

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Clínica Médica**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina**  
**Tropical**

César Luís Nascimento Barbosa

**Papel de SOCS-2 e da enzima 5-LO durante a infecção experimental por**  
***Trypanosoma cruzi*: alteração da microbiota e proteção intestinal**

Belo Horizonte  
2021

César Luís Nascimento Barbosa

**Papel de SOCS-2 e da enzima 5-LO durante a infecção experimental por  
*Trypanosoma cruzi*: alteração da microbiota e proteção intestinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Simão Machado

Coorientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Belo Horizonte  
2021

B238p Barbosa, César Luís Nascimento.  
Papel de SOCS-2 e da enzima 5-LO durante a infecção experimental por Trypanosoma cruzi [recurso eletrônico]: alteração da microbiota e proteção intestinal. / César Luís Nascimento Barbosa. - - Belo Horizonte: 2021.  
54f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Fabiana Simão Machado.  
Coorientador (a): Caio Tavares Fagundes.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Alergia e Imunologia. 2. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. 3. Parasitologia. 4. Doenças Negligenciadas. 5. Microbiota. 6. Dissertação Acadêmica. I. Machado, Fabiana Simão. II. Fagundes, Caio Tavares. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.  
NLM: QW 568



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às **09:30** horas do dia 26 de fevereiro de 2021, por videoconferência pela plataforma LIFESIZE (<https://youtu.be/rSai6tLoYIE>), da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a 383ª defesa de dissertação de **CESAR LUIS NASCIMENTO BARBOSA**, número de registro 2019657591, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube a professora **FABIANA SIMÃO MACHADO**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROFA. FABIANA SIMÃO MACHADO - ORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. CAIO TAVARES FAGUNDES - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. LÍZIA MARIA ESPER (INSTITUTO BUTANTAN/UFMG)**, **PROF. LUIS HENRIQUE FRANCO (UFMG)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Papel de SOCS-2 e da enzima 5-LO durante a infecção experimental por Trypanosoma cruzi: alteração da microbiota e proteção intestinal**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Lisia Maria Esper**, Usuário Externo, em 01/03/2021, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes**, Professor do Magistério Superior, em 01/03/2021, às 10:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Simão Machado**, Professora do Magistério Superior, em 01/03/2021, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Henrique Franco**, Professor do Magistério Superior, em 01/03/2021, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0592216 e o código CRC 6DA1C0F6.



Aos meus familiares em especial minha mãe Eva e minha vó Geralda que sempre me encorajaram a ser um ser humano melhor, cuidaram de mim em todos os momentos da minha vida e me fizeram ser o homem que sou hoje. Aos meus amigos principalmente a Rayane Rabelo, Maycon Douglas e João Otávio que sempre estiveram me encorajando e enfrentando momentos difíceis, mas também compartilharam da minha felicidade. À Lisia Maria Esper, obrigado por ter mudado a minha sorte e o meu caminhar, por ter sido luz em minha vida e de minha mãe, você é um ser humano indescritível. À Fabiana Simão Machado por ter acreditado em mim e ter visto potencial onde muitas vezes eu mesmo duvidava ter, você é uma inspiração a se seguir. À Jacqueline Barbosa por ser mais que uma técnica para gente, por ser uma mãe que nos acolhe e nos ensina sobre valores da vida através de conselhos valiosos. Aos meus filhos Apollo, Safira e Simba (meus cachorros) por serem minha dose diária de alegria quando estou desanimado. E por último, mas não menos importante, a mim mesmo César Luís Nascimento Barbosa, espero que no futuro você esteja lendo essa dissertação com outros olhos, e que possa ver o quanto valeu a pena enfrentar cada desafio para ter chegado aonde você chegou.

## **AGRADECIMENTOS**

Á minha orientadora Prof. Dra. Fabiana Simão Machado a qual me ensinou desde o primeiro dia o valor de se trabalhar com companheirismo e disciplina, me ensinou que é possível vencer desafios se tivermos confiança, mas principalmente dedicação e acreditarmos em nós mesmos, pois o nosso sucesso depende unicamente das escolhas que fazemos.

