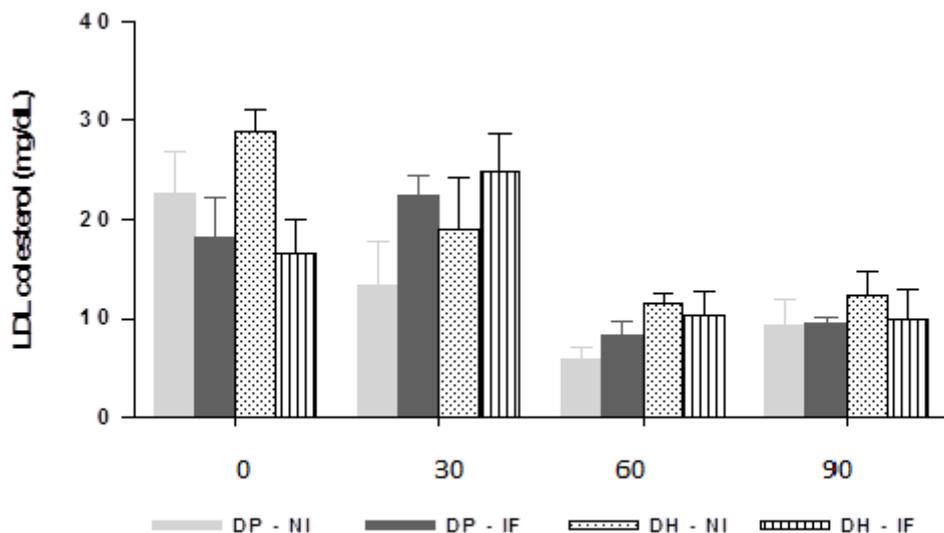
No Gráfico 5 são demonstrados os valores de LDL- c mensurados mensalmente em todos os grupos experimentais, desde antes da infecção até o final do período de experimentação, após 90 dias de infecção. Não houve diferença estatística entre as médias dos níveis de LDL-c detectados durante 90 dias de manutenção de camundongos Swiss em ingestão alimentar de dieta com 20% de lipídios.



**Gráfico 3:** Curvas médias de parasitemia (A) e áreas sob as curvas de parasitemias individuais (B) obtidas dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH).

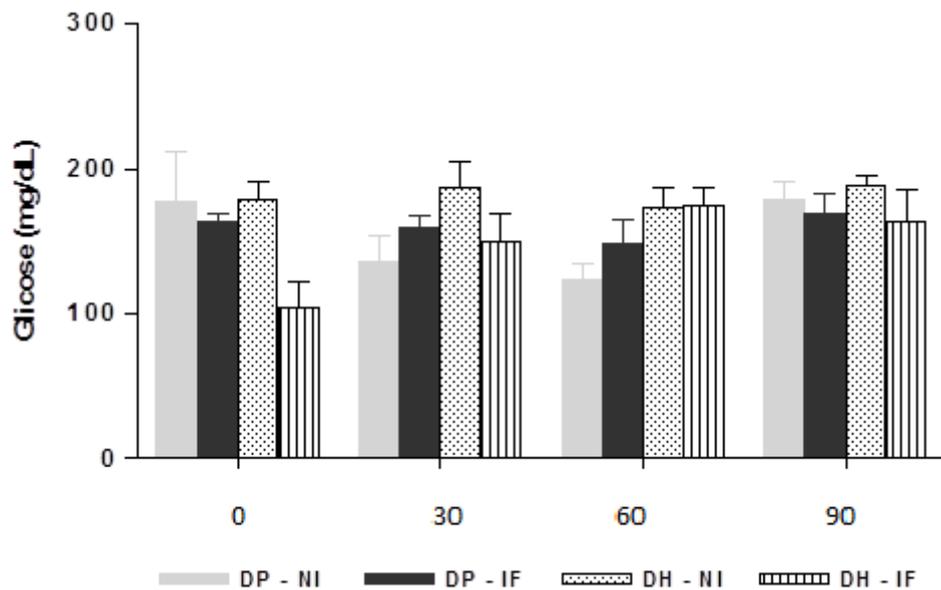


**Gráfico 4:** Níveis de colesterol total avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total 90 dias de avaliação.



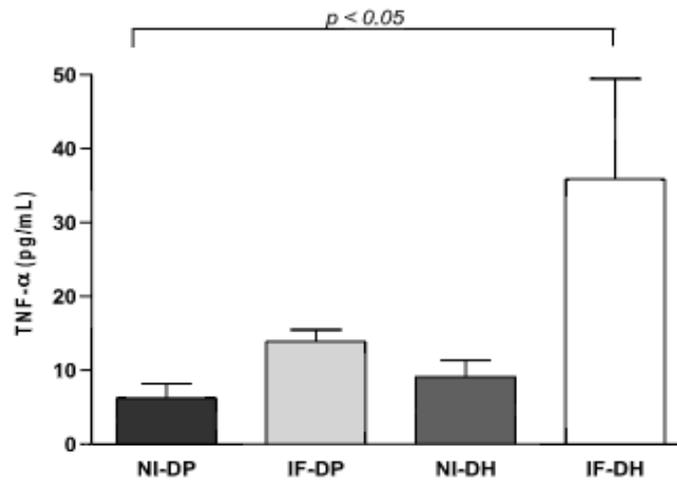
**Gráfico 5:** Níveis de LDL-colesterol avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total de 90 dias de avaliação.

No Gráfico 6 são apresentadas as taxas séricas de glicose de todos os grupos experimentais mensuradas cineticamente durante o período experimental total de 90 dias de infecção pelo *T. cruzi*.



