



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIA ISABEL LOVO MARTINS

**IMUNOMODULAÇÃO POR PUFAs *n*-3 DURANTE A FASE  
AGUDA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

---

Londrina  
2012

MARIA ISABEL LOVO MARTINS

**IMUNOMODULAÇÃO POR PUFAs *n*-3 DURANTE A FASE  
AGUDA DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho.

Londrina  
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L911i Lovo-Martins, Maria Isabel.  
Imunomodulação por PUFAs *n*-3 durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* / Maria Isabel Lovo-Martins. – Londrina, 2012.  
79f. : il.

Orientador: Phílano Pingé Filho.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Chagas, Doença de. – Teses. 3. Leucopenia – Teses. 4. Óxido nítrico – Teses. 5. Óleo de peixe – Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 7. Patologia experimental – Teses. I. Pingé Filho, Phílano. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

MARIA ISABEL LOVO MARTINS

**IMUNOMODULAÇÃO POR PUFAs *n*-3 DURANTE A FASE AGUDA DA  
INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucy Megumi Yamauchi Lioni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de agosto de 2012

**APOIO FINANCEIRO**

CAPES

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA – Edital Universal processo nº 8427

Ao meu querido marido, Gabriel,  
companheiro de todas as horas e grande  
amor da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente e por preparar e guiar com tanto carinho tudo o que acontece na minha vida. Obrigada por ouvir minhas orações e me mostrar que existe um tempo para cada coisa.

Ao meu marido, Gabriel Pereira, que acreditou nos meus sonhos e me apoiou, mesmo que para isso tivéssemos que ficar longe um do outro. Obrigada pela sua compreensão, paciência e pelo seu amor.

A minha mãe, Maria Augusta, por sempre acreditar que era possível, me incentivando a buscar meus objetivos, e sem nunca negar ajuda. Ao meu pai, João Batista, por me apoiar e comemorar cada vitória minha. Ao meu irmão Luis Antonio, amigo por opção, pelas nossas conversas, risadas e por colocar meu pé no chão quando necessário. E a toda minha família, que é tão especial.

Ao Professor Phileo Pinge Filho, por dividir comigo não só o seu laboratório, mas principalmente por dividir seus conhecimentos, contribuindo de forma imensa ao meu crescimento científico e profissional. Também à Professora Marli Martins Pinge, que junto ao professor Phileo sempre tiveram palavras de carinho, fé e esperança, tornando o ambiente de trabalho uma segunda casa.

Às queridas amigas e colegas de trabalho Rosiane V. da Silva, Aparecida D. Malvezi e Vera L. H. Tatakihara, que me receberam de forma muito carinhosa e com quem aprendi muito. Obrigada pelo carinho e disponibilidade que sempre tiveram. Também à amiga e colega Nágela G. Zanluqui, que sempre que necessário aceitou o desafio de desbravar novos caminhos. Mas acima de tudo, agradeço a vocês pela amizade.

Aos amigos e colegas de laboratório Clóvis Kumagai, Isadora Zanzarini e Amanda Ortigossa, com quem partilhei vários momentos e que me ajudaram de diversas maneiras.

As amigas Fernanda e Vanessa que começaram junto comigo esse caminho, com muito estudo, e que sempre estiveram disponíveis para ajudar e conversar.

Aos meus sogros, Clóvis e Thais, e sua família, pelas orações, carinho e apoio.

As minhas amigas Hellen de Oliveira, Renata Sonomura, Flávia Vargas, Izabella Almeida e Tamiris Nobre, pela amizade. Mesmo estando distante nosso carinho é o mesmo. Obrigada por acreditarem em mim. E também a todas outras amigas que trago com carinho no coração, e que tornam a minha vida mais feliz.

Aos técnicos Jesus (Zui), Ediel e Adernaldo por muitas vezes terem me ensinado e ajudado.

*“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.”*

*Albert Einstein*

LOVO-MARTINS, Maria Isabel. **Imunomodulação por PUFAs *n*-3 durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi***. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

Estudos realizados em camundongos revelaram que a suplementação de animais com ácidos graxos polinsaturados *n*-3 (PUFAs) alivia a inflamação e pode reduzir a resistência às doenças infecciosas. A modulação da resposta imune por PUFAs *n*-3 ocorre por meio da alteração da composição e função das membranas de células do sistema imunológico, modificação no padrão de eicosanóides e citocinas produzidas por essas células, regulação da expressão gênica e diminuição da proliferação de linfócitos T. O presente trabalho investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe sobre o curso da infecção por *Trypanosoma cruzi*, o agente causal da doença de Chagas. A infecção por *T. cruzi* em humanos e em modelos animais cursa com ativação do sistema imunológico e com alterações hematológicas no sangue periférico e medula óssea. Camundongos C57BL/6 foram suplementados por gavagem com tampão fosfato salina como controle; óleo de milho como fonte de PUFAs *n*-6; ou óleo de peixe como fonte de PUFAs *n*-3. Os camundongos foram divididos em dois grupos: não infectados e infectados intraperitonealmente com  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Cepa Y). A suplementação continuou até o fim do experimento. A suplementação com óleo de peixe resultou no aumento na massa ( $p < 0,01$ ) e na celularidade do baço ( $p < 0,05$ ), além de aumentar a celularidade da medula óssea ( $p < 0,05$ ). Camundongos suplementados com óleo de peixe e infectados apresentaram tendência a uma menor perda de massa corpórea decorrente da infecção em relação a camundongos infectados e suplementados com PBS. A parasitemia dos camundongos suplementados com óleo de peixe apresentou-se maior no 7º dia pós infecção ( $p < 0,001$ ), mas, surpreendentemente, esses animais apresentaram uma contagem de plaquetas ( $p < 0,01$ ) e leucócitos ( $p < 0,001$ ) maior em relação aos animais controles infectados. Além disso, observamos diminuição do parasitismo cardíaco ( $p < 0,01$ ) e da produção de óxido nítrico no plasma ( $p < 0,05$ ) e no tecido cardíaco ( $p < 0,05$ ). Contudo, houve aumento na produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) por células esplênicas estimuladas com o antígeno do parasito. Dessa forma, demonstrou-se que a suplementação com óleo de peixe reduziu as alterações decorrentes da infecção aguda experimental por *T. cruzi*. Testes clínicos precisam ser conduzidos para determinar se os efeitos benéficos da suplementação com PUFAs *n*-3 visto em camundongos podem ser extrapolados para humanos chagásicos em terapia.

**Palavras-chave:** Doença de chagas. Trombocitopenia. Leucopenia. Óleo de peixe. Óxido nítrico. TNF- $\alpha$ .

LOVO-MARTINS, Maria Isabel. **Immunomodulation by *n-3* PUFAs during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.** 2012. 79f. Master Thesis (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

In studies in mice, long-chain *n-3* polyunsaturated fatty acids (PUFAs) supplementation alleviates inflammation and can reduce resistance to infectious disease. The modulation of immune response by *n-3* PUFAs occurs by changing the composition and function of cell membranes of the immune system, modification of the standard eicosanoids and cytokines produced by these cells, regulation of gene expression and reduced proliferation of T lymphocytes. The present study investigated the effect of supplementation with fish oil over the course of *Trypanosoma cruzi* infection, the causative agent of Chagas disease. *T. cruzi* infection in humans and in animal models occurs with activation of the immune system and hematologic changes in peripheral blood and bone marrow. C57BL/6 mice were supplemented by gavage with phosphate buffer saline as a control, corn oil as a source of *n-6* PUFAs, or fish oil as a source of *n-3* PUFAs. The mice were divided into two groups: non-infected and infected intraperitoneally with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Supplementation continued until the end of the experiment. Supplementation with fish oil resulted in an increase in mass ( $p < 0.01$ ) and the cellularity of the spleen ( $p < 0.05$ ), and to increase bone marrow cellularity ( $p < 0.05$ ). Mice supplemented with fish oil and infected had showed a tendency for a lower body mass loss due to infection compared to mice infected and supplemented with PBS. The parasitemia of mice supplemented with fish oil was higher on day 7 post-infection ( $p < 0.001$ ), but surprisingly, these animals showed a platelet count ( $p < 0.01$ ) and leukocytes ( $p < 0.001$ ) higher compared to control animals infected. Furthermore, we observed a decrease in cardiac parasitism ( $p < 0.01$ ) and on production of nitric oxide in the plasma ( $p < 0.05$ ) and cardiac tissue ( $p < 0.05$ ). However, there was increased production of TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) by spleen cells stimulated with the antigen of the parasite. Thus, it was shown that supplementation with fish oil reduced changes due to acute experimental infection by *T. cruzi*. Thus, it was shown that supplementation with fish oil reduces changes in experimental acute infection by *T. cruzi*. Clinical trials must be conducted to determine if the beneficial effects of *n-3* PUFAs supplements seen in mice can be translated to chagasic humans undergoing therapy.

**Keywords:** Chagas' disease. Thrombocytopenia. Leukopenia. Fish oil. Nitric oxide. TNF- $\alpha$ .

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Aminoguanidina
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CDC	“Center for Disease Control and Prevention”
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
DC	Doença de Chagas
DHA	Ácido Docosaheptaenóico
DTU	“Discrete typing units”
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
IFN- $\gamma$	Interferon Gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LA	Ácido $\alpha$ -linolênico
L-NAME	N-nitro-L-arginina-metil-ester
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NK	“Natural Killer”
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões Moleculares Associadas ao Patógeno
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores do Peroxisoma.
PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TLR	Receptores do Tipo <i>toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
WHO	“World Health Organization”
PBS	Solução Tampão Fosfato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.2	DOENÇA DE CHAGAS HUMANA.....	15
1.3	DOENÇA DE CHAGAS NO MODELO MURINO.....	19
1.4	MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E PUFAS.....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	44

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um parasito hemoflagelado da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* causador da doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana (CHAGAS, 1909).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (revisado por TYLER & EGMAN, 2001), passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no hospedeiro invertebrado que pertence à classe Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, gêneros *Triatoma spp.*, *Panstrongylus spp.*, e *Rhodnius spp.* As principais espécies transmissoras de *T. cruzi* no Brasil são *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (DE SOUZA, 1984; TOLEDO et al., 1997).

As formas evolutivas de *T. cruzi* são classificadas de acordo com a emergência do flagelo e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (DE SOUZA, 1984). 1- Formas epimastigotas: flagelo e cinetoplasto localizados anteriormente ao núcleo, presentes apenas no tubo digestivo do vetor e em meio de cultivo axênico; 2- Formas tripomastigotas: flagelo e cinetoplasto localizados posteriormente ao núcleo, são as formas infectantes presentes no sangue do hospedeiro vertebrado e em culturas de células; 3- Formas amastigotas: são as formas proliferativas no interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células, com pequeno flagelo; e 4- Formas esferomastigotas: encontradas no estômago do vetor (BRENNER, 1973; TYLER & EGMAN, 2001).

Devido às variações existentes em relação à severidade das infecções por *T. cruzi*, foram propostas diversas classificações filogenéticas (MOMEN, 1999; ZINGALES et al., 2009) baseadas em marcadores enzimáticos e no DNA presente no cinetoplasto (DEVERA, FERNANDES & COURA, 2003). Foram descritas duas linhagens genéticas principais denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, geneticamente heterogêneas (FERNANDES et al., 1999). Atualmente, admite-se a existência de seis unidades discretas de identificação do protozoário *T. cruzi*, denominadas DTU (“Discrete typing units”), recentemente revisado por Zingales e colaboradores (2012). Estudos indicam que a infecção humana deve-se ao grupo II (cepas CL

e Y) (GAUNT & MILES, 2000), enquanto o grupo I (cepas F, Tulahen, M226, Sylvio-X10, Dm28c, Dm30 e Guafitas) predomina no ciclo silvestre do parasito (RISSO et al., 2004).

Inicialmente, a infecção por *T. cruzi* era transmitida na natureza através do ciclo silvestre entre triatomíneos e mamíferos, mas devido à ocupação predatória do ambiente silvestre pelo homem transformou-se em uma antroponose, onde o homem e os animais domésticos constituíram o ciclo doméstico e peridomiciliar do parasito (FORATTINI, 1980; MONCAYO, 1992; TEIXEIRA et al., 2001).

O ciclo biológico de *T. cruzi* tem início quando o vetor adquire o parasito durante o repasto sanguíneo através da ingestão de sangue do homem ou hospedeiro vertebrado infectado contendo as formas tripomastigotas infectantes. A picada do inseto é indolor e permite que o mesmo se alimente com aproximadamente 0,5 mL de sangue (LANA & TAFURI, 2005). No estômago do vetor, ocorre a transformação destas formas em esferomastigotas e epimastigotas, que migram para o intestino, aderindo à superfície epitelial e multiplicando-se. Ao atingirem o reto, transformam-se em tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto triatomíneo (GARCIA, GONZALEZ & AZAMBUJA, 1999). O ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado tem início quando o vetor elimina formas tripomastigotas nas fezes e urina durante seu repasto sanguíneo no homem e mamíferos. A saliva do inseto contém substâncias que desencadeiam resposta inflamatória no local da picada que provocam sensação de prurido (SOUZA, 2000) e levam o indivíduo a coçar o local, arrastando as fezes contaminadas para o interior da porta de entrada criada na pele.

No hospedeiro vertebrado o parasito invade a célula num processo semelhante à endocitose, formando com a membrana celular o vacúolo parasitóforo (ANDRADE, 2000), evadindo-se da digestão celular em pH ácido pela secreção da proteína formadora de poros denominada Tc-Tox (ANDREWS, 1993; HYBISKE & STEPHENS, 2008) para o citoplasma da célula, onde sofre alterações bioquímicas que permitem sua transformação na forma amastigota citoplasmática (BURLEIGH & ANDREWS, 1995). Inicia-se assim o ciclo de divisão intracelular, com duração de 4 a 5 dias, onde as formas amastigotas multiplicam-se e diferenciam-se em tripomastigotas e, através do processo de ruptura celular, são liberadas para o tecido adjacente e corrente sanguínea, completando o ciclo evolutivo do parasito através da infecção de novas células (SOUZA, 2000). São liberadas aproximadamente 500 formas tripomastigotas por parasito interiorizado inicialmente (DVORAK, 1975).

A lise prematura de algumas células libera formas amastigotas capazes de invadir fagócitos, sobreviver à fagocitose e contribuir para a sustentação do ciclo de vida do parasito (FERNANDES et al., 2006). Estudos realizados em culturas de células revelaram que vários tipos celulares, fagocíticos ou não, podem ser infectados pelas formas tripomastigotas metacíclicas (BURLEIGH & ANDREWS, 1995). Além disso, a utilização de culturas *in vitro* de *T. cruzi* em camadas de células tem permitido o estudo do processo de invasão, replicação e diferenciação do parasito, contribuindo para o entendimento do seu ciclo de vida (BURLEIGH & ANDREWS, 1995). Brenner (1973) identificou que certas cepas do parasito possuem um tropismo pelo tecido cardíaco.

Durante a infecção por *T. cruzi* as formas amastigotas e tripomastigotas se disseminam no hospedeiro mamífero podendo invadir todas as células nucleadas. Neste processo, ocorre adesão do parasito à superfície celular do hospedeiro através da interação com glicoproteínas de superfície, como o ácido siálico retirado do hospedeiro pelas transialidases expressas principalmente pelas formas tripomastigotas sanguíneas (KAHN et al., 1996). O ácido siálico incorporado ao parasito facilita sua interação, reconhecimento e entrada na célula hospedeira, além de inibir a deposição da fração C3b do complemento e o seu reconhecimento do pelos fagócitos (SCHENKMAN et al., 1994). Quando a infecção ocorre através da via oral, o processo de invasão é determinado pela expressão de glicoproteínas de superfície do parasito, como gp82, gp35/50 e gp90, que regulam a capacidade de invasão da mucosa gástrica em cada cepa do parasito (YOSHIDA, 2006; 2008).

O reconhecimento das moléculas de superfície das formas tripomastigotas do parasito (padrões moleculares associadas ao patógeno - PAMPs) ocorre por receptores do tipo *toll-like* do complexo TLR-2, TLR-6 e TLR-4 (GAZZINELLI & DENKERS, 2006), receptores NOD-like, helicases RIG-like (MEYLAN, TSCHOPP & KARIN, 2006) e receptores de manose (KAHN et al., 1996; MEIRELLES et al., 1999) que detectam a infecção e sinalizam entre a resposta imune inata e adaptativa (SABROE et al., 2008; RODRIGUES, OLIVEIRA & BELLIO, 2012).

## 1.2 DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações de baixa renda que vivem em climas tropicais e subtropicais. Vários são os agentes etiológicos dessas doenças, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. A Doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2012).

A Doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é uma antropozoonose amplamente distribuída nas Américas e tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (RASSI et al., 2012). A DC encontra-se distribuída por 18 países, desde o Sul dos Estados Unidos até a Patagônia (CDC, 2010), sendo estimado que 10 milhões de pessoas estejam infectadas e que mais de 25 milhões vivam sob o risco de contrair a doença, principalmente na América Latina. Dados estatísticos indicam que somente no ano de 2008 a Doença de Chagas matou mais de 10 mil pessoas, sendo nesse mesmo ano a soroprevalência da DC em crianças entre 0 e 5 anos da ordem de 1/100.000 (MASSAD, 2008; WHO, 2012).

A DC constitui um sério problema médico-social. A transmissão vetorial ocorre principalmente em áreas rurais ou periurbanas onde prevaleçam condições precárias de habitação que permitam o contato entre o inseto vetor e o ser humano (SCHMUÑIS, 2000; KROPF, 2005). Outras formas de infecção incluem transfusão sanguínea, transmissão congênita, alimentos contendo o inseto (transmissão oral), transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (DIAS, 2006; GIDDINGS et al., 2006).

A história natural da DC caracteriza-se pelo desenvolvimento de três formas clínicas evolutivas: forma aguda, forma latente ou indeterminada e forma crônica (CHAPADEIRO, 1999). A forma aguda inicia-se a partir da picada do inseto até aproximadamente 30 dias após (BLITZMAN, 2007) e caracteriza-se por infecção generalizada por *T. cruzi*, com elevada parasitemia, grandes quantidades de amastigotas intrateciduals, infiltrado inflamatório tecidual abundante e lesão miocárdica intensa (RASSI et al., 2000).

As manifestações clínicas da forma aguda afetam principalmente crianças. A fase aguda apresenta período de incubação de 5 a 14 dias, revelando sintomas inespecíficos de início súbito (febre, calafrios, mal-estar, hepatoesplenomegalia) que nem sempre se

manifestam e dificultam o diagnóstico da fase aguda da DC, impedindo o tratamento farmacológico que é eficaz somente nesta fase (AMATO-NETO, 1998; DIAS, 1999).

Quando a infecção ocorre pela mucosa ocular é possível verificar a presença do sinal de Romaña, lesão caracterizada por reação de hipersensibilidade no complexo oftalmoganglionar. Cerca de 5% dos indivíduos infectados vão a óbito durante a fase aguda por morte súbita, principalmente crianças, devido à falência cardíaca congestiva ou meningoencefalite (BLITZMAN, 2007).

Indivíduos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem uma resposta imunológica eficiente que reduz a parasitemia no sangue e tecidos, podendo permanecer na fase indeterminada ou evoluir cronicamente com sintomas cardíacos ou digestivos.

A forma latente ou indeterminada, que acomete cerca de 60% das pessoas infectadas, caracteriza-se por um período assintomático que inicia semanas após a aquisição da infecção e estende-se com evolução benigna por muitos anos (BLITZMAN, 2007). Estudos longitudinais demonstram que aproximadamente 50% dos indivíduos infectados não apresentam sintomas clínicos (CHAPADEIRO, 1999), sendo que a maioria inexplicavelmente permanece nesta fase pelo resto de suas vidas sem desenvolver a doença (MACEDO, 1999). Pode ainda ocorrer reativação da fase aguda da DC em indivíduos imunossuprimidos, como transplantados ou infectada pelo vírus da imunodeficiência humana (DIAS, 1999).

Após 10 a 30 anos de infecção, ocorrem os sintomas mais severos da doença, onde se observa comprometimento associado do aparelho digestório (10% dos casos) e, principalmente, do tecido cardíaco (13% dos casos), que contribui substancialmente para as altas taxas de morbidade e mortalidade por DC (MAGUIRE et al., 1987; WANDERLEY & LITVOC, 1994; DIAS, 1999), caracterizando a forma crônica da doença.

A forma crônica cardíaca, descrita inicialmente por Chagas e Vilella em 1922, é evidenciada pela cardiomiopatia inflamatória de evolução fatal, acompanhada clinicamente por arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomegalia. Ocorrem lesões no sistema de condução cardíaco, alterações vasculares e lesão apical que contribuem para a destruição progressiva do miocárdio (ANDRADE, 2000).

Os danos cardíacos observados na fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorrem principalmente devido ao rompimento dos ninhos de amastigota teciduais e pela liberação de antígenos que se ligam à superfície celular, a qual se torna alvo dos anticorpos produzidos contra o parasito. Na fase crônica, a auto-imunidade dos linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> é apontada como

causa da destruição cardíaca progressiva, além do envolvimento de diversos fatores como mimetismo molecular, apresentação de antígenos próprios e desregulação da resposta imune (SOARES & SANTOS, 1999).

No acometimento crônico ocorrem alterações anatomopatológicas denominadas “megalias”, como cardiomegalia, megaesôfago e megacólon. O prognóstico da cardiopatia chagásica crônica depende do grau de comprometimento cardíaco, da cardiomegalia e do grau de insuficiência cardíaca, podendo ocorrer óbito por falência cardíaca ou morte súbita por bloqueio na condução do estímulo átrio-ventricular (BLITZMAN, 2007), além da redução da expectativa de vida para aproximadamente 60 anos de idade (MAGUIRE et al., 1987). Mesmo após mais de 100 anos da descoberta da DC, a cardiomiopatia chagásica crônica é descrita como a causa mais comum de miocardite em todo o mundo (MAGUIRE, 2006). A resposta imunológica gerada contra o parasito também promove lesões teciduais, associadas ao processo auto-imune de destruição do tecido cardíaco ou à produção de mediadores inflamatórios contra o parasito e seus antígenos teciduais (GIRONES & FRESNO, 2003). No acometimento crônico do trato digestório, ocorrem alterações caracterizadas por distúrbios de deglutição (megaesôfago) e constipação (megacólon), decorrentes do comprometimento do sistema nervoso entérico, hipertrofia e inflamação teciduais (ANDRADE, 2000).

O tratamento da DC constitui-se basicamente em terapêutica farmacológica específica contra o parasito, particularmente em casos agudos, congênitos, acidentes de laboratório e em casos crônicos de baixa idade e de infecção recente, além do tratamento sintomático durante o curso da infecção crônica (DIAS, 1999; BLITZMAN, 2007).

Existem dois fármacos disponíveis para o tratamento específico da DC, o nifurtimox (Lampit®, Bayer Healthcare) e o benzonidazol (Rochagan®, Roche Pharmaceutical, cuja patente foi doada ao Ministério da Saúde, Brasil), com índice de cura que varia de 30 a 70%, dependendo da cepa do parasito (DIAS, 1999). Entretanto, devido à baixa especificidade da sintomatologia da DC na fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados não se trata a tempo e tornam-se portadores crônicos da doença (AMATO-NETO, 1998; CANÇADO, 2002).

Pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra *T. cruzi* têm sido realizadas utilizando frações de DNA do parasito (FUJIMURA et al. 2001), terapia gênica (GARG & TARLETON, 2002) e tripanossomatídios antigenicamente semelhantes (BASSO et al. 2004), com poucos resultados satisfatórios para ensaios clínicos em humanos.

Em 1991 os governos do Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru concordaram em colaborar com a Iniciativa do Cone Sul, que visava erradicar o principal vetor da DC, *Triatoma infestans*; melhorar as condições de habitação; em adição ao controle da transmissão por transfusão sanguínea. Como resultado o Brasil recebeu em 2006 o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas (BRASIL, 2006; HOTEZ, 2011) com redução de 96% no índice de infecção em crianças de 0 a 14 anos entre 1986 e 1996 (BLITZMAN, 2007). Além disso, em 2008 a transmissão vetorial também foi interrompida no Chile e Uruguai (SCHOFIELD & DIAS, 1999; MASSAD, 2008).

Contudo, apesar dos esforços para eliminação do vetor, novos desafios estão surgindo, como o desenvolvimento de resistência aos inseticidas, a recolonização das casas após a aplicação do inseticida, suprimentos insuficientes de medicamentos tripanocidas, a falta de um consenso sobre a eficiência do benzonidazol e o nifurtimox no tratamento de infecções crônicas, ausência de padrão internacional para o diagnóstico, além da ausência de uma vacina eficaz (HOTEZ, 2011).

Atualmente a principal via de contágio por *T. cruzi* é a infecção oral, respondendo por mais de 50% dos casos agudos da DC na região amazônica, além dos surtos observados em Santa Catarina e no Pará ocorridos devido à ingestão de caldo de cana e açaí, respectivamente, contendo triatomíneos infectado (BRASIL, 2005).

O controle, diagnóstico e tratamento da DC melhorou substancialmente nos últimos anos, mas ainda há muito a ser feito. Existem apenas dois medicamentos disponíveis para o tratamento de pacientes chagásicos e drogas que possam ser mais eficazes e menos tóxicas são necessárias. O *T. cruzi* tem sido alvo de diversos estudos, mas a patogênese da DC não é completamente compreendida. Se a autoimunidade participa no desenvolvimento das lesões cardíacas, o tratamento de pacientes com medicamentos tripanocidas após a fase aguda pode ser inócua. Por outro lado, se a persistência do parasito é o mecanismo patogênico preponderante, a probabilidade de cura de um paciente tratado com drogas anti-*Trypanosoma cruzi* durante a fase crônica, seria aumentada. Em relação a isso, necessitamos urgentemente de novas técnicas que possibilitem a confirmação da cura de pacientes que desenvolveram a fase crônica da DC. Substâncias que possam reduzir substancialmente a carga parasitária, mesmo que sejam incapazes de curar os pacientes, mas suficientes para prevenir ou retardar a progressão da DC devem ser investigadas (RASSI et al., 2012).

### 1.3 DOENÇA DE CHAGAS NO MODELO MURINO

Camundongos infectados por *T. cruzi* apresentam características similares à humanos infectados (COSTA, 1999). Os camundongos apresentam níveis elevados de carga parasitária no sangue e no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção (BRENNER, 1973). Na maioria das vezes, a inoculação é feita pela via intraperitoneal, utilizando-se formas parasitárias tripomastigotas coletadas diretamente do sangue, das fezes do inseto vetor (triatomíneo) ou formas tripomastigotas provenientes de meios de cultivo líquido ou em cultivos de células (ANDRADE, 2008).

A habilidade dos parasitos em sobreviver no hospedeiro depende de uma série de mecanismos envolvendo a relação parasito-hospedeiro, como capacidade de evasão, características do microrganismo e resposta imunológica. A evolução da infecção no modelo murino varia de acordo com a raça, idade, via de inoculação, cepa do parasito utilizada e sexo do hospedeiro (HAUSCHKA, 1974; ROWLAND, LUO & MCCORMICK, 1995; ROGGERO et al., 2002; MALVEZI et al., 2004; ESTEVAM et al., 2012).

As cepas de *T. cruzi* compõem uma população heterogênea, com efeitos biológicos distintos (BRENNER, 1973; ZINGALES et al., 2012). A cepa Y, caracterizada por Silva e Nussenzweig em 1953, é altamente virulenta para algumas linhagens de camundongos (MALVEZI et al., 2004; ESTEVAM et al., 2012). A cepa apresenta tropismo por macrófagos esplênicos, fígado e medula óssea, enquanto outras cepas infectam principalmente tecidos musculares (MELO & BRENNER, 1978).

Desde sua descoberta, a DC tem sido descrita como uma doença causada pelos danos gerados pela resposta inflamatória e imunológica à invasão dos tecidos por *T. cruzi* (COSTA, 1999). O perfil de resistência ou susceptibilidade a *T. cruzi* no modelo murino depende, além das características do parasito, da imunidade inata e adquirida mediada por macrófagos, *natural killers* (NK), células T e linfócitos B (TARLETON, 1995; GAZZINELLI et al., 1998; LIEKE et al., 2006).

Também estão envolvidos na resposta ao parasito citocinas e mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção (ABRAHAMSOHN, 1998; PINGE-FILHO, TADOKORO & ABRAHAMSOHN, 1999; MICHAILOWSKY et al., 2001), com importância evidenciadas através de estudos realizados em camundongos nocautes e pelo

emprego de inibidores farmacológicos de etapas responsáveis pela produção destas moléculas (MALVEZI et al., 2004; KOGA et al., 2006; BORGES, 2007; PAVANELLI et al., 2010; PANIS et al., 2011).

O reconhecimento inato dos parasitos envolve o reconhecimento de PAMPs específicos através dos TLRs presentes nos macrófagos (HARRIS et al., 2006). Logo nas primeiras horas de infecção os parasitos invadem os macrófagos, induzindo uma resposta inata do organismo que desencadeia nas células NK a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), ativando macrófagos que iniciam a produção de citocinas pro-inflamatórias e mediadores com atividade tripanocida (CARDILLO et al., 2002).

O controle do parasitismo na fase aguda da DC depende basicamente da ação de citocinas sobre os macrófagos. Tratamento de macrófagos *in vitro* com citocinas do padrão Th1, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), resultam em morte eficiente das amastigotas intracelulares; já a adição de citocinas do padrão Th2, como o fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10) inibem a ação tripanocida de macrófagos ativados (ABRAHAMSOHN, 1998). As citocinas do padrão Th2 estão associadas à susceptibilidade (SILVA et al., 1998) por possuírem propriedades inibitórias sobre a proliferação de células T, redução da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e maturação de células dendríticas, necessários para a resposta à infecção por *T. cruzi* (TAYLOR et al, 2006).

Durante a primeira semana de infecção, ocorre o estímulo para a produção e proliferação substancial de linfócitos e, ao mesmo tempo em que a IL-2 é produzida, seus receptores são expressos na superfície das células T (IL-2R) e liberados na sua forma solúvel (sIL-2R) (PAKIANATHAN & KUHN, 1992), sob forte influencia de moléculas inflamatórias como os leucotrienos (MARCINKIEWICZ et al., 1997).

Em torno da segunda semana de infecção, ocorre um pico de imunossupressão, onde ocorre baixa produção de IL-2 (KIERZENBAUM, LOPEZ & SZTEIN, 1994) e ausência de respostas proliferativas de linfócitos T frente à mitógenos, mediadas principalmente pela produção de prostaglandinas (PINGE-FILHO, TADOKORO & ABRAHAMSOHN, 1999). Nesta fase, também é relatada a presença de fatores supressores do parasito, como glicoproteínas de membrana, proteínas secretadas pelo parasito e antígenos de superfície (SCHONECK et al., 1994; KIERSZENBAUM et al., 1999).

A produção inicial de IFN- $\gamma$  pelas células NK depende da indução por IL-12 produzida pelos macrófagos (ALIBERTI et al., 1996). O papel da IL-12 no controle da infecção chagásica *in vivo* foi demonstrado através do tratamento de camundongos infectados com anticorpos anti-IL-12, revelando altos níveis de parasitemia e mortalidade em relação aos controles. No mesmo estudo, o tratamento dos animais com anti-IFN- $\gamma$  ou anti-TNF- $\alpha$  inibiu o efeito protetor da administração de IL-12 exógena (SILVA et al., 1998).

A administração de IL-12 em animais infectados leva à redução da parasitemia e queda da mortalidade, mediadas pelo aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , indicando que esta citocina constitui um dos mecanismos de resistência à infecção por *T. cruzi* (HUNTER, SLIFER & ARAÚJO, 1996).

O IFN- $\gamma$  é descrito como a principal citocina mediadora de resistência à infecção por *T. cruzi*, por induzir a ativação dos macrófagos e exercer papel central no controle sobre a carga parasitária através da produção de óxido nítrico (NO) (VESPA, CUNHA & SILVA, 1994; CARDILLO et al., 1996). Um dos mecanismos envolvidos na resistência do hospedeiro induzida por IFN- $\gamma$  na infecção é dependente de TLRs (KOGA et al.; 2006), sendo sua produção inicial durante a fase aguda realizada por células NK (CARDILLO et al., 2002). Também Costa e colaboradores (2006) demonstraram que o interferon do tipo I (INF- $\alpha$  e  $\beta$ ) exerce um importante papel no controle da parasitemia na fase aguda da infecção, sendo este mecanismo mediado pela produção de NO.

O primeiro estudo relatando o papel do TNF- $\alpha$  na infecção por *T. cruzi* foi realizado por Tarleton (1988), onde se demonstrou que o parasito é um potente indutor da produção desta citocina por macrófagos e células esplênicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Posteriormente, o TNF- $\alpha$  foi associado à resistência à infecção por *T. cruzi* (SILVA et al., 1995) e descrito como fator de regulação negativa no processo de hematopoiese e desenvolvimento da anemia observada durante a fase aguda da infecção (MALVEZI et al., 2004).