Á meu orientador Caio Tavares Fagundes que sempre esteve disposto a me ensinar, e colaborar para meu crescimento durante essa jornada acadêmica.

Ao grupo Imunofarmacologia e de Microbiologia da UFMG por disponibilizarem o espaço e materiais necessários para elaboração de todos os experimentos.

Á Rayane Rabelo por estar comigo desde meu primeiro dia no laboratório quando ainda era IC, esteve participante em todos os meus experimentos e sempre se mostrou disposta a me auxiliar e ensinar.

Á todos os meus colegas do laboratório LIDIN Rayane, Rafaela, Fernanda, Mariana, Allysson, Paulo, Natalia, Samuel, Diego, Ana e Maycon pelos momentos de companheirismo, troca de experiências, mas principalmente pelo carinho e acolhimento de todos.

Ao Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical e todos os membros do grupo.

Á Fapemig, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar (William Shakespeare 1599).

## RESUMO

A Doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, por ser uma doença que tem maior incidência em países da América Latina, acaba se tornando negligenciada. O grande problema dessa doença é que na fase crônica a taxa de cura é muito baixa, podendo ser desenvolvido complicações cardíacas (20-30%) e/ou digestivas (10-15%). Estudos têm demonstrado a importância de mediadores lipídicos frente a infecções parasitárias regulando a homeostase do organismo do hospedeiro. A microbiota intestinal é descrita na literatura como um dos grandes pilares da resposta imunológica adaptativa e que se comunica com diversos sistemas como o sistema nervoso central e o sistema respiratório. Neste trabalho o nosso objetivo foi elucidar o papel da proteína Supressor de sinalização de citocinas (SOCS)-2 e da enzima 5-lipoxigenase (LO) durante infecção experimental por *T. cruzi* principalmente na alteração da composição microbiota intestinal frente essa doença. Para realização do experimento utilizamos camundongos nocautes (KO) para nossas proteínas alvos. Os animais foram infectados ou não por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A deficiência de 5-LO favoreceu o aumento da parasitemia durante o 5º e 7º dpi em comparação ao seu grupo selvagem (WT), enquanto SOCS-2 não teve essa mesma diferença, sugerindo que a enzima 5-LO desempenha um papel importante durante a resposta contra *T. cruzi*. Os animais infectados de todos os grupos começaram a ter uma perda de peso bastante significativa a partir do 7º dpi, durante o pico da parasitemia, a taxa de mortalidade foi maior nos animais SOCS2 KO, mas não nos 5-LO KO, infectados em comparação aos WT. Em relação á microbiota, a presença da enzima 5-LO e a ausência de SOCS-2 favoreceu a expansão de enterobactérias, indicativo de disbiose da microbiota intestinal. A ausência de SOCS-2 resulta no aumento da inflamação intestinal/cólon durante a infecção. Coletivamente os nossos dados sugerem que a enzima 5-LO e SOCS-2 tem um papel importante durante a infecção por *T. cruzi*, controlando a expansão de enterobactérias, e que a proteína SOCS-2 é essencial na proteção de dano intestinal/cólon.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; SOCS-2; 5-LO; microbiota; mediadores lipídicos.