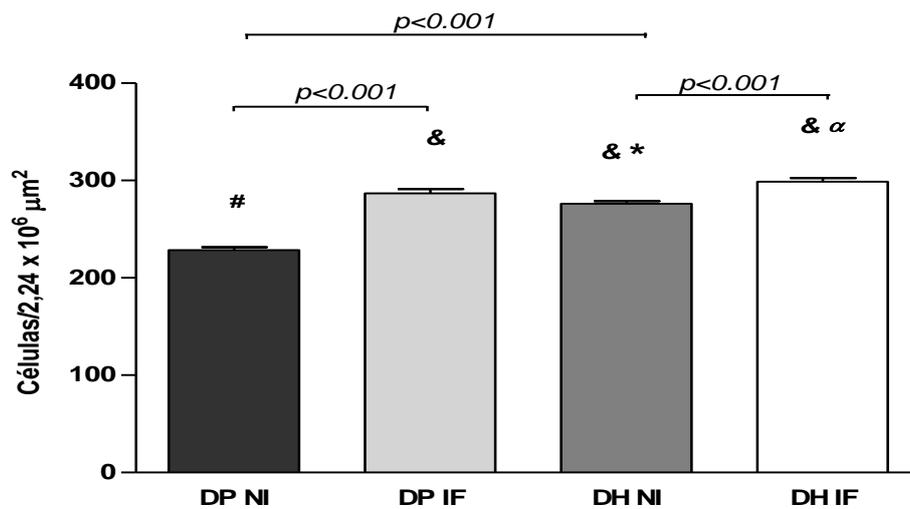
**Gráfico 6:** Níveis de glicose avaliados cineticamente no soro dos animais controles não infectados e alimentados com dieta padrão (NI-DP) ou dieta hiperlipídica (NI-DH) e no soro dos animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e alimentados com dieta padrão (IF-DP) ou dieta hiperlipídica (IF-DH). Os dados apresentados foram mensalmente mensurados durante um período total de 90 dias de avaliação.

Para avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica na lesão do miocárdio, uma análise quantitativa da inflamação no tecido do músculo cardíaco foi realizada no 90º dia após a infecção e, ao mesmo tempo, os níveis de citocinas inflamatórias TNF-alfa foram medidos no soro. A dieta hiperlipídica ofertada aos animais infectados após 90 dias de infecção levou a uma produção significativamente maior de TNF-alfa ( $35,89 \pm 33,28 \text{ pg / mL}$ ) em comparação com o grupo de controle alimentado com dieta padrão ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças nos níveis de TNF-alfa entre os animais infectados com dieta padrão ( $13,88 \pm 3,90 \text{ pg / mL}$ ) em comparação com os controles alimentados com dieta padrão ( $6,24 \pm 4,39 \text{ pg / mL}$ ) ou dieta hiperlipídica ( $9,09 \pm 5,54 \text{ pg / mL}$ ) (Gráfico 7).

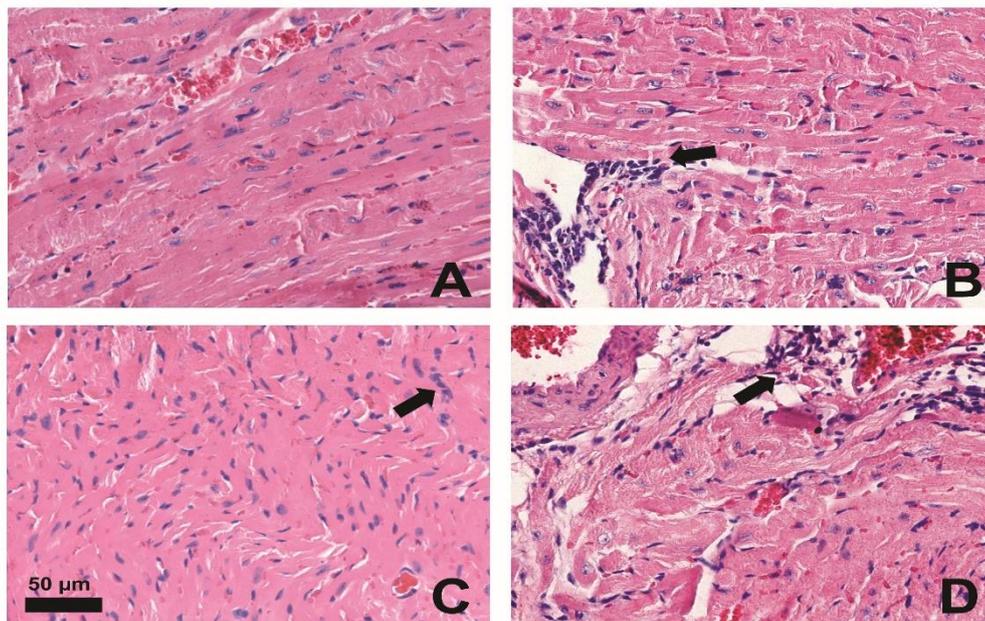


**Gráfico 7:** Níveis séricos de fator de necrose tumoral alfa medidos no 90 ° dia após a infecção em camundongos suíços inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas da cepa Berenice-78 *T. cruzi*, bem como para animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão. NI-DP: animais não infectados alimentados com dieta padrão. NI-DH: animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica. IF-DP: animais infectados alimentados com dieta padrão. IF-DH: animais infectados alimentados com dieta hiperlipídica.

A análise do dano do tecido cardíaco corroborou com os achados de TNF-alfa analisados no soro. A dieta hiperlipídica ofertada aos animais infectados levou ao maior número de células inflamatórias mononucleares detectadas no IF-DH ( $298,9 \pm 13,79$ ) em relação a todos os demais grupos: IF-DP ( $286,8 \pm 17,37$ ), NI-DH ( $276,2 \pm 10,41$ ) e NI-DP ( $228,4 \pm 11,60$ ) ( $p < 0,001$ ). Além disso, tanto os grupos infectados (IF-DP e IF-DH) como os animais não infectados alimentados com dieta hiperlipídica (NI-DH) apresentaram mais células inflamatórias no tecido muscular do coração do que os ratos de controle alimentados com dieta padrão (NI-DP) (Gráfico 8).