Outra citocina pró-inflamatória, a interleucina 6 (IL-6), é uma citocina multifuncional que possui propriedades indutoras sobre a síntese de anticorpos em células B, síntese hepática de proteínas de fase aguda e diferenciação de linfócitos T citotóxicos (VAN SNICK, 1990). Estudos demonstram que durante a infecção *in vitro* por *T. cruzi* há produção de IL-6 por células endoteliais (TANOWITZ et al., 1992) e monócitos aderentes (VAN VOORHIS, 1992); *in vivo*, os níveis de IL-6 elevam-se precocemente na fase aguda da

infecção concomitantemente à produção de proteínas de fase aguda nos animais (TRUYENS et al., 1994; CARDONI et al., 1997; PANIS, et al., 2011).

A participação da citocina IL-1 $\beta$  como mediador pró-inflamatório durante a infecção está bastante relacionada ao desenvolvimento da atividade hipertrófica cardíaca em animais infectados por *T. cruzi* tanto nos estágios iniciais como na fase crônica da doença (PETERSEN & BURLEIGH, 2003).

A produção aumentada das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  durante a fase aguda da DC induz nos macrófagos, através das vias JAK/STAT e NF- $\kappa$ B, a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma importante fonte de produção da molécula tripanocida NO (XIE, WHISNANT & NATHAN, 1993). Por outro lado, dentre as citocinas do padrão Th2, o TGF- $\beta$  é descrito como a principal molécula capaz de controlar a produção de NO alterando o mecanismo pós transcricional da iNOS, desestabilizando e acelerando a degradação de seu mRNA, e retardando a síntese da proteína funcional (MACMICKING, XIE & NATHAN, 1997).

O NO tem sido objeto de diversas pesquisas desde a descoberta de seus efeitos biológicos na década de 80 (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). É considerado um radical livre e atua como molécula mensageira em diversos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular e neurotransmissão, através do estímulo da síntese de GMP cíclico (BLOODSWORTH, O'DONNELL & FREEMAN, 2000). Seu envolvimento é descrito em diversas doenças, tanto inflamatórias, como por exemplo o choque séptico, diabetes tipo I e artrite reumatoide; como doenças infecciosas, em processos de agressão e defesa, tais como infecções por *Chlamydia spp.*, entre outros (MORI & GOTOH, 2004).

A produção do NO é catalisada pelas isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), divididas em constitutivas, cálcio-dependentes (cNOS, nNOS ou NOS I, eNOS ou NOS III) e induzível, cálcio independente (iNOS ou NOS II). As NOS oxidam a L-arginina como substrato para produção de L-citrulina e liberação da molécula de NO (BLOODSWORTH, O'DONNELL & FREEMAN, 2000). A molécula de NO é relativamente pequena e apresenta características lipofílicas, permitindo rápida difusão e reação com uma grande diversidade de estruturas biológicas intracelulares, metaloproteínas e outras moléculas de radicais livres (superóxido, radicais alcóxil e peróxil) (MAYER & HEMMENS, 1997).

As NOS estão presentes em células endoteliais vasculares, células cardíacas, plaquetas, células musculares lisas, células neuronais, macrófagos, células NK, fibroblastos e

neutrófilos (MONCADA & HIGGS, 1991; LINDE et al., 2006). A manifestação de efeitos biológicos é dependente da química do ambiente e influenciada pela presença das diferentes espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas: ânion nitroxil, óxido nitroso, cátion nitrosil, ácido nitroso, dióxido de nitrogênio, dinitrogênio tetraóxido, peroxinitrito e cátion nitril, sendo que os principais produtos estáveis do metabolismo do NO são as moléculas de nitrito e nitrato (DENICOLA, SOUZA, RADI & 1998).

A variação nos níveis de NO são capazes de regular ativação e expressão da iNOS e cNOS. Concentrações fisiológicas de NO inibem a transcrição da iNOS através da inativação do NF- $\kappa$ B, mantendo a atividade da cNOS (COLASANTI, et al., 1995; COLASANTI & SUZUKI, 2000). Entretanto, quando os níveis de NO se elevam, as moléculas não são suficientes para manter o NF- $\kappa$ B suprimido, criando condições para superexpressão da iNOS (KANNO et al., 2000).

A indução da expressão do mRNA da iNOS ocorre através da ação do fator de transcrição nuclear kappa (NF- $\kappa$ B) e é mediada por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), processos infecciosos e LPS (KELLY, BALLIGAND & SMITH, 1996; MELDRUM, 1998). A expressão da iNOS dependente de NF- $\kappa$ B via estímulos inflamatórios requer uma inibição inicial da cNOS (PALOMBA et al., 2004), pois a produção de NO constitui um dos mecanismos de resistência à infecção por parasitos intracelulares e, paradoxalmente, contribui para os mecanismos imunopatológicos de diversas doenças (MACMICKING, XIE & NATHAN, 1997). As lesões produzidas pelo NO dependem de sua combinação com outros radicais livres, como o ânion superóxido, produzindo uma espécie altamente reativa denominada peroxinitrito, capaz de ligar-se a estruturas celulares como proteínas e DNA (INOUE & KAWANISHI, 1995).

Estudos utilizando N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) para bloquear a produção de NO via cNOS, demonstraram sua participação como reguladora negativa da migração e adesão leucocitária em modelos de isquemia e reperfusão (KUBES, SUZUKI & GRANGER, 1991), evidenciando seu importante papel na estabilidade endotelial para contrapor a resposta inflamatória inicial (FARREL & BLAKE, 1996).

A participação do NO derivado das NOS constitutivas (cNOs) em processos patológicos é pouco conhecida, tendo sido descrita em modelos de doenças neurológicas (ZHENG et al., 1993). Já a produção de NO derivado da iNOS por macrófagos ativados é descrita como principal mecanismo microbicida em diversas infecções ocasionadas por

patógenos intracelulares, como *Leishmania major*, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (JAMES, 1991).

Durante a infecção por *T. cruzi*, o NO é descrito como o principal mecanismo efetor contra o parasito observado experimentalmente (TALVANI et al., 2002), já que a administração de inibidores da produção de NO (PETRAY et al., 1994) ou utilização de animais nocautes para iNOS (HÖLSCHER et al., 1998; BORGES, 2007) levam ao aumento da parasitemia e redução da sobrevivência dos animais durante a fase aguda da DC.

Um dos principais inibidores empregados com a finalidade de bloquear a produção de NO derivado da iNOS é a aminoguanidina (AG), um fármaco que age preferencialmente sobre esta enzima fazendo uma inibição competitiva. A AG mimetiza a L-arginina, substrato natural das NOS, sendo metabolizada pela enzima em um intermediário altamente reativo que ataca a estrutura enzimática causando sua inativação (LEE et al., 2005). No modelo de infecção por *T. cruzi*, a AG tem sido amplamente empregada para elucidar o papel do NO derivado da iNOS sobre diversos parâmetros envolvidos na infecção, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (VESPA, CUNHA & SILVA, 1994; CUMMINGS & TARLETON, 2004).

A produção de peroxinitrito pelos macrófagos é capaz de levar formas tripomastigotas do parasito à morte e dificultar a motilidade, replicação e metabolismo energético das formas epimastigotas. Além disso, esta molécula é capaz de ocasionar a nitratação de proteínas do parasito, agindo como um mecanismo antiparasitário (NAVILIAT et al., 2005).

Como uma das principais características da DC é a infecção de células-alvo específicas, como os cardiomiócitos, a função normal do tecido cardíaco encontra-se comprometida ao longo da evolução da doença. Após invasão destas células pelo parasito, ocorre a liberação local de citocinas, induzindo a expressão da iNOS e produção de NO, com consequente disfunção cardíaca e cardiomiopatia (FICHERA et al., 2004; LINDE et al., 2006). Observa-se a superexpressão da iNOS nos cardiomiócitos desde o início da infecção e da cNOS nos primeiros 5 dias (CHANDRASEKAR et al., 2000).

Vespa e colaboradores (1994) investigaram a participação do NO no controle da parasitemia e sobrevivência através do bloqueio farmacológico da iNOS em camundongos C57BL/6 e verificaram perda da resistência à infecção por *T. cruzi*, além da ação tripanocida *in vitro* deste mediador. Em contrapartida, Cummings e Tarleton (2004) relataram em seu estudo empregando animais nocautes para iNOS que estes animais apresentaram perfil de

sobrevida semelhante aos animais selvagens e atribuem as diferenças observadas em relação à outros estudos à não especificidade dos bloqueadores de iNOS, que poderiam estar agindo simultaneamente no bloqueio das outras isoformas (também importantes para a produção de NO).

Existem relatos sobre a participação estágio-dependente do NO na DC, indicando que esta molécula só é necessária na fase aguda da infecção (SAEFTTEL; FLEISCHER & HOERAUF, 2001).

A infecção por *T. cruzi* em humanos (MIGUEL et al., 2011) e em modelos animais cursa com alterações hematológicas no sangue periférico e medula óssea, incluindo anemia (CARDOSO & BRENER, 1980; REPKA et al., 1985), sendo que essa anemia pode ser revertida através da administração do medicamento tripanocida nifurtimox (MARCONDES et al., 2000). Além disso, a ocorrência de anemia consiste num marcador que indica a reativação da DC em pacientes receptores de transplante cardíaco (THEODOROPOULOS et al., 2010).

O desenvolvimento da anemia esta associada ao estresse oxidativo em eritrócitos (MALVEZI et al., 2004) e diminuição dos níveis de ferro em camundongos resistentes infectados (ESTEVAM et al., 2012). Além da anemia, também o baixo número de plaquetas, leucócitos e hipoplasia de medula óssea observados na infecção aguda por *T. cruzi* estão relacionados com a mortalidade nessa fase da infecção (MARCONDES et al., 2000; MALVEZI et al., 2004).

#### 1.4 MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E PUFAS

Os ácidos graxos atuam como componentes estruturais das células e são de extrema importância para o metabolismo celular. A compreensão dos mecanismos associados aos benefícios observados com a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) sobre patologias que acometem animais e humanos tem sido o alvo de diversos estudos (CHILDS et al., 2008; RATNAYAKE & GALLI, 2009). A família de ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 (ou ômega-3) é composta de PUFAs que contém de 18 a 22 carbonos. A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico final

da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos *n*-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono (WILEY & SONS, 1979).

Os principais PUFAs *n*-3 são o ácido  $\alpha$ -linolênico (LA) (18:3 *n*3), o ácido eicosapentaenóico (EPA) (20:5 *n*3) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (22:6 *n*3). Os PUFAs *n*-3 são considerados ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser fabricados pelo organismo. Por esta razão os PUFAs *n*-3 devem ser obtidos a partir de alimentos, podendo ser encontrados em peixes, como o salmão, atum, e outras vidas marinhas, como algas, krill, além de certas plantas (CHILDS et al., 2008).

Entre as principais funções dos ácidos graxos destacam-se o depósito de energia e a conformação das membranas celulares, sendo também precursores de substâncias, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (NEURINGER et al., 1986; BELDA & POURCHET-CAMPOS, 1991; LIN et al., 1993; HARRIS, 1999).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos por Kromann e Green, em 1980, mostraram a primeira evidência da relação entre a ingestão de PUFAs *n*-3 e inflamação. Avaliando um período de 25 anos os pesquisadores mostraram que a população de esquimós do distrito de Upernavik, Groelândia, apresentavam baixa incidência de doenças auto-imunes e inflamatórias, como psoríase, asma e diabetes tipo 1, assim como a ausência de esclerose múltipla quando comparada com a população da Dinamarca (SIMOPOULOS, 2002). A principal diferença destacada nesse estudo é a alimentação muito característica dessa população de esquimós, com alta ingestão de peixe em relação às dietas ocidentais comuns.

Os peixes são a principal fonte dos PUFAs *n*-3 EPA e DHA, especialmente os peixes oleosos. A quantidade de PUFAs *n*-3 nos peixes varia conforme a espécie. O salmão, por exemplo, é uma rica fonte com aproximadamente 2,2g de PUFAs *n*-3 a cada 100g, enquanto que o bacalhau contém aproximadamente 300mg de PUFAs *n*-3 a cada 120g (CHILDS et al., 2008). O reconhecimento das atividades antiinflamatórias dos PUFAs *n*-3 deram início a estudos de suplementação da dieta em modelos animais de inflamação crônica e infecção, além de estudos delineados para elucidar os mecanismos de ação dos PUFAs *n*-3. Também testes em humanos envolvendo pacientes com doenças inflamatórias e infecções, como a sepse, estão sendo amplamente desenvolvidos.

Ensaio tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando animais, tem mostrado que os PUFAs *n*-3 possuem poderosas atividades antiinflamatórias e imunomodulatórias em uma gama de doenças, tais como autoimunidade, artrite reumatóide e infecções (FRITSCHÉ, 2006). Em

humanos, os estudos em pacientes com artrite reumatóide são os que apresentam melhores resultados, com vários testes mostrando redução dos sintomas, como inchaço, dor e rigidez matinal (SIMOPOULOS, 2002). Já os estudos em pacientes com doença inflamatória do intestino (doença de Crohn e colite ulcerativa) e asma ainda são inconclusivos, sendo encontrados testes que reportam alguns benefícios e outros não (CALDER, 2012).

A *Agency for Healthcare Research and Quality Reports* dos Estados Unidos avaliou estudos em humanos que relacionam a suplementação com PUFAs *n*-3 e artrite reumatóide e concluiu que ainda não há evidências suficientes dos benefícios clínicos da suplementação com PUFAs *n*-3 nesses pacientes, sendo necessários mais testes clínicos (FRITSCHKE, 2006).

Enquanto que os resultados da suplementação com PUFAs *n*-3 em humanos são contraditórios, os testes em modelos animais apresentam-se mais expressivos e conclusivos. Numa análise bastante crítica feita por Fritsche (2006), importantes diferenças nos estudos com animais e humanos devem ser levadas em consideração, podendo ser essa a razão da discrepância observada nos resultados. Primeiramente, a heterogeneidade genética pode interferir nos efeitos dos PUFAs *n*-3, e essa variação genética é muito maior numa população humana do que em animais de laboratórios. Adicionalmente, enquanto em estudos com animais a alimentação basal pode ser completamente controlada, em humanos esse controle acaba sendo muito pequeno ou até mesmo inexistente. Além disso, a maioria dos estudos em animais inicia a suplementação com PUFAs *n*-3 antes do desenvolvimento da doença (seja ela inflamatória ou infecciosa), enquanto que em humanos os testes são desenvolvidos em pacientes que já tem a doença estabelecida.

São conhecidos alguns mecanismos da modulação da resposta imune pelos PUFAs *n*-3, como a alteração da composição e função das membranas de células do sistema imunológico, modificação no padrão de eicosanóides produzidos, mudanças no perfil de citocinas, regulação da expressão gênica e diminuição da proliferação de linfócitos T (de PABLO & CIENFUEGOS, 2000).

A suplementação com óleo de peixe aumenta a proporção de EPA e DHA nos fosfolípidos das membranas de células inflamatórias, com consequente redução na quantidade do PUFAs *n*-6 ácido araquidônico. Os PUFAs *n*-3 inibem competitivamente a formação de eicosanóides pelas enzimas cicloxigenase e lipoxigenase a partir do ácido araquidônico, sendo produzidos, a partir dos PUFAs *n*-3, prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos da série 5, sendo que esses eicosanóides apresentam menor atividade

inflamatória. Uma vez que a produção de citocinas é regulada por eicosanóides derivados do ácido araquidônico, e os PUFAs *n-3* afetam a produção desses eicosanóides, espera-se que os PUFAs *n-3* afetem a produção de citocinas (CALDER, 2002).

NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição nuclear envolvido na regulação positiva de genes de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e cicloxigenase (CHEN, CASTRANOVA & SHI, 2001). Os PUFAs *n-3* diminuem a atividade desse fator de transcrição nuclear. Esse efeito pode ser por inibição da fosforilação da subunidade I $\kappa$ B (CALDER, 2012) ou através da alteração na formação de rafts lipídicos, impedindo que proteínas sinalizadoras fiquem próximas ao receptor TLR4, não ocorrendo a sua sinalização e consequente ativação do NF- $\kappa$ B (WONG et al., 2009, CHAPKIN et al., 2009).

Estudos em culturas de células mostraram que a suplementação com PUFAs *n-3* suprime a capacidade de monócitos sintetizarem Interleucina 1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (SIMOPOULOS, 2002; ZHAO et al., 2004), como também a produção de IL-6 e IL-8 por células do endotélio venoso (de CATERINA et al., 1994; CALDER, 2006). Considerando que a IL-1 e o TNF- $\alpha$  são importantes mediadores da inflamação, a redução nessas citocinas contribui para melhorar sintomas inflamatórios de pacientes que fazem uso de suplementos com PUFAs *n-3*. O consumo de PUFAs *n-3* também está associado com uma significativa diminuição na produção *in vivo* de IL-12 e interferon-gama (INF- $\gamma$ ) (FRITSCHKE, BYRGE & FENG, 1999; PUERTOLLANO et al., 2005). Zhang & Fritsche, em 2004, mostraram que macrófagos tratados com DHA diminuem a produção de IL-12 de maneira independente de PPAR $\gamma$ .