## ABSTRACT

The Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, being a disease that has a higher incidence in Latin American countries, ends up becoming neglected. The big problem with this disease is that in the chronic phase the cure rate is very low, with cardiac (20-30%) and / or digestive (10-15%) complications. Studies have demonstrated the importance of lipid mediators in the face of parasitic infections regulating the homeostasis of the host organism. The intestinal microbiota is described in the literature as one of the main pillars of the adaptive immune response and that communicates with several systems such as the central nervous system and the respiratory system. In this work, our objective was to elucidate the role of the cytokine signaling suppressor protein (SOCS) - 2 and the enzyme 5-lipoxygenase (LO) during experimental infection by *T. cruzi* mainly in altering the intestinal microbiota composition against this disease. To carry out the experiment we used knockout mice (KO) for our target proteins. The animals were infected or not intraperitoneally with 1000 trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi*. The 5-LO deficiency favored an increase in parasitemia during the 5th and 7th dpi compared to its wild group (WT), while SOCS-2 did not have the same difference, suggesting that the 5-LO enzyme plays an important role during the answer against *T. cruzi*. The infected animals of all groups started to have a very significant weight loss from the 7th dpi, during the peak of the parasitemia, the mortality rate was higher in the SOCS2 KO animals, but not in the 5-LO KO, infected in compared to WT. Regarding the microbiota, the presence of the enzyme 5-LO and the absence of SOCS-2 favored the expansion of enterobacteria, indicative of dysbiosis of the intestinal microbiota. The absence of SOCS-2 results in increased intestinal colon inflammation during infection. Collectively our data suggest that the enzyme 5-LO and SOCS-2 plays an important role during infection by *T. cruzi*, controlling the expansion of enterobacteria, and that the SOCS-2 protein is essential in protecting against intestinal/colon damage.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; SOCS-2; 5-LO; microbiota; lipid mediators.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA- Ácido Araquidônico  
AhR – Aril-hidrocarbono  
ATL – Lipoxina Desencadeada por Aspirina  
BZ – Benzonidazol  
COX – Cicloxigenase  
CD – Células Dendríticas  
DC - Doença de Chagas  
GALT – Tecido Linfoide Associado ao Intestino  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
IL – Interleucina  
INF – Interferon  
I.P – Intraperitoneal  
KO – Nocaute  
LO- Lipoxigenase  
LP- Corpo Lipídico  
LT – Leucotrieno  
LX A4 – Lipoxina  
MO – Macrófagos  
NF – Nifurtimox  
NK – Assassina Natural  
NO- Óxido Nítrico  
PP- Placa de Peyer  
SH2 – Hidrogeno sulfeto  
SOCS-2 – Supressor de Sinalização de Citocina 2  
Tc – Trypanosoma cruzi  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia  
UFMG – Universidade Federal  
WT – Tipo Selvagem  
5LO - 5-Lipoxigenase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – CICLO BIOLÓGICO DO <i>T. cruzi</i> .....	16
Figura 2 – IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA DURANTE INFECÇÃO POR <i>Tc</i> .....	17
Figura 3 – VIA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	21
Figura 4 – DEFICIÊNCIA DE 5-LO, MAS NÃO DE SOCS2, RESULTA NO AUMENTO DA PARASITEMIA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Tc</i> .....	31
Figura 5 – A INFECÇÃO POR <i>Tc</i> RESULTA NA REDUÇÃO DE PESO EM CAMUNDONGOS NOCAUTES DE 5-LO E SOCS-2.....	32
Figura 6 – A INFECÇÃO POR <i>Tc</i> LEVA A MORTE DE CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA 5-LO E SOCS-2.....	33
Figura 7 – A PRESENÇA DA ENZIMA 5-LO FAVORECE A EXPANSÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Tc</i> .....	34
Figura 8 – A DEFICIÊNCIA DE SOCS-2 AUMENTA O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO INTESTINO/CÓLON DURANTE A INFECÇÃO.....	35

## SUMÁRIO

<b>1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	12
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
3.1 Doença de Chagas.....	14
3.2 Epidemiologia.....	14
3.3 Ciclo do Parasito.....	15
3.4 Imunomodulação durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	17
3.5 Manifestações clínicas.....	18
3.6 Tratamento.....	19
3.7 Cepa Y <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
3.8 Ácido araquidônico (AA) e mediadores lipídicos.....	20
3.9 Lipoxinas.....	20
3.10 Supressor de Sinalização de Citocinas (SOCS-2) .....	21
3.11 Microbiota Intestinal.....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
5.1 Animais para experimentação.....	30
5.2 Manutenção da cepa Y.....	30
5.3 Infecção e parasitemia .....	30
5.4 Análise de peso e sobrevivência.....	30
5.5 Carga bacteriana fecal.....	31
5.6 Análises Estatísticas.....	32
<b>6. RESULTADOS</b> .....	32
6.1 Deficiência de 5-LO, mas não de SOCS2, resulta no aumento da parasitemia durante a infecção experimental por <i>Tc</i> .....	32
6.2 A infecção por <i>Tc</i> resulta na redução de peso significativamente tanto em grupos WT quanto 5-LO KO e SOCS-2 KO.....	33
6.3 Deficiência de SOCS-2, mas não de 5-LO, aumenta a taxa de mortalidade durante a infecção por <i>Tc</i> .....	34
6.4 A presença da enzima 5-LO e a ausência de SOCS-2 favorece a expansão das enterobactérias durante a infecção por <i>T. cruzi</i> .....	35
6.5 A deficiência de SOCS-2 aumenta o processo inflamatório no intestino/cólon durante a infecção.....	36
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	43