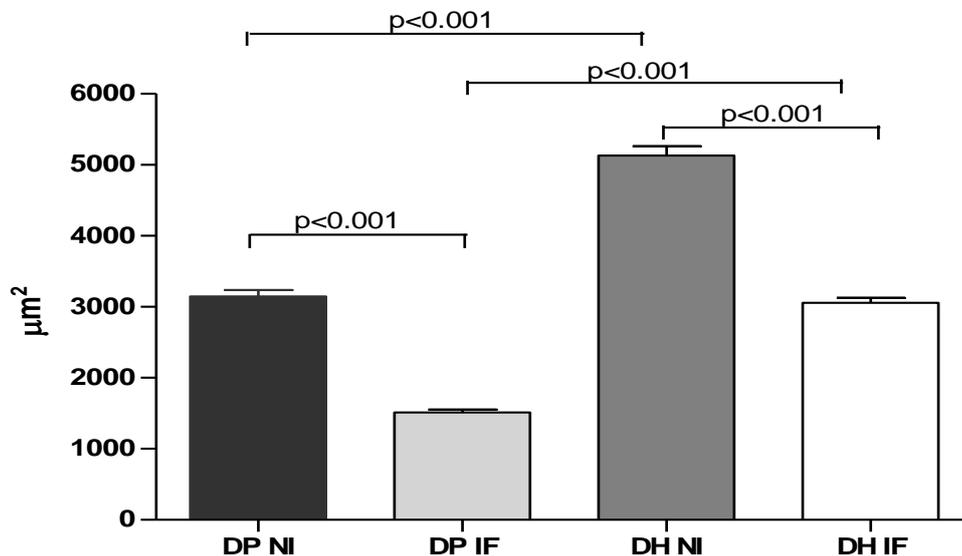
**Gráfico 8:** Intensidade da inflamação no miocárdio na fase crônica dos animais infectados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e alimentados com dieta padrão x dieta hiperlipídica. Resultados com média mais um desvio padrão. DP-NI: dieta padrão e não infectado; DP-IF: dieta padrão e infectado; DH-NI: dieta hiperlipídica e não infectado; DH-IF: dieta hiperlipídica e infectado.



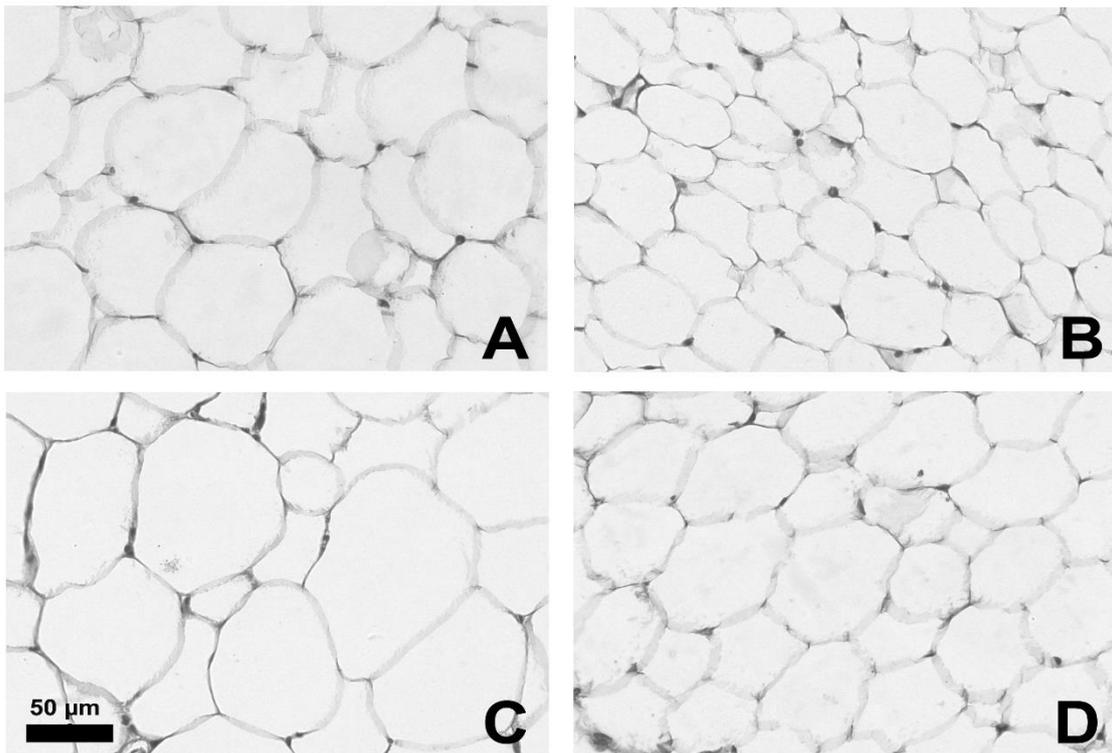
**Figura 3:** Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de animais controles não infectados e de animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica e necropsiados aos 90 dias após inoculação. **A:** DP-NI (animal alimentado com dieta padrão e não infectado); **B:** DP-IF (animal alimentado com dieta padrão e infectado); **C:** DH-NI (animal alimentado com dieta hiperlipídica e não infectado); **D:** DH-IF (animal alimentado com dieta hiperlipídica e infectado).

Para analisar o impacto da dieta hiperlipídica na adipogênese no tecido adiposo branco, que é considerado um órgão secretor de fatores inflamatórios envolvidos na obesidade e síndrome metabólica, o tamanho das células adiposas foi avaliado após

o 90º dia de infecção com *T. cruzi*. A ocorrência de hipertrofia do tecido adiposo foi melhor verificada no grupo infectado e no grupo não infectado que foram alimentados com dieta hiperlipídica (IF-DH e NI-DH) do que nos grupos alimentados com dieta padrão (IF-DP e NI-DP) ( $p < 0,001$ ). Foi possível verificar ainda que a infecção com o *T. cruzi* acarretou em tamanhos menores nas células adiposas tanto entre os grupos alimentados com dieta padrão (IF-DP) quanto naqueles alimentados com dieta hiperlipídica (IF-DH), quando esses foram comparados com os respectivos grupos controles não infectados alimentados com o mesmo tipo de dieta (Gráfico 9 e Figura 4).



**Gráfico 9:** Tamanho das células adiposas mensuradas no tecido adiposo dos animais infectados com ingestão de dieta padrão x dieta hiperlipídica, inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Resultados com média mais um desvio padrão.



**Figura 4:** Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido adiposo de animais controles não infectados e de animais inoculados com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram alimentados com dieta padrão ou dieta hiperlipídica e necropsiados aos 90 dias após inoculação. **A:** DP-NI (animal alimentado com dieta padrão e não infectado); **B:** DP-IF (animal alimentado com dieta padrão e infectado); **C:** DH-NI (animal alimentado com dieta hiperlipídica e não infectado); **D:** DH-IF (animal alimentado com dieta hiperlipídica e infectado).