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que aparece rapidamente após infecções ou lesões, tendo um papel fundamental no combate a patógenos invasores. Contudo, a produção excessiva de TNF- $\alpha$  está relacionada com mortalidade e morbidade na sepse, meningite e malária. Embora grande parte dos estudos envolvendo a modulação do TNF- $\alpha$  pelo tratamento com PUFAs *n-3* indiquem um efeito supressivo do tratamento sobre essa citocina, é importante considerar que a sensibilidade aos efeitos supressivos dos PUFAs *n-3* na produção de TNF- $\alpha$  está ligada ao nível inerente de produção de citocinas pelas células antes da suplementação e aos polimorfismos encontrados no gene codificador do TNF- $\alpha$  (GRIMBLE et al., 2002).

Dessa forma, alguns trabalhos relatam aumento de citocinas diante do tratamento com PUFAs *n-3*. Blok e colaboradores (2002) relataram aumento na produção de TNF- $\alpha$  por

macrófagos estimulados *in vitro* com LPS. Takeda e colaboradores (1995) mostraram que a suplementação com óleo de peixe em camundongos infectados por *T. cruzi* e consequentemente estimulados com LPS resulta num aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ . O estudo de 1992 de Blok e colaboradores mostrou que a suplementação com óleo de peixe na infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae* e na infecção cerebral por *Plasmodium berghei* leva ao aumento na produção *ex vivo* de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS. Além desses, Puertollano e colaboradores (2005) mostraram que o tratamento *in vivo* com óleo de peixe aumentou os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em camundongos infectados por *Listeria Monocytogenes* nas primeiras 24h de infecção, sendo menor nos tempos posteriores.

Como já dissemos, o NO constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Macrófagos tratados com DHA e estimulados com LPS apresentaram redução na produção de NO, assim como menor expressão da enzima iNOS, provavelmente por interferência nas vias de sinalização intracelulares associadas com a regulação da iNOS (AMBROZOVA, PEKAROVA & LOJEK, 2009). Também Khair-El-Din e colaboradores (1996) já demonstraram que DHA diminui a produção de NO por macrófagos estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$  e LPS. De Lima e colaboradores (2006) relataram que baixas doses de PUFAs *n*-6 e *n*-3 (entre eles o DHA e o EPA) estimulam a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS, enquanto que altas doses dos PUFAs diminuem a síntese do NO nessas células.

O único trabalho publicado até hoje relacionando a suplementação oral com PUFAs *n*-3 e a infecção por *T. cruzi* foi publicado por Takeda e colaboradores em 1995. Nesse estudo os autores mostraram que a administração oral de óleo de peixe induz altos níveis séricos de TNF- $\alpha$  em camundongos infectados por *T. cruzi*, mas diferenças na infectividade não foram observadas entre camundongos infectados e suplementados/infectados.

O impacto da dieta com PUFAs *n*-3 na trombocitopenia e leucopenia na infecção por *T. cruzi* não foi até agora investigada. Dessa forma, torna-se pertinente o estudo dos efeitos dos PUFAs *n*-3 no perfil hematológico e na resistência/suscetibilidade de camundongos C57BL/6 à infecção por *T. cruzi*, sendo esse um modelo animal de resistência à virulenta cepa Y de *T. cruzi*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito imunomodulador da suplementação oral prolongada em camundongos C57BL/6 com óleo de peixe – fonte de PUFA *n*-3 – durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (cepa Y).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da suplementação oral prolongada com óleo de peixe – fonte de PUFA *n*-3 - em camundongos C57BL/6, protótipo de resistência para a cepa Y de *T. cruzi*, por meio da análise dos seguintes parâmetros:

- Massa relativa dos animais e do baço;
- Quantificação de colesterol plasmático total;
- Quantificação da celularidade esplênica;
- Análise dos parâmetros hematológicos (hematócrito, reticulócitos, contagem de leucócitos e de plaquetas e contagem de células totais da medula óssea);
- Determinação da carga parasitária sanguínea e do tecido cardíaco,
- Determinação da taxa de sobrevivência dos animais;
- Quantificação de óxido nítrico (NO) no plasma e tecido cardíaco;
- Quantificação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) produzidos por células esplênicas estimuladas por antígenos totais do *T. cruzi* (Cepa Y).

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31(1):117-2, 1998.
- ALIBERTI, J. C.; CARDOSO M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.** 64(6):1961-7, 1996.
- AMATO-NETO, V. Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.** 70(1): 63-64, 1998.
- AMBROZOVA, G.; PEKAROVA, M.; LOJEK, A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. **Eur. J. Nutr.** 49(3):133-9, 2009.
- ANDRADE, S. G. **Patologia experimental da doença de Chagas: modelos em camundongos. 2008.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=99>>. Acesso em 07 jun. 2012.
- ANDRADE, Z. A. Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap. 12, p. 200-230.
- ANDREWS, N. W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.** 26(1-2):65-7, 1993.
- BASSO, B.; CERVETTA, L.; MORETTI, E.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. **Vaccine.** 22(15-16):1868-72, 2004.
- BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 11(1):5-35, 1991.
- BLITZMAN, M. **Enfermedad de Chagas-Mazza – 1er Congreso Virtual de Cardiología. 2007.** Disponível em: <<http://www.fac.org.ar/cvirtual/cvirtesp/cientesp/tcesp/tcc5600c/cblitzma/cblitzma.htm>>. Acesso em 07 jun. 2012.
- BLOK, W. L.; RABINOVITCH M.; ZILBERFARB, V.; NETEA, M. G.; BUURMAN, W. A.; van der MEER, J. W. The influence of dietary fish-oil supplementation on cutaneous *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Cytokine.** 19(5):213-7, 2002.
- BLOK, W. L.; VOGELS, M. T.; CURFS, J. H.; ELING, W. M.; BUURMAN, W. A.; van der MEER, J. W. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. **J. Infect. Dis.** 165(5):898-903, 1992.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 20(7):1707-15, 2000.

BORGES, C. L. **Papel da 5-lipoxigenase no controle da carga parasitaria no estresse oxidativo de eritrócitos durante a fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi***. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 139 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica: Doença de Chagas aguda por transmissão oral. 2005**. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.> Acesso em 07 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Brasil receberá certificado internacional da interrupção da transmissão vetorial da Doença de Chagas pelo *Triatominae***. 2006. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.> Acesso em 07 jun. 2012.

BRENNER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.** 27:347-82, 1973.

BURLEIGH B. A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.** 49:175-200, 1995.

CALDER, P. C. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proc. Nutr. Soc.** 61(3):345-58, 2002.

CALDER, P. C. Long-chain fatty acids and inflammation. **Proc. Nutr. Soc.** 71(2):284-9, 2012.

CALDER, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am. J. Clin. Nutr.** 83(6 Suppl):1505S-1519S, 2006.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.** 44(1):29-37, 2002.

CARDILLO, F.; CUNHA, F. Q.; TAMASHIRO, W. M.; RUSSO, M.; GARCIA, S. B.; MENGEL, J. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.** 55:96-104, 2002.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.** 64(1):128-34, 1996.

CARDONI R. L.; ANTUNEZ, M. I.; MORALES, C.; NANTES, I. R. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 56(3):329-34, 1997.

CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 75(3-4):97-104, 1980.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Parasites – American Trypanosomiasis (Chagas Disease): Epidemiology & Risk Factors. 2010.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>> Acesso em 07 jun. 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* *gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1:159-218, 1909.

CHAGAS, C.; VILELLA, E. Forma Cardíaca da Trypanosomíase americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 14:5-61, 1922.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; FREEMAN, G. L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **Clin. Exp. Immunol.** 121(1):112-9, 2000.

CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1:309-10, 1999.

CHAPKIN, R. S.; KIM, W.; LUPTON, J. R.; McMURRAY, D. N. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.** 81(2-3):187-91, 2009.

CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. **Am. J. Pathol.** 159(2):387-97, 2001.

CHILDS, C. E.; ROMEU-NADAL, M.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. **Proc. Nutr. Soc.** 67(1):19-27, 2008.

COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MENEGAZZI, M.; MARIOTTO, S.; GIORDANO, E.; CALDARERA, C. M.; SOGOS, V.; LAURO, G. M.; SUZUKI, H. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. **J. Biol. Chem.** 270(45):26731-3, 1995

COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends Pharmacol. Sci.** 21(7):249-52, 2000.

COSTA, S. C. G. Mouse as a model for Chagas Disease: Does mouse represent a good model for Chagas Disease? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 (1):269-272, 1999.

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J. ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 177(5):3193-200, 2006.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.** 72(7):4081-9, 2004.

- DE CATERINA, R.; CYBULSKY, M. I.; CLINTON, S. K.; GIMBRONE, M. A. JR.; LIBBY, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb.** 14(11):1829-36, 1994.
- De LIMA, T. M.; De SA, L.; LIMA, L.; SCAVONE, C.; CURI, R. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS Lett.** 580(13):3287-95, 2006.
- De PABLO, M. A.; CIENFUEGOS, G. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunol. Cell Biol.** 78(1):31-9, 2000.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cytol.** 86:197-283, 1984.
- DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADI, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 95(7):3566-71, 1998.
- DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 98(1):1-12, 2003.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e Transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 28(2):81-87, 2006.
- DIAS, J. C. P.; SHOFIELD, C. J. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(I): 103-121, 1999.
- DVORAK, J. A. New in vitro approach to quantization of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. **New. Appr. Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub.** 318:109-20, 1975.
- ESTEVAM, M.; APPOLONI, C.R.; MALVEZI, A. D.; TATAKIHARA, V. L.; PANIS, C.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: in vivo evaluation of iron in skin employing X-ray fluorescence (XRF) in mouse strains that differ in their susceptibility to infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 64(3):334-42, 2012.
- FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric Oxide. **Ann. Reum. Dis.** 55:7-20, 1996.
- FERNANDES, A. B.; NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* mastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitol. Res.** 100(1):59-68, 2006.
- FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; JANSEN, A. M.; CUPOLLILO, E.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B.; COURA, J. R. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(I): 195-197, 1999.
- FICHERA, L. E.; ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A.; POSTAN, M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. **Infect. Immun.** 72(1):359-63, 2004.

FORATTINI, O. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev. Saúde Públ. São Paulo.** 14:265-299, 1980.

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annu. Rev. Nutr.** 26:45-73, 2006.

FRITSCHKE, K. L.; BYRGE, M.; FENG, C. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice. **Immunol. Lett.** 65(3):167-73, 1999.

FUJIMURA, A. E.; KINOSHITA, S. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RODRIGUES, M. M. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect. Immun.** 69(9):5477-86, 2001.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 288(5789):373-6, 1980.

GARCIA, E.; GONZALEZ, M.; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 1:213-6, 1999.

GARG, N.; TARLETON, R. L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** 70(10):5547-55, 2002.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95(4):557-65, 2000.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat. Rev. Immunol.** (12):895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A.; VIEIRA, L. Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Braz. J. Med. Biol. Res.** (1):89-104, 1998.

GIDDINGS, O. K.; EICKHOFF, C. S.; SMITH, T. J.; BRYANT, L. A.; HOFT, D. F. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. **Infect. Immun.** 74(10):5549-60, 2006.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends. Parasitol.** 19(1):19-22, 2003.

GRIMBLE, R. F.; HOWELL, W. M.; O'REILLY, G.; TURNER, S. J.; MARKOVIC, O.; HIRRELL, S.; EAST, J. M.; CALDER, P. C. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. **Am. J. Clin. Nutr.** 76(2):454-9, 2002.

- HARRIS, T. H.; COONEY, N. M.; MANSFIELD, J. M.; PAULNOCK, D. M. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. **Infect. Immun.** 74(8):4530-7, 2006.
- HARRIS, W. S. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils. **Clin. Cardiol.** 22(6 Suppl):II40-3, 1999.
- HAUSCHKA, T. S. Sex of host as a factor in Chaga's disease. **J. Parasitol.** 33:399-405, 1974.
- HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BOMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect. Immun.** 66(3):1208-15, 1998.
- HOTEZ, P. Enlarging the "Audacious Goal": elimination of the world's high prevalence neglected tropical diseases. **Vaccine.** 30(29) Suppl 4, 2011.
- HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAÚJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.** 64(7):2381-6, 1996.
- HYBISKE, K.; STEPHENS, R. S. Exit strategies of intracellular pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.** 6(2):99-110, 2008.
- INOUE, S.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. **FEBS Lett.** 371(1):86-8, 1995.
- JAMES, S. L. The effector function of nitrogen oxides in host defense against parasites. **Exp. Parasitol.** 73(2):223-6, 1991.
- KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R. A.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infect. Immun.** 64(7):2649-56, 1996.
- KANNO, S.; LEE, P. C.; ZHANG, Y.; HO, C.; GRIFFITH, B. P.; SHEARS, L. L. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by super induction of inducible nitric oxide synthase. **Circulation.** 101(23):2742-8, 2000.
- KELLY, R. A.; BALLIGAND, J. L.; SMITH, T. W. Nitric oxide and cardiac function. **Circ. Res.** 79(3):363-80, 1996.
- KHAIR-EL-DIN, T.; SICHER, S. C.; VAZQUEZ, M. A.; CHUNG, G. W.; STALLWORTH, K. A.; KITAMURA, K.; MILLER, R. T.; LU, C. Y. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. **J. Exp. Med.** 183(3):1241-6, 1996.
- KIERSZENBAUM, F.; DE DIEGO, J. L.; FRESNO, M.; SZTEIN, M. B. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor

chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** 29(5):1684-91, 1999.

KIERZENBAUM, F.; LOPEZ, H. M.; SZTEIN, M. B. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. **Immunology.** 81(3):462-7, 1994.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K.; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 177(10):7059-66, 2006.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta. Med. Scand.** 208(5):401-6, 1980.

KROPF, S. P. Science, health and development: Chagas disease in Brazil, 1943-1962. **Parasitologia.** 47(3-4):379-86, 2005.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 88(11):4651-5, 1991.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, cap 11, p. 85-108.

LEE, A. J.; NOON, K. R.; JIANMONGKOL, S.; LAU, M.; JENKINS, G. J.; OSAWA, Y. Metabolism of aminoguanidine, diaminoguanidine, and NG-amino-L-arginine by neuronal NO-synthase and covalent alteration of the heme prosthetic group. **Chem. Res. Toxicol.** 18(12):1927-33, 2005.

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S. E.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clin. Exp. Immunol.** 145(2):357-64, 2006.

LIN, D. S.; CONNOR, W. E.; WOLF, D. P.; NEURINGER, M.; HACHEY, D. L. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. **J. Lipid. Res.** 34(3):491-9, 1993.

LINDE, A.; MOSIER, D.; BLECHA, F.; MELGAREJO, T. Innate immunity and inflammation--New frontiers in comparative cardiovascular pathology. **Cardiovasc. Res.** 73(1):26-36, 2006.

MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 (1):311-6, 1999.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.** 15:323-50, 1997.

MAGUIRE, J. H. Chagas' disease--can we stop the deaths? **N. Engl. J. Med.** 355(8):760-1, 2006.

- MAGUIRE, J. H.; HOFF, R.; SHERLOCK, I.; GUIMARÃES, A. C.; SLEIGH, A. C.; RAMOS, N. B.; MOTT, K. E.; WELLER, T. H. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**. 75(6):1140-5, 1987.
- MALVEZI, A. D.; CECCHINI, R.; DE SOUZA, F.; TADOKORO, C. E.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 41(1):69-77, 2004.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BRYNIARSKI, K.; CHAIN, B. M. Enhancement of CD4+ T-cell-dependent interleukin-2 production in vitro by murine alveolar macrophages: the role of leukotriene B4. **Immunology**. 91(3):369-74, 1997.
- MARCONDES, M. C.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes Infect.** 2(4):347-52. 2000.
- MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol. Infect.** 136(9):1153-64. 2008.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends. Biochem. Sci.** 22(12):477-81, 1997.
- MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C.; SINGER, R. H.; SOEIRO, M. N.; GARZONI, L. R.; SILVA, D. T.; BARBOSA, H. S.; ARAUJO-JOEGE, T. C.; MASUDA, M. O.; CAPELLA, M. A.; LOPES, A. G.; VERMELHO, A. B. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94(1):149-52, 1999.
- MELDRUM, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. **Am. J. Physiol.** 274:577-595, 1998.
- MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.** 64(3):475-82, 1978.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**. 6;442(7098):39-44, 2006.
- MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.** 159(5):1723-33, 2001.
- MIGUEL, C. E.; BORTOLUZZI, T. B.; OTAVIANO, A. P.; CARDINALI-NETO, A.; ROCHA, B. F.; FERRARI, S. J.; BESTETTI, R. B. Prognostic significance of anemia in patients with chronic systolic heart failure secondary to Chagas' cardiomyopathy. **Acta. Trop.** 120(3):219-23, 2011.
- MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Suppl 1:181-4, 1999.

- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.** 21(4):361-74, 1991.
- MONCAYO, A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. **World Health Stat Q.** 45(2-3):276-9, 1992.
- MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. **J. Nutr.** 134(10 Suppl):2741S-2897S, 2004.
- NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 38(12):1825-34, 2005.
- NEURINGER, M.; CONNOR, W. E.; LIN, D. S.; BARSTAD, L.; LUCK, S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 83(11):4021-5, 1986.
- PAKIANATHAN, D. R.; KUHN, R. E. Interleukin-2 receptors in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.** 60(9):3904-8, 1992.
- PALOMBA, L.; PERSICHINI, T.; MAZZONE, V.; COLASANTI, M.; CANTONI, O. Inhibition of nitric-oxide synthase-I (NOS-I)-dependent nitric oxide production by lipopolysaccharide plus interferon-gamma is mediated by arachidonic acid. Effects on NFkappaB activation and late inducible NOS expression. **J. Biol. Chem.** 279(29):29895-901, 2004.
- PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp. Parasitol.** 127(1):58-65, 2011.
- PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; PRADO, C. M.; FERREIRA, B. R.; TEIXEIRA, M. M.; CANETTI, C.; ROSSI, M. A.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.** 12(8-9):587-97, 2010.
- PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin 1- $\beta$  in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect. Immun.** 71(8):4441-7, 2003.
- PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 16(4):193-9, 1994.
- PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol.** 193(1):90-8, 1999.
- PUERTOLLANO, M. A.; CRUZ-CHAMORRO, L.; PUERTOLLANO, E.; PÉREZ-TOSCANO, M. T.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G.; DE PABLO, M. A. Assessment of

interleukin-12, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha secretion in sera from mice fed with dietary lipids during different stages of *Listeria monocytogenes* infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 12(9):1098-103, 2005.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin. Cardiol.** (12):883-9, 2000.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North. Am.** (2):275-91, 2012.

RATNAYAKE, W. M.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann. Nutr. Metab.** 55(1-3):8-43, 2009.

REPKA, D.; RANGEL, H. A.; ATTA, A. M.; GAVINO, V. A.; PIEDRABUENA, A. E. Experimental Chagas' disease in mice infected with one LD50 of parasite. **Rev. Bras. Biol.** 45(3):309-16, 1985.

RISSO, M. G.; GARBARINO, G. B.; MOCETTI, E.; CAMPETELLA, O.; GONZALEZ-CAPPA, S. M.; BUSCAGLIA, C. A.; LEGUIZAMON, M. S. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. **J. Infect. Dis.** 189(12):2250-9, 2004.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J. Parasitol. Res.** 2012:507874, 2012.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.** 128(3):421-8, 2002.

ROWLAND, E.; LUO, H.; MCCORMICK, T. Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. **J. Parasitol.** 81(1):123-6, 1995.

SABROE, I.; PARKER, L. C.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. The role of TLR activation in inflammation. **J. Pathol.** 214(2):126-35, 2008.

SAEFTTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. Immun.** 69(4):2252-9, 2001.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M. E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annu. Rev. Microbiol.** 48:499-523, 1994.

SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap. 1, p. 1-15.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Adv. Parasitol.** 42:1-27, 1999.

SCHÖNECK, R.; PLUMAS-MARTY, B.; TAIBI, A.; BILLAUT-MULOT, O.; LOYENS, M.; GRAS-MASSE, H.; CAPRON, A.; OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. **Biol. Cell.** 80(1):1-10, 1994.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clin. Biol.** 20: 191-208, 1953.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PÁDUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** (1):111-5. 1998

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.** 63(12):4862-7, 1995.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J. Am. Coll. Nutr.** 21(6):495-505, 2002.

SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1:257-62, 1999.

SOUZA, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, cap. 7, p. 89-126.

TAKEDA, G. K.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M. C.; MELLO, E. A.; RUSSO, M.; STOLF, A. M. Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in *Trypanosoma cruzi* infected C57BL/6 mice. **Acta Trop.** 60(3):215-9, 1995.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect. Immun.** 70(8):4247-53, 2002.

TANOWITZ, H. B.; GUMPRECHT, J. P.; SPURR, D.; CALDERON, T. M.; VENTURA, M. C.; RAVENTOS-SUAREZ, C.; KELLIE, S.; FACTOR, S. M.; HATCHER, V. B.; WITTNER, M.; BERMAN, J. W. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.** 166(3):598-603, 1992.

TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today.** 11(1):7-9, 1995.

TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.** 73(2):186-90, 1988.

- TAYLOR, A.; VERHAGEN, J.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. **Immunology**. 117(4):433-42, 2006.
- TEIXEIRA, A. R.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, J. M.; ARGANARAZ, E. R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C. A.; SILVA, A. R.; AULT, S. K.; COSTA, J. M. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerg. Infect. Dis.** 7(1):100-12, 2001.
- THEODOROPOULOS, T. A.; SILVA, A. G.; BESTETTI, R. B. Eosinophil blood count and anemia are associated with *Trypanosoma cruzi* infection reactivation in Chagas' heart transplant recipients. **Int. J. Cardiol.** 145(1):55-6, 2010.
- TOLEDO, M. J. O.; KÜHL, J. B.; SILVA, S. V.; GASPERI, M. V.; ARAÚJO, S. M. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, Sul do Brasil. Resultados Preliminares. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30(3):197-203, 1997.
- TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infect. Immun.** 62(2):692-6, 1994.
- TYLER, K. M.; EGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.** 31(5-6):472-81, 2001.
- VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.** 8:253-78, 1990.
- VAN VOORHIS, W. C. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **J. Immunol.** 148(1):239-48, 1992.
- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** 62(11):5177-82, 1994.
- WANDERLEY, D. M. V.; LITVOC, J. Doença de Chagas como causa básica de óbito na região sudeste do Brasil: presença de causas contributórias. **Rev. Saúde Pub.**, 28:69-75, 1994.
- WHO, World Health Organization. **Chagas Disease. 2010.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>> Acesso em 07 jun. 2012.
- WHO, World Health Organization. **Why are some tropical disease called “neglected”?** 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/58/en/>> Acesso em 07 jun. 2012.
- WILEY, J. & SONS. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. In: SWERN, D. Ed. **Structure and composition of fats and oils.** v.1, Jerusalém, 1979, p. 841.
- WONG, S. W.; KWON, M. J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D. H. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of

receptordimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **J. Biol. Chem.** 284(40):27384-92, 2009.

XIE, Q. W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.** 177(6):1779-84, 1993.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Bras. Cienc.** 78(1):87-111, 2006.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol. Int.** 57(2):105-9, 2008.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPAR gamma. **Br. J. Nutr.** 91(5):733-9, 2004.

ZHAO, Y.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; CHEN, L. H. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **J. Am. Coll. Nutr.** 23(1):71-8, 2004.

ZHENG, Y. M.; SCHÄFER, M. K.; WEIHE, E.; SHENG, H.; CORISDEO, S.; FU, Z. F.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. Severity of neurological signs and degree of inflammatory lesions in the brains of rats with Borna disease correlate with the induction of nitric oxide synthase. **J. Virol.** 67(10):5786-91, 1993.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 104(7):1051-4, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect. Genet. Evol.** 12(2):240-53, 2012.

**3 ARTIGO**

**Fish oil supplementation ameliorates leukopenia and thrombocytopenia and modulates nitric oxide and TNF- $\alpha$  status in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.**

Maria Isabel Lovo Martins

Phileno Pinge Filho

A ser submetido para publicação

## Research Paper

# **Fish oil supplementation ameliorates leukopenia and thrombocytopenia and modulates nitric oxide and TNF- $\alpha$ status in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.**

Maria I. Lovo-Martins<sup>1</sup>, Aparecida D. Malvezi<sup>1</sup>, Rosiane V. da Silva<sup>1</sup>, Nagela G. Zanluqui<sup>1</sup>, Vera L.H.Tatakihara<sup>1</sup>, Ana P. Ligeiro de Oliveira<sup>2</sup>, Jean P. S. Peron<sup>2</sup>, Kevin L. Fritsche<sup>3</sup>, Phileno Pinge-Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.*

<sup>2</sup>*Departmento of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA*

Corresponding author: Phileno Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4267; Fax: + 55 43 3371-4465

## Abstract

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFAs) supplementation has been reported to reduce inflammation and in some circumstances diminish infectious disease resistance in rodents. We investigated whether supplementation with fish oil, a source of *n*-3 PUFAs impairs host resistance against *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease. C57BL/6 were supplemented (0.6% v/w) by gavage with phosphate buffer saline (PBS), corn oil (CO) or fish oil (FO) for 15 days prior to *T. cruzi* challenge and throughout the course of the infection. In this study, we observed an increase in spleen weight and cellularity and a tendency for a reduced weight loss in the infected-FO supplemented mice. Importantly, FO supplementation in infected mice improved platelets and leukocytes counts, decreased heart parasitism, decreased nitric oxide production in plasma and cardiac tissue, and increased TNF- $\alpha$  production by spleen cells stimulated with parasite antigen. These data indicate the potential of FO supplementation to attenuate the clinical course of *T. cruzi* infection in mice.

**Keywords:** Chagas' disease; infection; thrombocytopenia; leukopenia; fish oil; nitric oxide; tumor necrosis factor-alpha; omega-3 fatty acids

## Introduction

The flagellated protozoa *Trypanosoma cruzi* is the causal agent of Chagas' disease (CD) or American tripanosomiasis, an important public health problem, still a major cause of morbidity in Latin America over a century after its discovery by Brazilian physician Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Chagas, 1909).

*T. cruzi* infection in human (Miguel *et al.*, 2011) and mouse models is manifested with anemia (Cardoso & Brener, 1980; Repka *et al.*, 1985), which can be reversed by

administration of the trypanocidal drug nifurtimox (Marcondes *et al.*, 2000). The anemia is associated with erythrocyte oxidative stress (Malvezi *et al.*, 2004) and decreased iron levels in infected mice (Estevam *et al.*, 2012). In addition, anemia indicates reactivation of CD in heart transplant recipients (Theodoropoulos *et al.*, 2010). The high mortality in acute *T. cruzi* infection is associated with low numbers of circulating platelets and leukocytes as well as bone marrow hypoplasia (Marcondes *et al.*, 2000; Malvezi *et al.*, 2004). Furthermore, the production of NO and TNF- $\alpha$  appears to be critical in establishing resistance to *T. cruzi* infection in mice (Silva *et al.*, 1995).

Fatty acids can markedly modulate immunological responses (Anderson & Fritsche, 2004; Fritsche, 2006). Evidence indicates that fish oil rich in *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) affects selective aspects of cellular immunity (Anderson & Fritsche, 2002). In some circumstances, fish oil feeding can lead to an impairment in host resistance to bacterial infection (Fritsche *et al.*, 1997; Fritsche *et al.*, 2005). Interestingly, fish oil feeding does not affect *in vivo* development and function of pathogen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector/memory T cells in mice (Irons *et al.*, 2005).

An early investigation concerning the relationship between PUFAs and *T. cruzi* infection (Takeda *et al.*, 1995) showed that oral administration of fish oil induced high levels of circulating TNF- $\alpha$  in *T. cruzi* infected mice, but no differences in infectivity were observed from fish oil administration.

The impact of dietary lipids on thrombocytopenia and leukopenia in *T. cruzi* infection has not been investigated. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effects of *n*-3 PUFAs on anemia and resistance to *T. cruzi* infection in C57BL/6 mice, a prototypical resistant host to a virulent strain Y of *T. cruzi* (Trischmann, 1986; Malvezi *et al.*, 2004; Hideko Tatakijara *et al.*, 2008; Estevam *et al.*, 2012).

## **Material and methods**

### **Mice, parasites and infection**

All animal procedures were performed according to the principles of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals and were approved by the Research and Ethics Committee of Londrina State University (CEEA, process number 89/10- 35135.2010.85).

C57BL/6 male and female mice were obtained from CEMIB/UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil). Swiss male mice were obtained from the breeding colonies of the animal facility of the Center for Biological Sciences, Londrina State University (Londrina, Paraná, Brazil). All mice used in the experiments were 7-12-week-old mice. The mice were maintained under standard conditions in the animal facility in the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, Londrina State University. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*.

*T. cruzi* Y strain (Silva & Nussenzweig, 1953) was maintained by weekly intraperitoneally trypomastigotes inoculations into Swiss mice. Parasite-rich blood was appropriately diluted in 0.01 M phosphate-buffered saline. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes.

### ***T. cruzi* antigen preparation (Tc-Ag)**

*T. cruzi* tissue-culture trypomastigotes antigen (Tc-Ag) was prepared from parasites harvested from infected monolayers of LLC-MK2 cells (American Type Culture Collection, ATCC) and submitted to 10 cycles of freezing and thawing, as previously describe (Curotto-de-Lafaille *et al.*, 1990). Aliquots were stored at  $-20^{\circ}$  C until used.

## PUFAs

Fish oil (FO) from menhaden fish are a rich source of *n*-3 PUFAs (Sigma Chem. Co. F8020). The *n*-3 PUFAs present in this oil correspond to 18-30% of total fatty acids, with 10-15% of eicosapentaenoic acid (20:5 *n*-3) and 8-15% of docosahexaenoic acid (22:6 *n*-3), while the *n*-6 PUFAs linoleic acid (18:2 *n*-6) and arachidonic acid (20:4 *n*-6) acid are present in low amounts, accounting together less than 6% of total fatty acids. This oil also has 5-12% of oleic acid (18:1 *n*-9), a monounsaturated fatty acid (MUFA).

Corn oil (CO) (Sigma Chem.Co. C8627) it is a fat source rich in *n*-6 PUFAs, but with less than 1.5% *n*-3 PUFA, specifically linolenic acid (18:3 *n*-3). The *n*-6 PUFA linoleic acid (18:2 *n*-6) present in this oil typically ranges from 49-52% of total fatty acids, while oleic acid (18:1 *n*-9) makes up 20-42.2%.

## PUFAs supplementation

Starting at 15 days before *T. cruzi* infection until the day of experiment, C57BL/6 mice (all with body weight between 18-24 g) were supplemented daily, between 12:00 p.m. and 2:00 p.m, by gavage with: 1) Phosphate buffer saline (PBS), (0.6% V/W- mL per 100g body weight), as control group; 2) Corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) Fish oil (FO), (0.6% V/W) (Wang *et al.*, 2007). All animals were fed with normal lab chow (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sacrificed at different days post-infection (dpi). The supplementation with either of the oils has provided the mice between 0.9 – 1.16 kcals per day. Thus, the daily fat supplementation has accounted for ~10% of the total caloric intake in these mice.

### **Parasitemia, survival rates and body weight**

Blood parasitemia was assessed under standardized conditions by direct microscopic observation at 400 x magnification of 50 fields in 5  $\mu$ l of heparinized tail venous blood on alternate days from the third day after *T. cruzi* infection. Data were expressed as the number of parasites/mL (Brenner, 1962). Survival rates and body weight of control and experimental groups of mice were evaluated daily until 30 dpi.

### **Spleen, heart and hematological analysis**

The mice were anesthetized with ether, and blood was taken by cardiac puncture with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) needles and syringes. The animals were killed by neck dislocation; spleens and hearts were removed and weighed.

Leukocytes, platelets and reticulocytes were counted by standard methods (Dacie & Lewis, 1994). In each case, the plasma was separated and stored at -20°C until used. Hematocrits were obtained by microcentrifuging capillary tubes filled with blood (Bain, 1997). Bone marrow was obtained from both femora of each mouse by flushing the femur shafts with 3 mL of ice-cold PBS, as previously describe (Tadokoro et al., 2001). The total number of cells nucleated collected was determined by manual hemacytometer count. The effect of CO and FO on spleen weight, blood cells count and cellularity in the bone marrow were determined in uninfected and infected C57BL/6 mice at different times (i.e., days 5, 7 and 12) after *T. cruzi* infection.

### **Cell Cultures**

Spleen cells were harvested from infected mice at different times of infection or from normal C57BL/6 female and male mice, depleted of erythrocytes by hypotonic lysis with

distilled water and resuspended in RPMI, supplemented with: 10 mM Hepes, 2.0 mM L-glutamine, 0.55 mM arginine, 1 mM pyruvate, 43 mM NaHCO<sub>3</sub>, penicillin and streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively) (Sigma Chemical Co.), Tylosin (1mg/mL, Sigma Chemical Co) and 10% FCS (Invitrogen). Spleen cells from normal and infected mice supplemented or not with CO or FO from the early of infection were cultured (4 x 10<sup>5</sup>/ well) for 48-72 h in 96-well flat-bottom plates in complete medium and stimulated with Tc-Ag (4 x 10<sup>5</sup> parasites/ well).