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Tripanossomíase Americana mais conhecida como Doença de Chagas foi descoberta a mais de um século e ainda hoje é considerada uma das doenças negligenciadas que causam em torno de 12.000 mortes anuais e afeta cerca de 12 a 14 milhões de pessoas somente na América Latina (Caso et al., 2019). Para compreender o perfil dessa doença é necessário entender quais os mecanismos de ação estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da patogênese. Existem muitos estudos na literatura que buscam elucidar a resposta imune frente a doença (Esper et al., 2014) e padrões moleculares do parasito (Schwabl et al., 2020) para que se possa assim procurar por possíveis curas ou tratamentos da doença (Rassi et al., 1999).

Dessa forma nosso estudo abrange o entendimento dessa doença em diversas áreas da ciência como as doenças infecciosas tropicais, imunologia, microbiologia e parasitologia. Nosso objetivo é colaborar com o desenvolvimento científico-social de forma a trazer perspectivas e ferramentas para a literatura, agregando assim com a pesquisa e com novos alvos terapêuticos para a Doença de Chagas.

Este estudo em ciência básica foi realizado através de modelo experimental murino no Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN), Departamento de Bioquímica e Imunologia e Laboratório de Interação Microrganismo-hospedeiro (LIMHO) Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

## 2.INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*Tc*) é uma doença negligenciada disseminada mundialmente. Estima-se que haja cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas somente na América Latina, segundo dados do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Atualmente o único tratamento existente é o uso de Benzonidazol ou Nifurtimox, caso o paciente tenha alguma resistência ao primeiro medicamento, ambos atuam reduzindo a parasitemia e reativação da doença, mas não proporcionam a cura na fase aguda da doença (Rassi et al;1999).

É descrito na literatura que os mediadores lipídicos desempenham um papel fundamental durante infecções parasitárias, desencadeando respostas pró e anti-inflamatórias que podem intensificar ou não a patogênese e o ciclo da doença. A cascata do Ácido Araquidônico é responsável pela síntese de alguns desses mediadores lipídicos como a lipoxina. A lipoxina, induzida pela via da enzima 5-Lipoxigenase (LO), induz a expressão de SOCS- 2 através de interação com o receptor Aril-hidrocarbono (AhR) (Machado et al., 2006).

A microbiota intestinal é responsável por exercer funções críticas na digestão de alimentos como fibras produzindo ácidos graxos de cadeia curta que, por sua vez, têm ação anti-inflamatória, na produção de nutrientes essenciais como vitamina K e na proteção contra a invasão da mucosa por agentes infecciosos (Custódio das Dôres, Rupp de Paiva and Campana, 2001). Entretanto, o papel da microbiota durante a infecção por *Tc* e a participação de SOCS-2 e mediadores lipídicos na sua composição/perfil ainda não é conhecido.

## 3.REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) também conhecida como tripanossomíase americana é uma doença negligenciada causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* (Tc) e é amplamente distribuída geograficamente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que exista entre 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo inteiro, principalmente na América Latina (Chagas Disease (American Tripanossomíases) 2020). No Brasil, os dados são imprecisos, mas o Ministério da Saúde estima algo entre 1,9 milhão e 4,6 milhões de pessoas infectadas. A DC já foi considerada uma infecção restrita somente à América Latina, porém com o passar dos anos e com a globalização/imigração, ela se disseminou para outros continentes se tornando assim uma doença com alta taxa de morbimortalidade (Dias et al., 2016).