## 5. DISCUSSÃO

A patogenia da cardiopatia chagásica ainda precisa ser mais elucidada, embora hoje em dia haja mais de 100 anos da ocorrência do primeiro caso humano de infecção por *T. cruzi* descrito em 1909 (CHAGAS, 1909). Considerando a persistência do parasito e a sua variabilidade genética como fator crucial para o dano cardíaco (CALDAS, 2013), avaliou-se a influência de um fator do hospedeiro representado pela dieta hiperlipídica nos achados inflamatórios frequentemente envolvidos na progressão da cardiopatia chagásica.

Utilizou-se um modelo de camundongo *swiss* infectado com a cepa Berenice-78 sensível a benzonidazol para verificar o efeito da dieta hiperlipídica nos parasitos circulantes e seu impacto no dano do tecido muscular cardíaco. A dieta hiperlipídica ocasionou em redução da carga parasitária e foi demonstrado pela redução na área sob a curva de parasitemia diariamente seguida durante todo o estágio agudo da infecção. De acordo com Nagajyothi et al., (2012) os tripomastigotas circulantes podem evadir precocemente do sangue para o tecido adiposo, que é o maior órgão do corpo e consiste em adipócitos, fibroblastos, macrófagos e endotélio (SCHERER, 2006). Os autores também sugeriram em um segundo estudo que *T. cruzi* tem alta afinidade com o colesterol LDL e a proporção de invasão de células do tecido adiposo pode ser maior na presença de níveis elevados desta lipoproteína (NAGAJYOTHI et al., 2014).

As dietas desbalanceadas com consumo excessivo de lipídeos têm sido amplamente utilizadas para induzir obesidade em modelos experimentais, a fim de retratar a ingestão dietética atual, que tem sido considerado um dos principais fatores contribuintes para a forte expansão da obesidade, distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares entre seres humanos (SPEAKMAN, 2007).

As dietas desempenham um papel importante na adipogênese e na homeostase lipídica, sendo que a dieta hiperlipídica é conhecida por alterar o estado metabólico do hospedeiro, levando ao diabetes, síndrome metabólica e obesidade (NAGAJYOTHI, 2012). A dieta hiperlipídica (20% de gordura) ofertada durante 90 dias consecutivos aos animais resultou em aumento significativo no peso corporal de animais não infectados avaliados no presente estudo em comparação com os animais infectados com dieta padrão (4% de gordura). A infecção presente nos animais do grupo IF-DP pode ter desencadeado o aumento da necessidade energética,

contribuindo para que o ganho de peso fosse inferior ao peso médio final apresentado pelo grupo NI-DH constituído por animais que além de não apresentarem o hipercatabolismo e conseqüente aumento da demanda energética que poderiam ser desencadeados pela infecção, eram ainda alimentados com uma dieta de maior fornecimento lipídico e calórico. Segundo Pereira (2003), o hipercatabolismo e conseqüente aumento da demanda energética são alterações metabólicas que ocorrem com a finalidade de preparar o hospedeiro para combater o agente agressor. Por sua vez, a gordura como substrato energético oferece 9kcal/g de energia, e pode propiciar mais facilmente um balanço energético positivo com a conseqüente elevação do peso corporal, caso ela seja armazenada e não seja mobilizada para suprir a demanda metabólica do organismo (SETH et al., 2012). No estudo de Ropelle et al., (2006), ratos alimentados com dieta hiperlipídica (35% de lipídeos) foram comparados a outros que receberam dieta controle contendo 4% de gordura vegetal para as necessidades básicas do organismo. O ganho de peso dos animais alimentados com dieta hiperlipídica foi significativamente maior do que o ganho de peso corporal verificado entre os animais alimentados com a dieta controle. Por outro lado, Kim et al., (2000) não verificaram diferença significativa nos pesos dos ratos sprague-dawley entre os grupos, alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica durante um período de três semanas. A inexistência de padronização com relação ao tempo de manutenção dos animais sob a alimentação com as referidas dietas experimentais, bem como o momento de início dos diferentes tratamentos dietéticos, provavelmente estão associados ao motivo dos discrepantes resultados observados nesses trabalhos (KUSUNOKI et al., 1993). Em adição, destaca-se que as alterações de peso corporal não são os únicos parâmetros que devem ser investigados em modelos experimentais com utilização de dietas hiperlipídicas, uma vez que as alterações no metabolismo lipídico podem ocorrer mesmo na ausência de aumento significativo do peso corporal (NADERALI et al., 2001). O presente estudo mostrou menor ingestão alimentar de dieta hiperlipídica em comparação com a dieta padrão e, curiosamente, revelou o aumento do colesterol total entre os animais alimentados com dieta hiperlipídica, independentemente da presença ou ausência de infecção por *T. cruzi*. Os dados verificados no presente estudo com um consumo alimentar inferior nos animais alimentados com dieta hiperlipídica comparativamente aos animais alimentados com dieta padrão são discordantes de Kim et al., (1998) e Oscai (1987). Segundo Kim et al., (1998), as dietas que apresentam alto teor de gordura estão associadas à

hiperfagia, resultando em um aumento do consumo desses alimentos com elevados teores lipídicos. Similarmente, Oscai (1987) relatou em estudo experimental que o grupo que consumiu dieta hiperlipídica obteve um maior consumo alimentar.

Por outro lado, estudos mais recentes sugerem que dietas ricas em gordura são potencialmente capazes de aumentar a saciedade, uma vez que apresentam diminuição na eficiência alimentar e aumento da eficiência metabólica corroborada pelos altos níveis de substratos metabólicos plasmáticos, como glicose e triglicerídeos (BERNARDES et al., 2004; ZAMBON et al., 2009). Neste sentido, os dados de menor ingestão alimentar verificados no presente estudo entre os animais dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica (NI-DH e IF-DH) estão de acordo com o processo de desencadeamento da elevação da saciedade e consequente redução na ingestão alimentar. Associados a outros fatores, estes dados podem ainda explicar porque durante o consumo de dieta rica em lipídeos este nutriente é capaz de sinalizar uma maior liberação de hormônios relacionados à indução da saciedade (GAIVA et al., 2001). Contudo, a indução de saciedade ocasionada pela ingestão dos nutrientes presentes na dieta hiperlipídica e consequente redução da ingestão alimentar, não é acompanhada pela redução sérica de parâmetros bioquímicos contextualizados na etiopatogenia das doenças crônicas não transmissíveis, obesidade e doenças cardiovasculares.