### **Determination of total plasma cholesterol**

The concentration of total cholesterol in the plasma was assayed using a commercial enzymatic kit (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brazil, N° 90927003). Briefly, cholesterol esters were hydrolyzed to free cholesterol by cholesterol ester hydrolase. The free cholesterol produced was then oxidized by cholesterol oxidase to cholest-4-en-3-one with the simultaneous production of hydrogen peroxide, which oxidatively couples with 4-aminophenazone and phenol in the presence of peroxidase to yield a chromogen with maximum absorption at 500 nm (Allain *et al.*, 1974).

### **Histological analysis of heart**

On day 12 of infection, mice supplemented or not with CO or FO were sacrificed. Hearts were immediately removed and sliced transversally in two sections. One section was stored at -20 °C until it could be prepared for NO analyses. The remaining tissue was fixed in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded 5 µm sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and analyzed by light microscopy. Cardiac parasitism was evaluated by counting the number of amastigotes nests that were visualized in three whole heart sections per animal,

at 400 x magnification for each tissue section. The results of cardiac parasitism were reported as the number of amastigotes nests in all three heart tissue sections (Roggero et al., 2006).

### **Nitric oxide (NO) quantification**

NO concentration in plasma and heart tissue obtained from uninfected and *T. cruzi*-infected mice on days 5, 7 and 12 dpi was estimated by measuring nitrite, as described previously (Navarro-González et al., 1998; Panis et al., 2011). All reagents for the nitrite assay were obtained from Sigma Chemical Co.

### **TNF- $\alpha$ measurement**

The concentration of TNF- $\alpha$  in spleen cell culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with an ELISA Ready-SET-Go! Kit (eBioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni or Tukey's multiple comparison tests; all differences mentioned were significant compared to controls ( $p < 0.05$ ). All statistical analyses were conducted with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## Results

### Effects of fish oil supplementation on spleen, peripheral blood, bone marrow cells and cholesterol from uninfected mice

The effects of FO on spleen, peripheral blood, and bone marrow cells from uninfected mice are summarized in Table 1. After 30 days of supplementation with FO, experimental C57BL/6 mice were compared to control animals that receiving CO. FO-supplemented mice had significantly increase spleen weight ( $p < 0.01$ ) and spleen cellularity ( $p < 0.05$ ). Hematocrit and white blood cells (lymphocytes, granulocytes and leukocytes) counts did not differ between the two fat supplementation treatment groups. However, we observed a significant decrease in number of monocytes in FO-treated mice ( $p < 0.05$ ). Bone marrow cellularity was increased significantly in FO-supplemented mice compared to those supplemented with either CO or PBS ( $p < 0.05$ ). As expected, FO supplementation decreased total cholesterol in uninfected mice ( $p < 0.05$ ).

### Effects of fish oil supplementation on the course of *T. cruzi* infection

During the first 5 days post-infection (dpi), the degree of parasitemia was similar between the fat supplemented mice when compared to mice receiving PBS (Fig. 1). The parasitic load in the blood peaked on 7 dpi and was significantly higher in FO supplemented mice than in PBS- and CO-supplemented groups ( $p < 0.001$ ). C57BL/6 mice developed lower levels of parasitemia from 9 dpi, and by 17 dpi appeared to have controlled the parasite burden in the blood, independent of supplementation (Fig. 1). On the 30 dpi, all mice of the experimental and control groups were still alive and remained so until the end of the experiment (i.e., 40 dpi, data not shown).

## **Fish oil supplementation ameliorates leukopenia and thrombocytopenia in the early of *T. cruzi* infection**

C57BL/6 mice infected (12 dpi) rapidly development anemia (Fig.2a and Fig.2b) associated with leukopenia (Fig.2c) and thrombocytopenia (Fig.2d). Hematological values returned to normal by 35 dpi (Fig.2). The treatment of mice with FO ameliorated the leukopenia (Fig. 3a,  $p < 0.001$ ) and thrombocytopenia (Fig. 3b,  $p < 0.01$ ) observed on 12 dpi, however, no significant treatment effects were observed in the reticulocytes counts, hematocrit and bone marrow cellularity (Table 2). In contrast to uninfected mice, FO supplementation did not reduce the concentration of total cholesterol in the plasma of mice infected with *T. cruzi* (data not shown).

## **Effects of fish oil supplementation on body weight**

Changes in body weight associated with fat supplementation before and after infection is shown in Table 3. After 15 days of supplementation (before infection) mice supplemented with CO or FO had showed a tendency for a lower body weight gain (~ 2.9% and ~ 3.2%, respectively), when compared to the body weight gain observed in PBS-supplemented mice. During the infection, the supplementation with CO and FO showed a tendency to reduced weight loss compared to that observed in PBS-supplemented mice, on days 10 and 15 of infection (Table 3).

## **Effects of Fish oil supplementation on cardiac parasitism**

Cardiac parasitism was evaluated by counting amastigotes nests in heart collected in 12<sup>th</sup> day of infection. FO supplemented mice had fewer parasites nests in their heart tissue than mice supplemented with CO or PBS (Fig. 4a,  $p < 0.01$ ). Additionally, the amastigote

nests in the heart of PBS or CO-supplemented mice were larger and better-defined compared to parasite nests found in FO-supplemented mice (Fig. 4b).

### **Nitric oxide (NO) production**

It is well established that NO plays a crucial role in host resistance to *T. cruzi* infection. As expected, *T. cruzi* infection triggered an elevation in circulating NO (Fig. 5a) and locally in heart tissue (Fig. 5b). Importantly, FO-supplemented mice had significantly lower plasma NO on 7 dpi, compared to the PBS-treated mice (Fig. 5a,  $p < 0.05$ ). This difference was not observed in plasma on day 5 and 12 of *T. cruzi* infection (Fig. 5a). Similarly, significantly lower NO production was observed in the cardiac tissue in FO-supplemented mice compared to mice treated with either PBS or CO, but this was only significant on 12 dpi (Fig. 5b,  $p < 0.05$ ).

### **TNF- $\alpha$ production**

Ex vivo TNF- $\alpha$  production by spleen cells from infected FO-supplemented mice stimulated with antigen *T. cruzi* was elevated at 7 dpi (Fig. 6b,  $p < 0.01$ ), and no differences were observed in FO-supplemented and uninfected mice (Fig. 6a).

### **Discussion**

Dietary fish-oil (FO) supplementation has been shown to reduce inflammation in various clinical disease states and to be beneficial in experimental models of inflammation, bacterial and plasmodial infection (Blok *et al.*, 1992) and unfavorable in leishmaniasis (Blok *et al.*, 2002) and listeriosis (Fristche *et al.*, 1997). In addition, literature data indicate that dietary *n*-3 fatty acids reduce prostaglandins and leukotrienes (Calder, 2004), lipids mediators

that play an important role in oxidative stress in host defenses against *T. cruzi* (Hideko Tatakihara, *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2009; Panis *et al.*, 2011). So, we hypothesized that FO supplementation would impair the resistance of C57BL/6 mice to *T. cruzi* infection.

In the course of our experiments, we observed an increase in the spleen weight in FO-supplemented mice compared with controls (Table 1). Similar observations have been reported previously (Fritsche *et al.*, 1992; Huang & Fritsche, 1992; Irons *et al.*, 2005). This increase in spleen size is associated with increased cellularity, experiments with T cell-deficient nude mice and experiments using macrophage depletion through liposomal dichloromethylene-biphosphonate revealed that the increase in spleen cellularity is T cell independent and largely due to macrophages accumulation in the spleen (Blok *et al.*, 1996). Moreover, PGE<sub>2</sub> has an important modulatory effect on hematopoiesis in mice reducing nucleated bone marrow and spleen cellularity, while blockade of PGE<sub>2</sub> biosynthesis increase bone marrow and spleen cellularity (Gentile *et al.*, 1983; Pelus & Gentile, 1988; Pelus, 1989). These data may partly explain our results obtained in the present study, since dietary supplementation with *n*-3 PUFAs in mice basically leads a decreased PGE<sub>2</sub> production capacity (Calder, 2004). It is well characterized that FO ingestion lowers cholesterol (Kromhout *et al.*, 1985) and as expected our data confirm this bioactivity (Table 1).

The increase in spleen size after dietary *n*-3 PUFAs appeared to be accompanied by increased circulating concentrations of TNF- $\alpha$  (Blok, *et al.*, 1996). In fact, peritoneal macrophages of mice fed *n*-3 fatty acids have increased TNF production capacity at the level of the single cell (Lokesh *et al.*, 1990; Blok *et al.*, 1992). However, a limitation of the present work is our reliance on the spleen as a source of immune cells including macrophages for *in vitro* analysis.

Our results shown that FO supplementation provoked an increase in the levels of TNF- $\alpha$  by spleen cells stimulated with trypomastigote antigen (Tc-Ag) when compared to TNF- $\alpha$  production by spleen cells from mice infected or infected and CO-supplemented stimulated with Tc-Ag (Fig.6 b). According, enhancement of TNF- $\alpha$  production was found in different studies with mice fed with FO (Chang *et al.*, 1992; Lokesh *et al.*, 1990), whereas others reports describe reduction of this cytokine production (Endres *et al.*, 1989; Kremer *et al.*,1990).

In fact, enhance of seric TNF- $\alpha$  production was found in *T. cruzi* infected C57BL/6 mice (Takeda *et al.*, 1995). As already mentioned, the association with the lower PGE<sub>2</sub> production observed in fish oil fed mice (Calder, 2004), could explain these findings. Reinforcing this hypothesis, we demonstrated previously that indomethacin, a potent inhibitor of prostaglandins (PG) synthesis, enhanced TNF- $\alpha$  production by spleen cell when it were stimulated with Tc-Ag (Pinge-Filho, *et al.*, 1999). Blocking PG also reduced NO synthesis by spleen cells, indicating that PG stimulated NO production.

Another possibility is that FO could suppress the inducible nitric oxide synthase (iNOS) via inhibiting the activation of transcription factor nuclear factor (NF- $\kappa$ B) (Komatsu *et al.*, 2003). Here, we found that FO-supplementation was associated a trend (non-significant) to decrease of NO production by spleen cells from infected mice stimulated with Tc-Ag, when compared to mice which not consume FO (data not shown). However, the exact mechanism of this enhancement remains to be established.

*T. cruzi* infection in mice is associated with anemia, thrombocytopenia, leucopenia and bone marrow hypoplasia (Marcondes *et al.*, 2000; Malvezi *et al.*, 2004; Estevam *et al.*, 2012). We confirm in the present study that the C57BL/6 strain of mice infected with *T. cruzi* had transient parasitemia (Fig.1) and anemia associated with reduction in platelets and leukocytes

count (Fig 2). FO supplementation had no effect on anemia, but has a significant effect on thrombocytopenia and leukopenia manifested in the early of infection (Fig.3). However, the data from this study indicate that supplementation with FO by mice prior to and during *T. cruzi* infection resulted in platelets and leukocytes counts that were not significantly different from uninfected mice. According, anemia associated with the malaria infection was also alleviated by treatment com *n*-3 PUFAs (Kumaratilake *et al.*, 1992). Furthermore, the consumption of AAFA™ (omega -3 product containing a high concentration of EPA and DHA) prior or during CPT-11 (DNA topoisomerase I inhibitor) treatment was associated with significantly higher erythrocytes counts and a trend (non-significant) to higher white blood cells counts than in mice which not consume AAFA™ (Hardman *et al.*, 2002).

During *T. cruzi* infection, NO modulates the effector leukocyte machinery through diverse mechanisms. This process involves trypanocidal effects derived from toxic-free radicals (peroxynitrite) generated after NO production, as well as regulation/enhancement of inflammatory response induced during this type of infection (revised by Gutierrez *et al.*, 2009). Our data demonstrate that the FO supplementation suppresses NO production in the plasma and in the cardiac tissue in the early of *T. cruzi* infection, at 7 dpi and 12 dpi, respectively (Fig.6). This suppression could explain the increase in the blood parasite burden (on day 7 post-infection) observed in infected and FO-supplemented mice when compared to infected mice and CO-supplemented or receiving only PBS (Fig. 1). Interestingly, despite of reduction in the NO production in the heart, FO-supplemented mice had lower parasite load in the cardiac tissue (Fig.4a). There may be some interaction between FO and nitric oxide synthase (NOS) in FO-supplemented mice that suppress NO production without modulating total NO level or inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression. In addition, the functional effects of myocardial iNOS expression are controversial, and there appear to be

intimate feedback mechanisms between iNOS expression and NO level in different pathological conditions (Shimojo *et al.*, 2006).

In conclusion, we have shown that FO supplementation ameliorates thrombocytopenia and leukopenia associated with anemia in the early of *T. cruzi* infection and modulates the production of pro-inflammatory mediators: TNF- $\alpha$  was increased, but NO production were reduced.

Clinical trials must be conducted to determine if the beneficial effects of *n*-3 PUFAs supplements seen in mice can be translated to chagasic humans undergoing therapy.

### **Acknowledgements**

The authors thank Mr Jesus A. Vargas and Adernaldo dos Santos for excellent technical assistance and Dr. Ana Lucia Dias by support to obtain the images from cardiac tissue. Maria Isabel Lovo Martins, Rosiane V. da Silva and Nagela G. Zanluqui, were supported by CAPES and CNPq fellowships, respectively.

### **References**

- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W & Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* **20**:470-475.
- Anderson M & Fritsche KL (2002) (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *J Nutr* **132**: 3566-3576.
- Anderson MJ & Fritsche KL (2004) Dietary polyunsaturated fatty acids modulate in vivo, antigen-driven CD4+ T-cell proliferation in mice. *J Nutr* **134**:1978-1983.
- Bain BJ (1997) Células Sanguíneas: Um guia prático, 2nd Ed., PP 25-51. Porto Alegre, Artes Médicas Sul LTDA.

- Blok WL, Vogels MT, Curfs JH, Eling WM, Buurman WA & van der Meer JW (1992) Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J Infect Dis* **165**:898-903.
- Blok WL, de Bruijn MF, Leenen PJ, Eling WM, van Rooijen N, Stanley ER, Buurman WA & van der Meer JW (1996) Dietary n-3 fatty acids increase spleen size and postendotoxin circulating TNF in mice; role of macrophages, macrophage precursors, and colony-stimulating factor-1. *J Immunol* **157**:5569-5573.
- Blok WL, Rovitch M, Zilberfarb V, Netea MG, Buurman WA & van der Meer JW (2002) The influence of dietary fish-oil supplementation on cutaneous *Leishmania amazonensis* infection in mice. *Cytokine* **19**:213-217.
- Borges CL, Cecchini R, Tatakihara VL, Malvezi AD, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV & Pinge-Filho P (2009) 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. *Immunol Lett* **123**:38-45.
- Brener Z (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* **4**: 389–396.
- Calder PC (2004) n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* **39**:1147-1161.
- Cardoso JE & Brener Z (1980) Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **75**: 97–104.
- Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzin. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* **1**:159-218.

Chang HR, Arsenijevic D, Pechère JC, Piguet PF, Mensi N, Girardier L & Dulloo AG (1992)

Dietary supplementation with **fish oil** enhances in vivo synthesis of tumor necrosis factor. *Immunol Lett* **34**:13-17.

Curotto de Lafaille MA, Barbosa de Oliveira LC, Lima GC & Abrahamsohn IA (1990)

*Trypanosoma cruzi*: maintenance of parasite-specific T cell responses in lymph nodes during the acute phase of the infection. *Exp Parasitol* **70**:164-174.

Dacie JV & Lewis SM (1994) Basic hematological techniques. *Practical Haematology*,

*Eighth Edition* (Dacie JV & Lewis SM, eds), pp. 49–96. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon

JG, Rogers TS, Klempner MS & Weber PC (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* **320**:265-271.

Estevam M, Malvezi AD, Borges CL, Pinge-Filho P & Appoloni CR (2012) *Trypanosoma*

*cruzi*: in vivo evaluation of iron in skin employing X-ray fluorescence (XRF) in mouse strains that differ in their susceptibility to infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**:334-342.

Fritsche K (2006) Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr* **26**:45-

73.

Fritsche K, Irons R, Pompos L, Janes J, Zheng Z & Brown C (2005) Omega-3

polyunsaturated fatty acid impairment of early host resistance against *Listeria monocytogenes* infection is independent of neutrophil infiltration and function. *Cell Immunol* **235**:65-71.