A DC teve sua descoberta e primeiro caso relatado em 14 de abril de 1909 onde a primeira paciente, uma menina brasileira chamada Berenice Soares de Moura, foi diagnosticada para essa doença pelo Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Chagas, 1909) (Rodrigues Coura et al., no date). O médico após examinar o sangue da criança febril encontrou o parasita flagelado o qual propôs o nome de Tc em homenagem ao seu amigo e mentor Oswaldo Cruz (Da Silveira et al., 2016). Nessa mesma data em abril de 2019 foi definido como o Dia Mundial da DC, em que visibiliza uma das doenças tropicais mais negligenciadas, priorizadas pela OMS, pois continua a afetar milhões de pessoas em todo o mundo, e em 2020 foi comemorado o primeiro ano pela comunidade global (OPAS/OMS Brasil - Dia Mundial Da Doença de Chagas: Trazendo Uma Doença Esquecida à Atenção Mundial, 2020).

### 3.2 Epidemiologia

Na América Latina, a DC continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10 mil mortes por ano. A infecção causada pelo Tc existiu entre os animais silvestres, mas depois se espalhou para animais domésticos e seres humanos, com relativa intensificação observada no

início do século 20 (Martinez-Perez et al., 2016). Por muitas décadas, a DC foi uma doença estritamente rural, no entanto as mudanças socioeconômicas, o êxodo rural, o desmatamento e a urbanização transformaram o perfil epidemiológico da doença, tornando-a um fenômeno mais urbano / periurbano. (World Health Organization - WHO 2018).

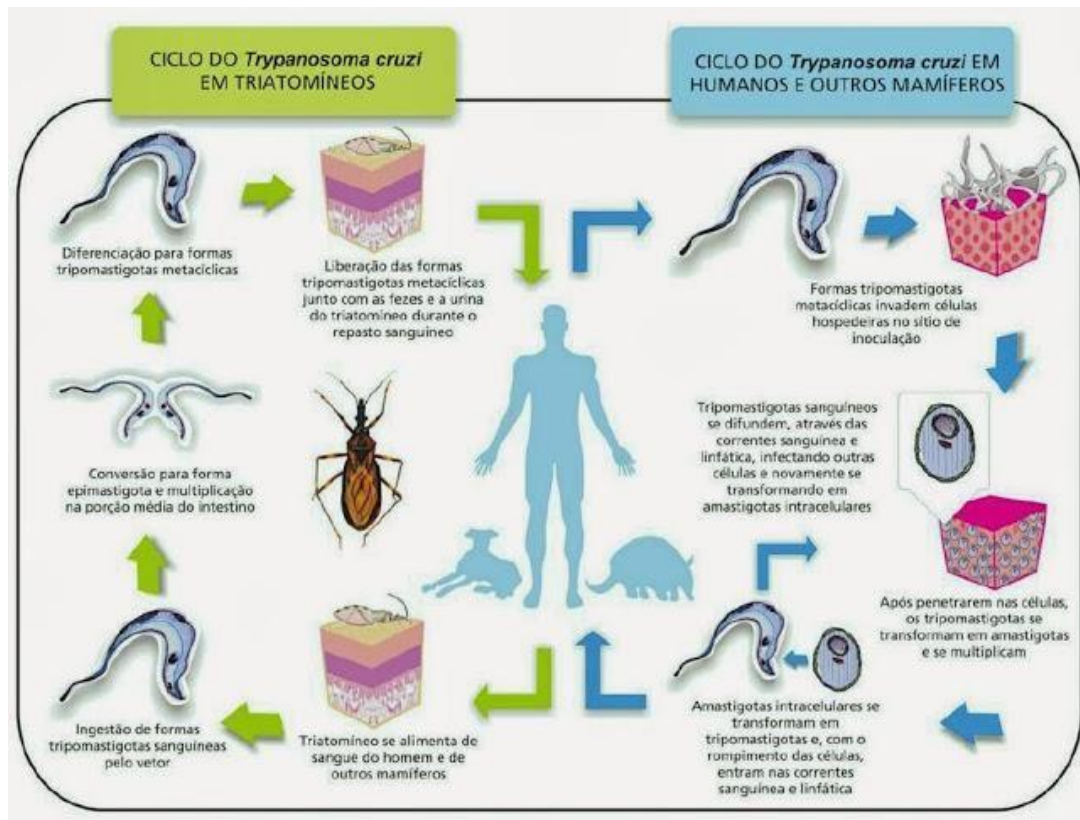
No Brasil, a vigilância da DC aguda (DAC) envolve notificação obrigatória, o que permite estudos epidemiológicos de base populacional. Essa análise de base de dados populacionais nacionais de notificações da DAC no Brasil utiliza dados de vigilância secundária do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mantido pelo Ministério da Saúde do Brasil. Foram incluídos dados entre 2001 e 2018, um total de 5.184 casos de DAC foram registrados durante o período em estudo. A taxa de incidência anual no Brasil foi de 0,16 por 100.000 habitantes / ano (Santos et al., 2020).