No presente estudo, verificaram-se níveis séricos mais elevados de colesterol total entre os animais alimentados com dieta hiperlipídica após o 1º mês após a alimentação, independentemente da presença ou ausência de infecção por *T. cruzi*, e não houve diferenças quanto aos demais substratos metabólicos avaliados, glicose e LDL-colesterol. Corroborando com os achados do presente estudo, Almeida et al., (2011) observaram que ratos Wistar alimentados durante oito semanas apresentaram elevação do colesterol total quando comparados ao grupo controle. Segundo Bernardes et al., (2004); Fernandes et al., (2004), os valores séricos de colesterol total podem aumentar após a ingestão de dietas com alta densidade energética oriunda principalmente de teores elevados de lipídeos na composição da mesma. HOEFEL et al., (2011), também demonstraram que ratos alimentados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas apresentaram elevação dos níveis de colesterol total quando comparados aos animais alimentados com a dieta controle. Estudos apontam ainda que quando o consumo de dieta hiperlipídica aumenta os níveis séricos de colesterol total, ocorre elevação dos níveis de ácidos graxos saturados promotores de

hipercolesterolemia e aterosclerose, desse modo corroborando com o risco de desordens cardiovasculares (CHAMPE, 2000). Por sua vez, são escassas as avaliações dos efeitos da elevação de lipídios no organismo hospedeiro, e entre esses a elevação de ácidos graxos saturados, sobre a patogênese da cardiopatia chagásica. Contudo, mesmo diante a tal escassez de estudos principalmente sobre a patogenia das manifestações cardíacas crônicas, Nagajyothi et al. (2014) já demonstraram que a presença do parasito no tecido adiposo causa lipólise e gera alterações nos níveis séricos de colesterol durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Não obstante, a ausência de diferenças nos níveis séricos de colesterol LDL verificado no presente estudo também foi demonstrada por Buettner et al. (2007); Schreyer et al. (2011) onde não encontraram diferenças nos níveis de LDL-c após 12 e 14 semanas de manutenção de ratos Wistar e de camundongos C57BL/6 em dietas com respectivamente 42% e 35,5% de lipídios. Esses dados em conjunto sugerem que talvez possa ser necessário um tempo maior em consumo de dieta rica em gordura saturada para causar elevação dos níveis de LDL-c em animais alimentados com dietas hiperlipídicas. Embora não tenham sido verificadas no presente estudo a ocorrência de elevações significativas de glicose entre os diferentes grupos experimentais ao longo de todo o período de avaliação, alguns outros trabalhos já descreveram a existência de relação entre a elevação dos níveis séricos de glicose induzidos por consumo de dieta hiperlipídica com o aumento do tecido adiposo (BUETTNER et al, 2006; FRALOUB, 2010).

Contudo, o tempo de ingestão dietética hiperlipídica que é necessário para a observação da elevação dos níveis séricos de glicose e aumento do tecido adiposo, ainda necessita de maiores elucidações devido à existência de divergentes resultados na literatura. Hogan et al. (2011) observaram que com 12 semanas de oferta de dieta com 41% de lipídios houve aumento da glicose sanguínea ratos wistar; porém, em outro estudo realizado por Barnea et al. (2006) verificaram diferenças nos níveis glicêmicos entre os grupos experimentais de camundongos da linha C57BL/6J apenas após 20 semanas de alimentação com dieta com 42% de lipídios. Por outro lado, Duarte (2006) e Zanchet (2012), não verificaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea entre os diferentes grupos experimentais alimentados ou não com dieta hiperlipídica, tal como verificado no presente estudo. Duarte (2006) verificou que mesmo após 15 semanas de manutenção experimental de ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica e dieta padrão, não houve diferença significativa

nos níveis de glicose sérica entre os diferentes grupos. No trabalho de Zanchet, 2012 avaliando os parâmetros séricos de glicose de ratos Wistar submetidos a ingestão de dieta padrão e dieta hiperlipídica não encontrou diferença entre os grupos estudados após 7 semanas. Tais divergências demonstraram a limitação da utilização isolada de um único parâmetro bioquímico, como os níveis de glicose sérica, para a avaliação dos efeitos da ingestão de dietas hiperlipídicas sobre o perfil nutricional e alterações metabólicas dos indivíduos. Além disso, a presença de infecção por *T. cruzi* pode levar a absorção de glicose como fonte primária de energia metabólica para células inflamatórias (NAGAJYOTHI, 2014), o que também precisa ser melhor investigado como um fator limitante para o aumento da glicemia em animais alimentados com dieta hiperlipídica verificados no presente estudo.

Para avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica no processo inflamatório cardíaco, as quantidades de células inflamatórias mononucleares foram avaliadas no tecido muscular cardíaco ao mesmo tempo da avaliação dos níveis séricos da citocina TNF-alfa, no 90º dia após a infecção. Curiosamente, os níveis séricos mais elevados de TNF-alfa e as maiores quantidades de células inflamatórias no tecido do miocárdio foram encontrados simultaneamente entre os animais infectados com ingestão de dieta hiperlipídica. A síntese de citocinas inflamatórias de TNF-alfa mostrou-se estimulada pela ingestão de dieta hiperlipídica. Podem observar-se níveis elevados de TNF-alfa também durante infecções parasitárias, uma vez que esta citocina inflamatória está ligada à expressão de moléculas de adesão de leucócitos, que amplifica a cascata inflamatória e combate o microorganismo principalmente na fase aguda das infecções devido a metabolitos que são liberados por macrófagos (PAVANELLI, 2008). Além disso, altos níveis de TNF-alfa levam a uma série de alterações inflamatórias no tecido vascular que aumentam a probabilidade de doença cardiovascular (WINKLER et al., 2003) e também demonstraram estar correlacionadas com a progressão da cardiopatia chagásica (SANTOS et al., 2012).