- Fritsche KL, Cassity NA & Huang SC (1992) Dietary (n-3) fatty acid and vitamin E interactions in rats: effects on vitamin E status, immune cell prostaglandin E production and primary antibody response. *J Nutr* **122**:1009-1018.
- Fritsche KL, Shahbazian LM, Feng C & Berg JN (1997) Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clin Sci (Lond)* **92**:95-101.
- Gentile P, Byer D & Pelus LM (1983) In vivo modulation of murine myelopoiesis following intravenous administration of prostaglandin E<sub>2</sub>. *Blood* **62**:1100-1107.
- Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM & Silva JS (2009) The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**:236-245.
- Hardman WE, Moyer MP & Cameron IL (2002) Consumption of an omega-3 fatty acids product, INCELL AAFA, reduced side-effects of CPT-11 (irinotecan) in mice. *Br J Cancer* **86**:983-988.
- Hideko Tatakihara VL, Cecchini R, Borges CL, Malvezi, AD, Graça-de Souza VK, Yamada-Ogattav SF, Rizzo LV & Pinge-Filho P (2008) Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 47–58
- Huang SC & Fritsche KL (1992) Alteration in mouse splenic phospholipid fatty acid composition and lymphoid cell populations by dietary fat. *Lipids* **27**:25-32.
- Irons R, Anderson MJ, Zhang M & Fritsche KL (2003) Dietary fish oil impairs primary host resistance against *Listeria monocytogenes* more than the immunological memory response. *J Nutr* **133**:1163-1169.

- Irons R, Pinge-Filho P & Fritsche KL (2005) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect the in vivo development and function of *Listeria*-specific CD4+ and CD8+ effector and memory/effector T cells in mice. *J Nutr* **135**:1151-1156.
- Kromhout D, Bosschieter EB & de Lezenne Coulander C (1985) The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* **312**:1205-1209.
- Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H & Shinohara K (2003) Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **34**:1006-1016.
- Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE & Sherman M (1990) Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum* **33**:810-820.
- Kumaratilake LM, Robinson BS, Ferrante A & Poulos A (1992) Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on *Plasmodium falciparum* and in vivo effects on *P. berghei*. *J Clin Invest* **89**:961-967.
- Lokesh BR, Sayers TJ & Kinsella JE (1990) Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol Lett* **23**:281-285.
- Malvezi AD, Cecchini R, Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV & Pinge-Filho P (2004) Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**: 69-77.

- Marcondes MCG, Borelli P, Yoshida N & Russo M (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* **2**: 347–352.
- Miguel CE, Bortoluzzi TB, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, Rocha BF, Ferrari SJ & Bestetti RB (2011) Prognostic significance of anemia in patients with chronic systolic heart failure secondary to Chagas' cardiomyopathy. *Acta Trop* **120**:219-23.
- Navarro-González JA, García-Benayas C & Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* **44**:679-6781.
- Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakihara VL, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Cecchini R, Rizzo LV & Pinge-Filho P (2011) *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp. Parasitol* **127**:58-65.
- Pelus LM (1989) Blockade of prostaglandin biosynthesis in intact mice dramatically augments the expansion of committed myeloid progenitor cells (colony-forming units-granulocyte, macrophage) after acute administration of recombinant human IL-1 alpha. *J Immunol* **143**:4171-4179.
- Pelus LM & Gentile PS (1988) In vivo modulation of myelopoiesis by prostaglandin E2. III. Induction of suppressor cells in marrow and spleen capable of mediating inhibition of CFU-GM proliferation. *Blood* **71**:1633-1640.
- Pinge-Filho P, Tadokoro CE & Abrahamsohn IA (1999) Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* **193**:90-98.

- Repka D, Rangel HA, Atta AM, Gavino VA & Piedrabuena AE (1985) Experimental Chagas's diseases in mice infected with one LD50 of parasite. *Rev Bras Biol* **45**: 309–316.
- Roggero E, Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, Bottasso OA & del Rey A (2006) Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol* **190**:495-503.
- Silva LHP & Nussenzweig V (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* **20**: 191–203.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC & Cunha FQ (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* **63**:4862-4867.
- Shimojo N, Jesmin S, Zaedi S, Soma M, Kobayashi T, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, & Miyauchi T (2006) EPA effect on NOS gene expression and on NO level in endothelin-1-induced hypertrophied cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* **231** (6):913-918.
- Stuehr DJ & Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* **169**:1543-1555.
- Tadokoro CE & Abrahamsohn IA (2001) Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN-gamma production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunol Lett* **77**:31-38.
- Takeda GK, Starobinas N, Marcondes MC, Mello EA, Russo M & Stolf AM (1995) Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in *Trypanosoma cruzi* infected C57BL/6 mice. *Acta Trop* **60**:215-219.

Theodoropoulos TAD, Silva AG & Bestetti RB (2010) Eosinophil blood count and anemia are associated with *Trypanosoma cruzi* infection reactivation in Chagas' heart transplant recipients. *Int J Cardiol* **145**: 55-56.

Trischmann TM (1986) *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* **62**: 194-201.

Wang J, Ma H, Wang J, Li Q, Li Y & Li J (2007) Long-term n-3 polyunsaturated fatty acids administration ameliorates arteriosclerosis by modulating T-cell activity in a rat model of small intestine transplantation. *Clin Chim Acta* **381**:124-30.

Figure 1

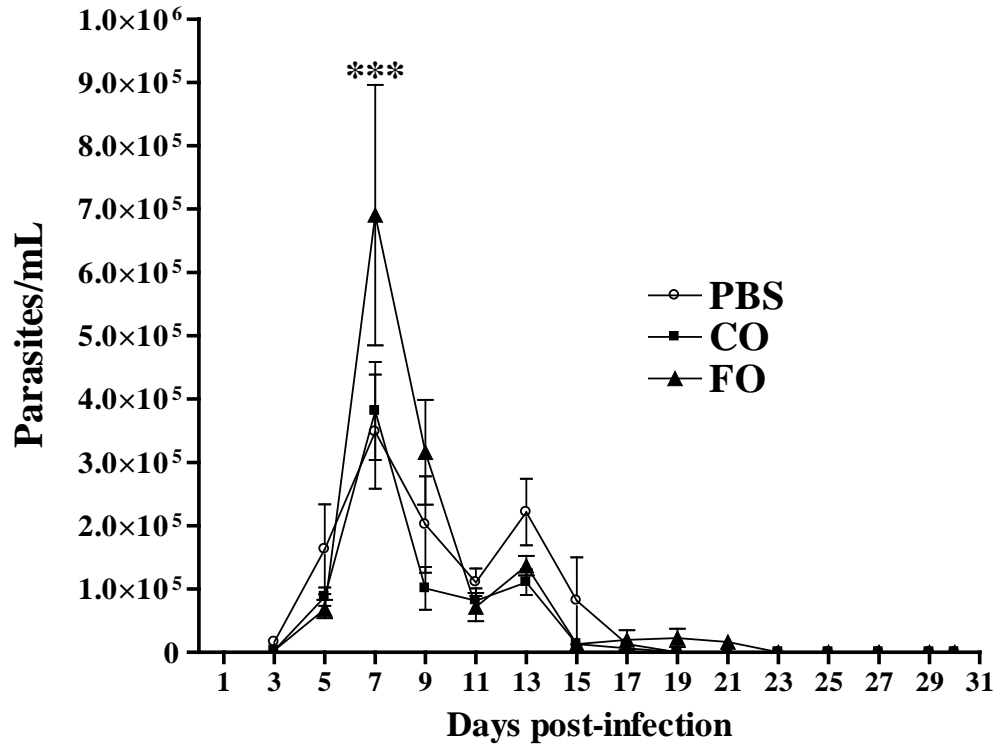


Figure 2

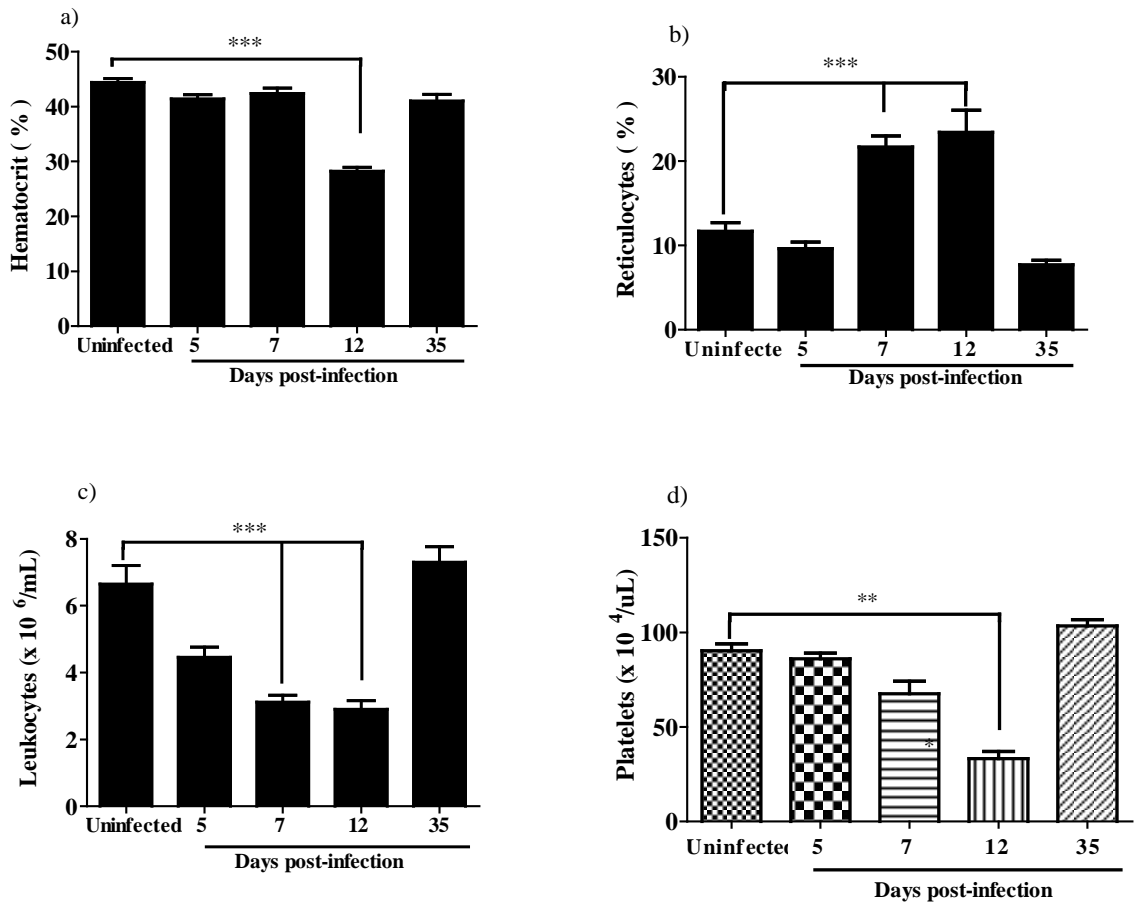


Figure 3

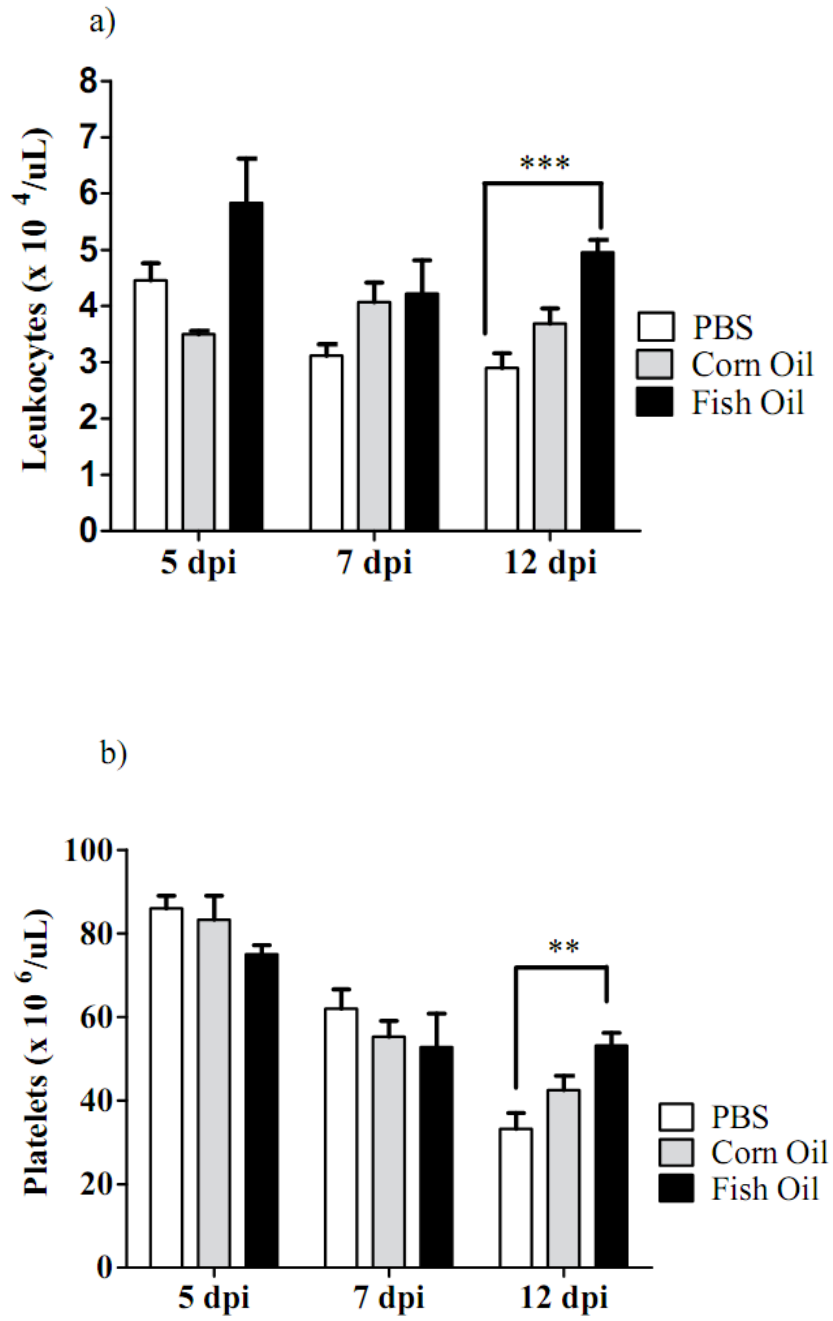
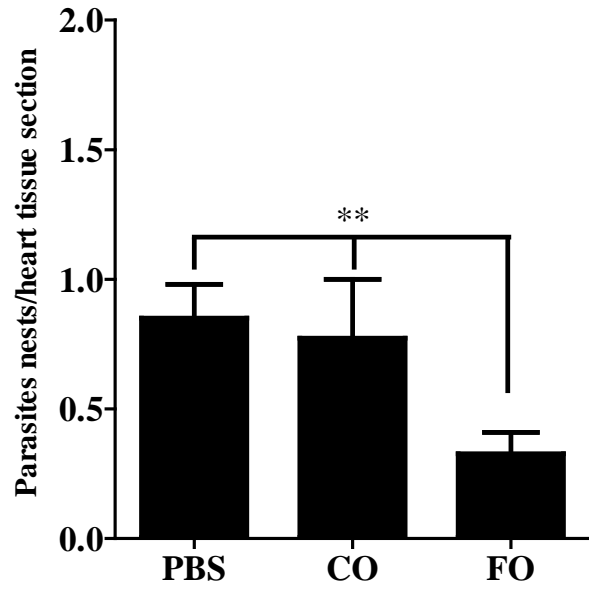


Figure 4

a)



b)