### 3.3 Ciclo do Parasito

O parasito possui um ciclo biológico complexo do tipo heteroxênico (dois hospedeiros) e passa por diferentes formas evolutivas no interior do hospedeiro vertebrado (homem, quatis, mucuras, tatu, morcego, paca, porco-espinho, macacos, gambá, cães, gato, entre outros) e nos insetos vetores: *Triatoma infestans*, *Triatoma sórdida*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, entre outros (Ramírez and Hernández, 2018).

O ciclo biológico do *Tc* no hospedeiro vertebrado e invertebrado apresenta várias formas evolutivas: tripomastigotas, amastigotas, epimastigotas e esferomastigotas (Costa et al., 2013), no hospedeiro vertebrado este parasita encontra-se em duas formas: tripomastigota (encontrada na circulação), que é a forma sanguínea infectante de células nucleadas (incluindo células dendríticas (CDs), musculares, nervosas, macrófagos (MOs) e fibroblastos), flageladas, móveis e não replicativas, e a forma amastigota (encontrada nos tecidos), que se replica no citosol da célula do hospedeiro, sendo necessário a invasão e a replicação celular para a conservação do ciclo de vida do parasita e indução da doença (Coura and De Castro, 2002).

Ao se multiplicar no interior das células como formas amastigotas esse parasito começa a se diferenciar novamente em tripomastigotas que com seu intenso movimento flagelar acaba por romper as células do hospedeiro e indo para corrente sanguínea dando prosseguimento ao ciclo, (**Figura 1**) (Junqueira et al., 2010).