O presente estudo mostrou níveis mais elevados de células inflamatórias mononucleares no tecido do miocárdio de animais infectados, principalmente nos camundongos infectados com ingestão de dieta hiperlipídica. Destacável, o presente estudo mostrou os valores mais altos de células inflamatórias mononucleares no tecido do músculo cardíaco de animais infectados com dieta hiperlipídica, sugerindo que o padrão da resposta imune do hospedeiro juntamente com a infecção por *T. cruzi* pode corroborar com a patogênese da cardiopatia chagásica. Embora tenham sido

detectados níveis de parasitemia na fase aguda mais brandos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, foi verificado ainda que essa elucidação sanguínea do parasito na fase aguda da infecção não foi capaz de amenizar o processo inflamatório crônico no tecido muscular cardíaco. Segundo Nagajyothi (2014) essa coexistência de redução da parasitemia na fase aguda e persistência do processo inflamatório crônico no miocárdio, podem ser justificadas pelo fato do tecido adiposo vir se revelando como um local preferencial ao início do processo de invasão celular pelo *T. cruzi*.

OLIVEIRA et al. (2007) avaliaram o comprometimento tecidual pela infecção chagásica em ratos *Wistar* machos com 15 e 60 dias de idade alimentados com ração comercial. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com  $10 \times 10^3$  ou  $10 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos, por respectivamente cada animal de 15 ou 60 dias de idade. Foi verificada a ocorrência de intensa reação inflamatória no tecido cardíaco em todos os grupos experimentais, com desagregação celular induzida por edema e presença de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares nos infiltrados inflamatórios,

A inflamação causada pela infecção do *T. Cruzi* culmina em infiltrado inflamatório comprometendo as células cardíacas por graus variáveis, englobando formas discretas, assintomáticas até formas mais graves podendo ocasionar fatalidade devido a perda da função cardíaca. (TALVANI; TEIXEIRA, 2011).

Neste sentido, estudos propõem que a patogênese da miocardite chagásica possa estar diretamente relacionada com a presença do parasito e ao padrão de resposta imune do hospedeiro (PALOMINO, AIELLO, HIGUCHI 2000; OLIVEIRA et al., 2007)

Nos seres humanos com infecções crônicas, a presença do *T. cruzi* claramente não está restringida ao tecido cardíaco. O tecido adiposo também tem sido sugerido como um local de presença do *T. cruzi*. Novas evidências sugerem que a intensidade da infecção pode variar consideravelmente entre os diferentes tecidos infectados pelo parasito e em função do tempo dessa infecção. Tais associações podem variar ainda entre indivíduos infectados pelo parasito, sugerindo-se que hospedeiros com maior quantidade de adipócitos e tecidos ricos em lipídeos possam conter uma carga parasitária mais elevada e precocemente proveniente da evasão sanguínea do parasito na fase aguda. (LEWIS; KELLY, 2016.) Corroborando com o exposto, o estudo de Matos (2011) analisou amostras de tecido adiposo de 10 pacientes com a

doença de Chagas e verificou a presença do DNA do *T. cruzi* no tecido adiposo em três indivíduos.

A submissão de uma ingestão exacerbada em lipídios acarretou em maior inflamação no miocárdio, mesmo diante ao fato da taxa de parasitismo sérico na fase aguda ter sido mais brando em relação aos animais que consumiram dieta padrão. Esse fato corrobora com a possibilidade de que o parasito tenha evadido mais precocemente para o tecido adiposo durante a fase aguda da infecção nos animais infectados que consumiram dieta hiperlipídica em comparação aos animais infectados que consumiram dieta padrão.

A dieta hiperlipídica também levou à ampliação do tecido adiposo branco, principalmente na ausência de infecção por *T. cruzi*. Alguns estudos demonstraram que a hipertrofia de adipócitos implica infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo, o que culmina com o aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias e do processo inflamatório crônico de baixa intensidade (GALIC et al., 2010; HEBER, 2010). Estes estudos estão de acordo com os dados atuais dos altos níveis séricos de citocinas inflamatórias TNF-alfa e células inflamatórias mononucleares no miocárdio de animais infectados com *T. cruzi* alimentados com dieta hiperlipídica.

## 6. CONCLUSÃO

As análises gerais dos dados no presente estudo permitem concluir que o consumo da dieta hiperlipídica possibilitou uma menor ingestão alimentar, entretanto, mesmo com a ingestão reduzida o consumo da dieta hiperlipídica acarretou em uma maior hipertrofia do tecido adiposo e colesterol sérico. A ocorrência da diminuição da parasitemia na fase aguda da infecção não diminuiu o processo de inflamação no tecido muscular cardíaco e a elevação nos níveis de citocina pró-inflamatória.

São necessários futuros estudos que abranjam a avaliação da função cardíaca e a detecção da presença do parasito no coração e nas células adiposas para maiores elucidações dos efeitos de uma ingestão lipídica elevada sobre o prognóstico e evolução da cardiopatia chagásica crônica no indivíduo infectado pelo *T. cruzi*.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALIBERTI JCS, SOUTO JT, MARINO APMP et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferonand- tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology* v. 158, p. 1433, 2001.
- ALMEIDA, M. E. F. et al. Efeitos do estresse auditivo e da dieta hipercalórica sobre o peso corporal, lipídios e glicemia de ratos Wistar. *Alimentos e Nutrição*, v. 22, n. 3, p. 359-365, 2011.
- ANDRADE, A.L.; ZICKER, F. Chronic malnutrition and *Trypanosoma cruzi* infection in children. *J. Trop. Pediatr.* v.41, p.112-115, 1995.
- ANDRADE, A.L.S.S., F. ZICKER, R.M. OLIVEIRA, S.A. SILVA, A. et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.*, v.348, p.1407–1413, 1996.
- ATTIE AD, SCHERER PE Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Res* v.5, p. 5395-5399. 2009.
- BARNEA M, SHAMAY A, STARK A. H, MADAR Z. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin, 2006.
- BERNARDES, D. et al. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras de Educação Física e Esporte*, v. 18, n. 2, p. 191-200, 2004.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas Cardiomyopathy – Where Do We Stand After a Hundred Years? *Progress Cardiovascular Diseases*, v.52, p.300-316, 2010.
- BOYCE HW, BAKNEET MR. SIALORRHEA: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. *J Clin Gastroenterol.*; v. 39(2), p.89-97, 2005.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop.* v.4, p.389-396, 1962.
- BUETTNER R, PARHOFER K.G, WOENCKHAUS M, WREDE C.E, KUNZ-SCHUGHART L.A, SCHOÖLMERICH J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* v.36, p.485-501, 2006.
- BUETTNER R, SCHOÖLMERICH J, BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* v.15 p. 798-808, 2007.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *gen.*, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.