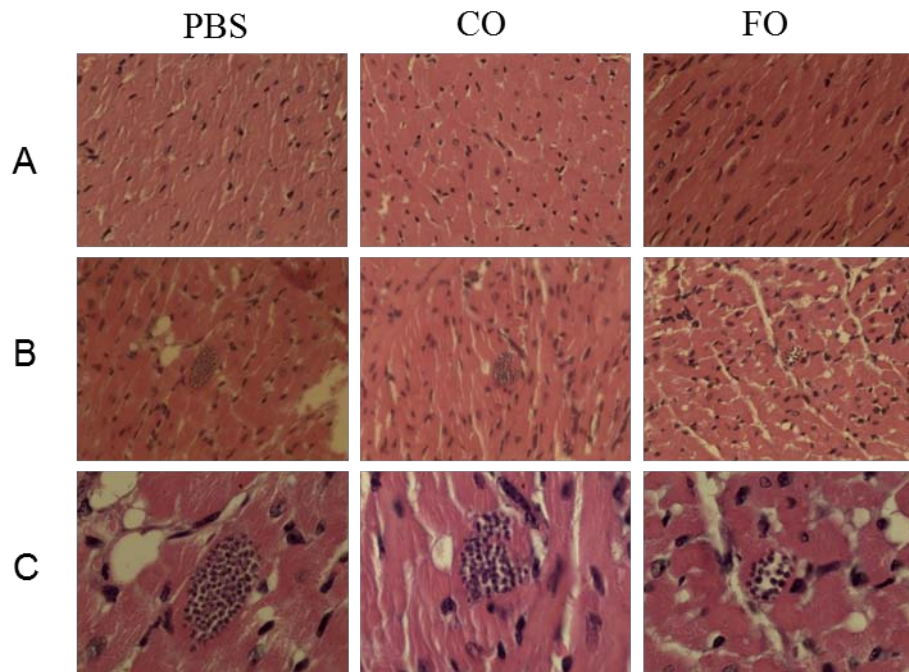


Figure 5

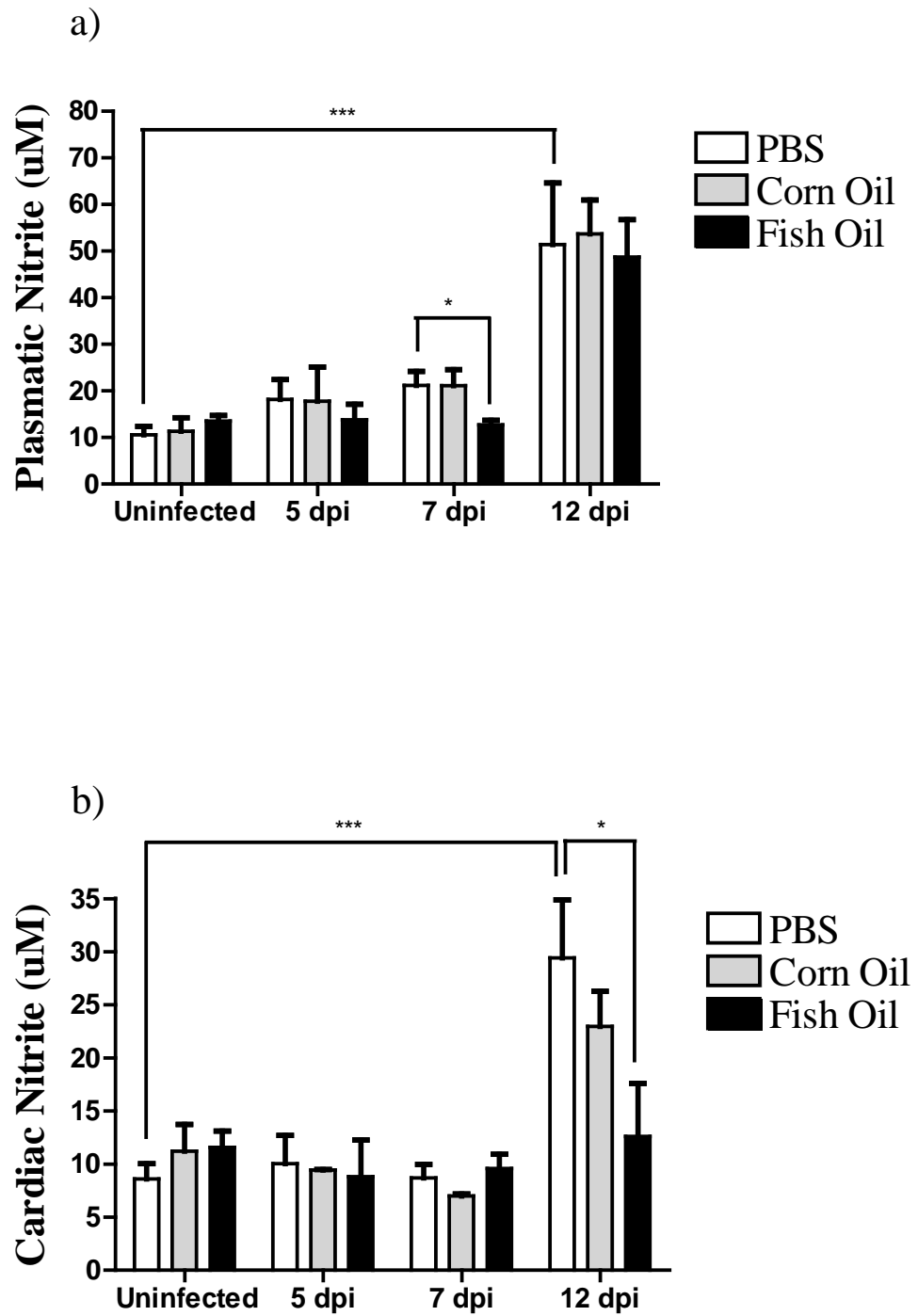
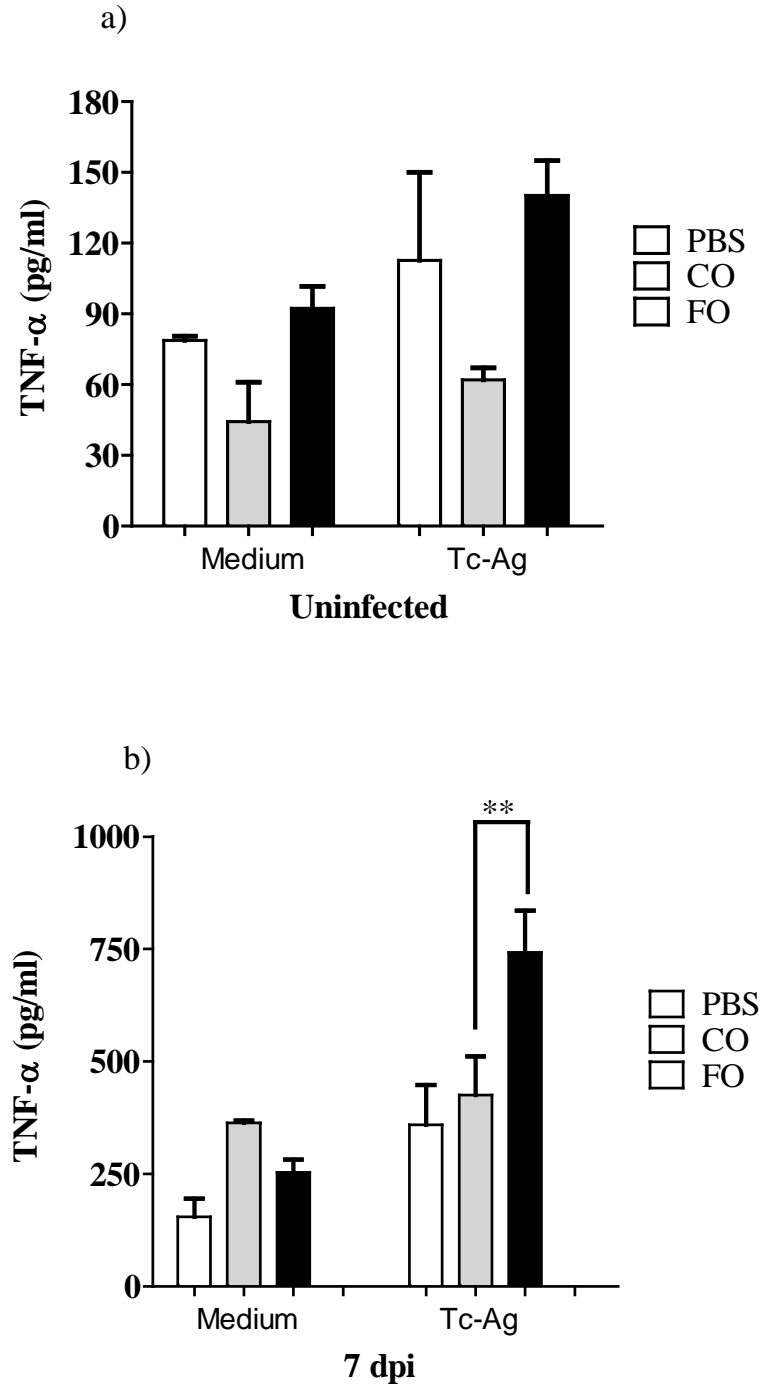


Figure 6



## Legend of Figures

**Figure 1.** Effects of PUFAs supplementation on course of *T. cruzi* infection. From 15 days before of *T. cruzi* infection to the 30<sup>th</sup> day post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), 0.6% V/W (mL per g body weight), as control group; 2) corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) fish oil (FO), 0.6% V/W. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Parasitemia was quantified as trypomastigotes per milliliter of blood. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error from of 5 mice per group, in an experiment representative of two similar experiments.

\*\*\*  $p < 0.001$ , significant difference in parasitemia.

**Figure 2.** Hematological values in *T. cruzi* infected mice. Groups of C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). We conducted measured of several hematological values: (a) hematocrit, (b) reticulocytes, (c) leukocytes and (d) platelets counts in uninfected and *T. cruzi*-infected mice at 5, 7, 12 and 35 dpi. Values represent the mean  $\pm$  standard error and are representative of four independent experiments, using 5-10 mice per group.

\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) when compared to control group (uninfected).

\*\*\* Significantly different ( $p < 0.001$ ) when compared to control group (uninfected).

**Figure 3.** Effects of PUFAs supplementation on leukopenia and thrombocytopenia in *T. cruzi* infected mice. From 15 days before of *T. cruzi* infection to the 12<sup>th</sup> day post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), 0.6% V/W (mL per g body weight), as control group; 2) corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) fish oil (FO), 0.6% V/W. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). We conducted leukocytes (a) and platelets (b) counts in *T. cruzi*-infected mice at 5, 7, and 12 dpi. Values represent the mean  $\pm$  standard error and are representative of four independent experiments, using 5-10 mice per group.

\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) when compared to control group (PBS).

\*\*\* Significantly different ( $p < 0.001$ ) when compared to control group (PBS).

**Figure 4.** Effects of PUFAs supplementation on amastigote nests in cardiac tissue of C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* (day 12 after infection). From 15 days before of *T. cruzi* infection to the 12<sup>th</sup> day post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), 0.6% V/W (mL per g body weight), as control group; 2) corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) fish oil (FO), 0.6% V/W. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). (a) Three heart sections were counted for each animal and the result is expressed as mean  $\pm$  standard error this three sections from five animals per group, and are representative of two independent experiments. (b) Cardiac tissue were examined by HE staining from uninfected mice (A), on day 12 after *T. cruzi* infection (B and C). Original magnifications are x400 (A and B) and x1000 (C).

\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) when compared with control group (PBS or CO supplemented).

**Figure 5.** Effects of PUFAs supplementation on nitric oxide (NO) production in mice infected with *T. cruzi*. From 15 days before of *T. cruzi* infection to the 12<sup>th</sup> day post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), 0.6% V/W (mL per g body weight), as control group; 2) corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) fish oil (FO), 0.6% V/W. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). NO was estimated by measuring nitrite levels in plasma (a) and cardiac tissue (b) employing the cadmium-cooper system followed by Griess reaction. The results is expressed as mean  $\pm$  standard error from 5 animals per group, and is representative of two independent experiments.

\* Significantly different ( $p < 0.05$ ) when compared to control group (PBS)

\*\*\* Significantly different ( $p < 0.001$ ) when compared to control group (uninfected).

**Figure 6.** Effects of PUFAs supplementation on ex vivo production of TNF- $\alpha$  by spleen cells from mice infected with *T. cruzi*. From 15 days before of *T. cruzi* infection to the 7<sup>th</sup> day post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), 0.6% V/W (mL per g body weight), as control group; 2) corn oil (CO), (0.6% V/W); 3) fish oil (FO), 0.6% V/W. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Splenocytes ( $4 \times 10^5$  cells/well) from uninfected or *T. cruzi*-infected mice were co-cultured with and without Tc-Ag. Supernatants were harvested after 72 h and TNF- $\alpha$  quantified in supernatants by ELISA. The results are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean from 3 animals per group, and is representative of two independent experiments.

\*\* Significantly different ( $p < 0.01$ ) when compared with control group (CO).

**Table 1**

Table 1. Effect of PUFAs supplementation on spleen, peripheral blood, bone marrow cells and cholesterol in uninfected C57BL/6 mice<sup>1</sup>

	Group			<i>p</i>
	PBS	Corn Oil	Fish Oil	
<b>Spleen</b>				
Spleen weight (g)	0.080 ± 0.01	0.079 ± 0.02	0.087 ± 0.01	<0.01
Spleen cellularity (x10 <sup>6</sup> )	88.5 ± 9.6	96.0 ± 10.2	126.6 ± 6.3	<0.05
<b>Peripheral blood</b>				
Hematocrit (%)	43.4 ± 2.5	43.8 ± 2.2	44.1 ± 1.3	NS
Platelets (x10 <sup>4</sup> /mL)	90.2 ± 13.5	96.7 ± 15.2	86.2 ± 13.2	NS
Reticulocytes (%)	11.0 ± 3.1	10.6 ± 1.7	8.9 ± 1.6	NS
Leukocytes (x10 <sup>6</sup> /mL)	6.3 ± 1.6	5.7 ± 0.6	6.1 ± 1.7	NS
Lymphocytes (x10 <sup>6</sup> /mL)	4.5 ± 1.1	4.2 ± 0.8	4.2 ± 1.2	NS
Neutrophils (x10 <sup>6</sup> /mL)	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4	NS
Monocytes (x10 <sup>6</sup> /mL)	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	<0.05
<b>Bone Marrow</b>				
Cellularity (x10 <sup>9</sup> /mL)	5.7 ± 4.5	5.5 ± 8.2	7.1 ± 1.4	<0.05
<b>Cholesterol</b>				
Total Cholesterol (mg/dL)	73.3 ± 3.0	88.5 ± 8.4	54.5 ± 3.0	<0.01

<sup>1</sup> C57BL6 mice were supplemented daily with: 1) phosphate buffer saline (PBS), as a control group (0.6% V/W), 2), Corn oil, (0.6% V/W), or 3) Fish oil, (0.6% V/W) during 30 days. Values are means ± SEM, (n= 5 mice/group). Results were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test. *p* = significant difference from the fish oil mean compared to CO mean. NS = not significant (*p* > 0.05).

**Table 2**

Table 2: Effects of PUFAs supplementation on spleen, peripheral blood, and bone marrow cells of *T. cruzi* infected-mice on day 12 post infection<sup>1</sup>

	Group			<i>p</i>
	PBS	Corn Oil	Fish Oil	
<b>Spleen</b>				
Relative spleen weight (g)	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.6 ± 0.03	<0.05
Spleen cellularity (x10 <sup>6</sup> )	306 ± 44	351 ± 41	601 ± 1	<0.01
<b>Peripheral blood</b>				
Hematocrit (%)	28.2 ± 0.7	28.1 ± 0.6	28.9 ± 0.9	NS
Reticulocytes (%)	24.9 ± 2.5	28.0 ± 2.6	28.2 ± 2.8	NS
Lymphocytes (x10 <sup>6</sup> /mL)	1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	<0.001
Neutrophils (x10 <sup>6</sup> /mL)	0.9 ± 0.08	0.8 ± 0.07	0.9 ± 0.05	NS
Monocytes (x10 <sup>6</sup> /mL)	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.02	<0.05
<b>Bone Marrow</b>				
Cellularity (x10 <sup>9</sup> /mL)	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.3	NS

<sup>1</sup> From 15 days before *T. cruzi* infection to the day 12 post-infection, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), as a control group (0.6% V/W); 2) Corn oil, (0.6% V/W) or 3) Fish oil, (0.6% V/W). The mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Values are means ± SEM, (n= 5 mice/group). Results were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test. *p* = significant difference from the fish oil mean compared to PBS mean. NS = not significantly.

**Table 3**

Table 3. Weight variation in different experimental groups compared to weights at time zero (first day of PUFAs supplementation)<sup>1</sup>

Group	% weight variation during supplementation (days)			% weight variation during infection (days)		
	5	10	15	5	10	15
Non-supplemented/uninfected	+ 4.3	+ 8.9	+ 9.9	+ 9.2	+ 9.2	+ 13.4
PBS	+ 3.9	+ 8.5	+ 10.2	+ 5.4	- 6.4	- 4.4
CO	+ 1.4	+ 5.1	+ 7.3	+ 6.1	+ 2.8	+ 1.4
FO	+ 1.2	+ 5.1	+ 7.0	+ 5.9	+ 1.5	+ 0.3

<sup>1</sup> From 15 days before *T. cruzi* infection to the day 15 post-infection C57BL/6 mice were supplemented by gavage with: 1) phosphate buffer saline (PBS), as a control group (0.6% V/W); 2) Corn oil, (0.6% V/W) or 3) Fish oil, (0.6% V/W). C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain).  $n = 20-25$  per group. Values represented four independent experiments.