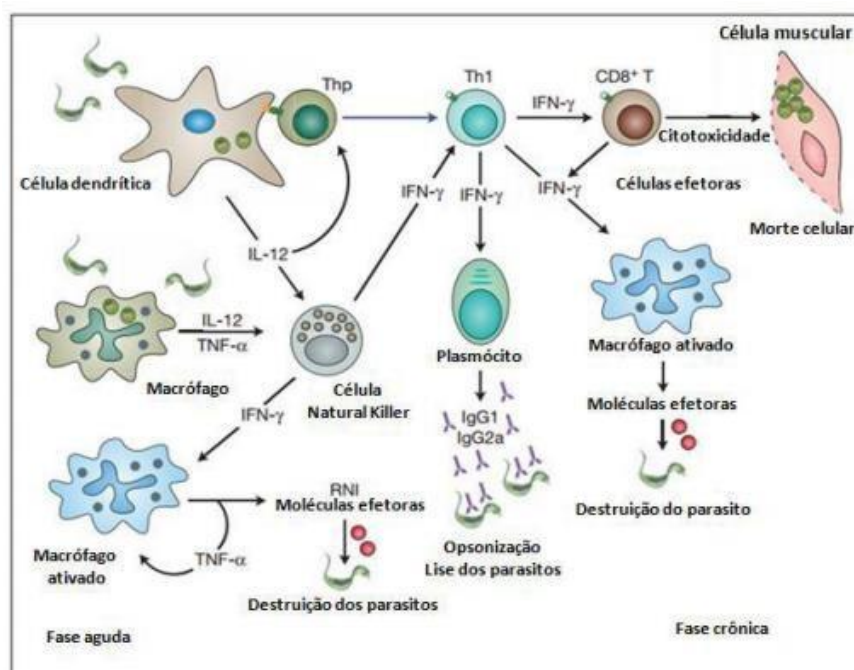


**Figura 1. CICLO BIOLÓGICO DO *T. cruzi*.** O triatomíneo ao fazer o repasto sanguíneo ao se alimentar do humano ingere formas Tripomastigotas sanguíneas que irão se diferenciar no intestino desse hospedeiro para Epimastigota e posteriormente Tripomastigota metacíclica. Essas formas Tripomastigotas são liberadas nas fezes e urina do triatomíneo durante novo repasto infectando assim o homem. Na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo essas formas irão invadir os tecidos e se diferenciar em Amastigotas que irão se multiplicar e diferenciar em Tripomastigotas ocasionando o rompimento das células, essas formas darão início ao novo ciclo ao serem ingeridas novamente pelo barbeiro (Fonte: Infográfico; Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz).

### 3.4 Imunomodulação durante a infecção por *T. Cruzii*

A resposta imune induzida durante a infecção por *Tc* está estritamente relacionada no balanço patógeno/hospedeiro pois uma resposta imune desbalanceada pode levar ao comprometimento tanto do parasito quanto do hospedeiro, esse controle permitinde

a sobrevivência de ambos na fase aguda da doença para que posteriormente prossigam para a fase crônica. A produção de citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e também de outras citocinas como IL-18 são essenciais para a resposta Th1 mediada por células T (TCD4+ e T CD8+) (Simões et al., 2018) Dentre as citocinas produzidas, IFN- $\gamma$  (citocina pró-inflamatória) possui um papel crítico no controle inicial da replicação do parasito onde, na ausência de uma resposta imune inata, o papel dessa citocina é comprometida (Esper et al., 2014). A citocina IL-12 (ativadora de células NK) induz uma resposta imune dependente de IFN- $\gamma$  e em ambas as respostas (inata e adaptativa) contra o Tc (Machado et al., 2012) A cascata de sinalização e ativação de citocinas estimula a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (MOs) que atua na função tripanocida eliminando assim o parasito (Cardoni et al., 1990; Gazzinelli et al., 1992; Chandra et al., 2002; Gutierrez et al., 2009; Machado, Dutra, et al., 2012). As citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  e inibindo a produção de NO, quimiocinas e células produtoras de IFN- $\gamma$  (Esper et al., 2014). A neutralização de IL-10 endógena aumenta a produção de IFN- $\gamma$  induzido por Tc e morte do parasita (Silva et al., 2003; Cardillo et al., 1996). Esses estudos sugerem que IL-12 e IFN- $\gamma$  favorecem a diferenciação de linfócitos Th1, levando a produção de IFN- $\gamma$  e diminuição da síntese de IL-10, sendo um mecanismo chave requerido para a indução e manutenção do controle da infecção aguda por Tc (Silva et al., 2003; Araújo-Jorge and Castro, 2000), (**Figura 2**).



**Figura 2. IMUNIDADE INATA E ADQUIRIDA DURANTE INFECÇÃO POR Tc.** A imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção: atuando como primeira barreira, as células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e DC) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (reativos intermediários de nitrogênio e oxigênio), que controlam a replicação parasitária. Ao mesmo tempo, células do sistema imune inato, particularmente, DCs, fazem uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T auxiliar 1 (T helper 1 – Th1) CD4+, assim como células T CD8+ e B. IFN- $\gamma$  produzido por células Th1 CD4+ ou células T CD8+, ativam mecanismos efetores em macrófagos, que destroem formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas, enquanto a atividade citotóxica realizada pelas células T CD8+ destroem células com amastigotas internalizadas. (Fonte: Expert Reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press 2010).