CHAMPE, P. C. Harvey, R. A. BIOQUIMICA ILUSTRADA 2. Ed. Porto Alegre. Artmed, 2000

CLAYTON J. Chagas disease 101. *Nature*. v. 5, 2010.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.102(1), p.113-122, 2007.

COURA JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions: a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110(3), p. 277-282, 2015.

DESPRES JP, LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006.

DESRUISSEAU, M.S.; NAGAJYOTHI, TRUJILLO, M.E.; TANOWITZ, H.B.; SCHERER, P.E. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect. Immun.*, v.75(3), p.1066-1078, 2007.

DHIMAN M, WAN X, POPOV V.L, VARGAS G, GARG N.J MnSODtg micecontrol myocardial inflammatory and oxidative stress and remodeling responseselicited in chronic Chagas disease. *J Am Heart* v. 2 p.302, 2013.

DIÓGENES. C. J. Estudo da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas coronarianas dependentes de apoliproteína-E. 2012.

DUARTE A C G O, et al. Dieta hiperlipídica e a capacidade excretora de insulina em ratos. *Rev de Nutrição*. v. 19, n.3,p.341- 348, 2006.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DÂMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* v. 20, p. 218-224. 2004.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, v. 115, n. 5, p. 911-9, 2005.

FEDERICI E. E, ABELMANN W. H, NEVA F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 13, p. 272-280, 1964.

FERNANDES, A. A. H. et al. Influência da dieta hipercalórica sobre parâmetros bioquímicos séricos, hepáticos e cardíacos em ratos. *Revista Nutrição em Pauta*, v. XII, n. 65, p. 43-50, 2004.

FERREIRA et al. Transmissão oral da doença de chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a vigilância sanitária. *Vig Sanit Debate*. v. 2, n. 4, p.4-11, 2014.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.J.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHANE- NETO, E. Increased Plasma Levels os Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Asymptomatic/

“Indeterminate” and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98(3), p.407-411, 2003.

FOSTER-SCHUBERT KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev*. 2006.

FREITAS R W J F et al, Análise do perfil lipídico de uma população de estudantes universitários. *Rev. Latino Am Enfermagem* v. 21(5), 2013

GAÍVA M.H.G.; COUTO R.C.; OYAMA L.M. COUTO G.E., SILVEIRA V.L., RIBEIRO E.B. et al. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr* v. 86(3), p. 371-377, 2001.

GALIC S, OAKHILL JS, STEINBERG GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*.v. 316 (2), p. 129-139, 2010.

GOTO, R L. Efeito da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias na infecção experimental em camundongos Balb/c infectados pelo *Trypanosoma cruzi* / – Dissertação de mestrado, Botucatu , 2012.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, Maryland Heights, v. 37, n. 3, p. 753-68, Set. 2008.

HEBER D. An integrative view of obesity. *Am J Clin Nutr*. v. 91(1), p. 280, 2010.

HIDRON, A.I.; GILMAN, R.H.; JUSTINIANO, J. et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transmission. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.4(5), p. 688, 2010.

HOEFEL A. L. et al. The effects of hipercaloric diets on glucose homeostasis in the rat: influence of saturated and monounsaturated dietary lipids. *Cell Biochemistry and Funtion*. V.29, n. 7, p. 569- 576, 2011.

HOGAN S, CANNING C, SUN S, SUN X, KADOUH H, ZHOU K. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a western high fat diet. *J Agric Food Chem*. v. 59, p. 3035-3041, 2011.

IQBAL R, ANAND S, OUNPUU S, ISLAM S, ZHANG X, RANGARAJAN S, et al. Dietary Patterns and the Risk of Acute Myocardial Infarction in 52 Countries Results of the INTERHEART Study. *Circulation*. 2008;118(19):1929-37.

KIM CH, YOUN JH, PARK JY, HONG SK, PARK KS, PARK SW, et al. Effects of high fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol*. v.278(6), p.977-984, 2000.

KIM EM, WELCH CC, GRACE MK, BILLINGTON CJ, LEVINE AS. Effects of palatability-induced hyperphagia and food restriction on mRNA levels of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *Brain Res*. v.806 (1), p.117-121, 1998.

KUSUNOKI M, STORLIEN L. H, MACDESSI J, OAKES N.D, KENNEDY C, CRISHOLM D.J, et al. Muscle glucose uptake during and after exercise is normal in insulin-resistant rats. *Am J Physiol.* v.264(27) p. 167-172, 1993.

LEWIS M.D, KELLY J. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease Trends in Parasitology, 2016.

MACEDO, H.S., JUNIOR, O.M. Distribuição de vetores da doença de Chagas em nível domiciliar: um estudo na zona rural de Uberlândia. *Caminhos da Geog, Minas Gerais.* v.3, p. 50-66, 2004.

MARTINS-MELO, F.R.; RAMOS-JUNIOR, A.N.; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.45(5), p.591-596, 2012.

MATOS F.A.V. et al. Evidência para trypanosoma cruzi no tecido adiposo na doença de Chagas cônica humana. *Micróbios Infect.* v.13, p. 1002-1005, 2011.

MEYER, L.K.; CIARALDI, T.P.; HENRY, R.R.; WITGROVE, A.C.; PHILLIPS, S.A. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*, v.2(4), p.217-226, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Doença de Chagas. In: MS, E. (Ed.). *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª edição. Brasília-DF, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). *Epidemiologia de Doença de Chagas .2007-2010*. MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 401-404, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol.* V. 46(21), p. 1-9, 2015.

MOREIRA. L. F. Tropismo tecidual dos genótipos principais de Trypanosoma cruzi em camundongos BALB/c com infecções mistas, não tratados e tratados na fase aguda da infecção, avaliados pela técnica de LSSP-PCR. Dissertação de mestrado, UFOP, Ouro Preto. 2009.

NADERALI, E. K. et al. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clinical Science*, v. 100, n. 6, p. 635-641, 2001.

NAGAJYOTHI F, WEISS LM, SILVER DL, DESRUISSEAU MS, SCHERER PE, ET AL. Trypanosoma cruzi utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* v. 5, p. 953, 2011.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M.S.; WEISS, L.M.; CHUA, S.; ALBANESE, CH; MACHADO, F.S.; ESPER, L.; LISANTI, M.P.; TEIXEIRA, M.M.; SCHERER, P.E.; TANOWITZ, H.B. Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104(1), p.219-225, 2009.

NAWROCKI A. R, Scherer P. E. The adipocyte as a drug discovery target. *Drug Discov Today* v.10, p.1219-1230, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Tripanossomíase Americana. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, ed. 3º, p. 1266 – 1267, 2006.

OLIVEIRA K. M et al Alterações teciduais agudas induzidas em ratos *Wistar* por *trypanosoma cruzi* . *Rev eletrônica de farmácia*. v. 5(1), p. 86-94 .2007.

ORGANIZACIPÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas em las Américas, Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425, 2006.

OSCAI LB, MILLER WC, ARNALL DA. Effects of dietary sugar and of dietary fat on food intake and body fat content in rats. *Growth* .v 51(1), p.64-73, 1987.

PALOMINO S. A, AIELLO V. D, HIGUCHI M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol* v.94, p. 571-579. 2000.

PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*, v.60, p.49-54, 1997.

PEREIRA P.C.M, MEIRA D.A. Nutrição e Infecção. In: INTERLIVROS (Ed.). *Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas*. Rio de Janeiro, p.29-32, 1991.

POLLYANNA A. S. et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance *Arq Bras Endocrinol Metab*. v.57, 2013

PONTES V.M.O, SOUZA A. S Jr, Cruz FMT, et al. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceara. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 43(2), p.182-187, 2010.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v.1, p.92-100, 2001.

RAJALA M. W, SCHERER P. E. Minireview: the adipocyte at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology* v. 144, p. 3765-3773, 2003.

RASSI A. Etiological treatment of Chagas' disease .*Arq Bras Cardiol*. v. 8(4), p. 277-81, 1982.

REIS BZ, TEIXEIRA PDS, VIEIRA DAS, COSTA JO, COSTA D, RAPOSO OFF, MENDES-NETTO RS. Associação de medidas antropométricas para diagnosticar a obesidade em mulheres usuárias de um programa de atividade física regular "Academia da Cidade", Aracaju, Se. *Rev Scient Plena*. v.7(9), p.1-8, 2011.

ROCHA, M.O.C.; RIBEIRO, A.L.P.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* v.8, p. 44-54, 2003.

RODRIGUES C J, CASTRO SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. v. 9 n°.1p. 3-24, 2002.

ROPELLE E.R, PAULI J.R, PRADA P.O, SOUZA C.T, PICARDI P.K, FARIA M.C, *et al.* Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol.* v. 577(3), p. 997-1007, 2006.

ROSINI T.C , SILVA A.S.R., MORAES C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. *Rev Assoc Med Bras.*v.58(3)p. 383-387; 2012.

SANTOS, F.M.; LIMA, W.G.; GRAVEL, A.S.; MARTINS, T.A.F.; TALVANI, A.; TORRES,R.M.; BAHIA, M.T. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.(67), p.1987–1995, 2012.

SCHREYER S.A, WILSON D.L, LEBOEUF R.C. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis.* v.13, p. 17-24.1998.

SETH D, GARMO H, WIGERTZ A, HOLMBERG L, HAMMAR N, Jungner I, *et al.* Lipid profiles and the risk of endometrial cancer in the Swedish AMORIS study *Int. J Mol Epidemiol Genet.* v.3(2), p.122-33, 2012.

SKURK, T.; ALBERTI-HUBER, C.; HERDER, C.; HAUNER, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, v.92, p.1023-33, 2007.

TAFURI W.L, BRENER Z. Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na fase crônica da tripanossomíase *cruzi* experimental. *Rev Inst. Med. Trop.* v. 8, p. 177-183, 1966.

TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.

TALVANI A., TEIXEIRA M.M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol.* v.76, p. 171-194, 2011.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.*, v.31, p.550-554, 2001.

VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96(7), p. 1005-1011, 2001.

VERONESI R, FOCACCIA R. Doença de Chagas. In: Tratado de Infectologia. 2ª edição. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Editora atheneu, 2002

WEYER, C.; FOLEY, J.E.; BOGARDUS, C.; TATARANNI, P.A.; PRATLEY, R.E. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, v.43, p.1498-1506, 2000.

WHO/TDR – World Health Organization – Special Programme for Research and Training in Tropical Disease, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (US). Control of Chagas disease. In: (Ed.). Control of Chagas disease-Second report of the WHO Expert Committee. 2002; p.109

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Over weight and Obesity*. 2011.

ZAMBON L, DUARTE FO, FREITAS LF, SCARMAGNANI FRR, DÂMASO A, DUARTE ACGO, et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev Nutr*. v. 22, p. 707-715, 2009.

ZANCHET E.M. The ad libitum diet versus health of Wistar rats. *Rev. Acad., Ciênc.Agrár. Ambient*. v. 10, n. 3, p. 311-316. 2012.

**ANEXO**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos impactos da obesidade e da arginina na evolução da cardiopatia chagástica em camundongos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*. ", Protocolo nº43/2015, sob a responsabilidade de Fabiane Matos dos Santos que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em reunião de 07/08/2015.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2015 Término: Agosto/2017
Espécie/Linhagem	Ratos Swiss
Nº de Animais	Experimento Piloto: 16 M Protocolo Experimental: 48 F Total: 64
Peso/Idade	Peso: 20g Idade: 30 dias
Sexo	Ambos
Origem	Mamíferos (Pertencentes a ordem dos roedores)

  
Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA / UFES

Vitória (ES), 7 de agosto 2015.