### 3.5 Manifestações clínicas

O curso clínico da DC pode ser dividido em fase bifásica sendo elas, aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por predomínio em quantidade expressiva do parasita na corrente sanguínea (Costa et al., 2013). Nesta fase a manifestação clínica mais comum é a febre, sempre presente e não muito elevada (37,5° a 38,5°C) que pode persistir por até 12 semanas e apresentar picos vespertinos ocasionais e sintomas inespecíficos, como prostração, diarreia, vômito, cefaleia, entre outros (Dias et al., 2016).

Os sinais de porta de entrada próprios da transmissão vetorial ocorrem próximo a mucosa ocular, que se manifesta como uma reação da conjuntiva com edema das pálpebras de um lado da face (edema bipalpebral bilateral - sinal de Romãna ou chagoma de inoculação) (Moncayo and Ortiz Yanine, 2006). Os sinais e sintomas podem progredir para a forma aguda grave com a ocorrência de uma ou mais das seguintes manifestações: miocardite difusa, pericardite, derrame pericárdico, cardiomegalia, insuficiência cardíaca e derrame pleural, podendo levar ao óbito ou, após tratamento específico, evoluir para a fase crônica (Barbosa et al., 2015).

A fase crônica da Doença de Chagas se inicia logo após o desaparecimento das manifestações da fase aguda. Nesse novo estágio a doença pode se caracterizar de forma assintomática/indeterminada (60-70%), por ausência de sinais clínicos e baixa

carga parasitária, podendo ser evidenciada somente por alguns exames como hemoculturas e PCR (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). A fase crônica pode ser também sintomática apresentando complicações cardíacas (20-30%) e/ou digestivas (10-15%). As manifestações da fase crônica sintomática aparecem aproximadamente após um período de mais de 10 anos, sendo que o coração e o trato digestivo são os órgãos mais comprometidos durante esta fase (Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2009).

### **3.6 Tratamento**

Atualmente o único tratamento disponível para a DC é administrado pelos fármacos Benzonidazol (BZ) e Nifurtimox (NF), sendo utilizados por um longo período de tempo, o que acarreta em efeitos colaterais como dermatites, náusea, vertigem, inflamação dos nervos, alterações sanguíneas que são danosos aos pacientes podendo gerar intolerância (Punukollu et al., 2007). Os medicamentos citados apresentam taxa de cura da doença entre 50-70 % na fase aguda da DC contra valores inferiores a 20% na fase crônica da doença, sendo de extrema importância o diagnóstico precoce (Becerra et al., 2012).

### **3.7 Cepa Y *Trypanosoma cruzi***

Em 1953 uma mulher de ascendência japonesa foi internada no Hospital das Clínicas de São Paulo com sintomas da Doença de Chagas. Ela era originária de uma fazenda localizada na zona rural de Marília, interior do Estado de São Paulo. O diagnóstico constatou que a doença estava na sua fase aguda, os médicos isolaram o parasita dessa paciente no (Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina de São Paulo) e observaram algumas peculiaridades ao realizarem estudos em murinos, viram uma taxa de mortalidade muito acentuada entre os animais inoculados, provando a virulência altamente expressiva da cepa. Devido a esse fator, o parasito recebeu uma designação de cepa “Y” da primeira letra do nome da jovem paciente. O parasito foi levado ao (Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo), para verificar seu comportamento em animais por um longo período. Vários estudos ocorreram depois com essa cepa, inclusive com tratamento e eficácia de fármacos devido a sua resposta tão acentuada (Bassi et al., 2020).

A cepa Y de *Tc* possui uma estabilidade e ciclo de vida constante em animais de laboratório, além de produzir resultados hematológicos e histopatológicos padronizados, tornando ideal para estudos experimentais (Camposl and Rami, 1997). A cepa Y pode causar grande mortalidade em modelos murinos entre duas a três semanas após a inoculação dependendo da genética do camundongo e/ou inoculo. Geralmente já começa se notar presença significativa de parasito na corrente sanguínea ao quinto dia após a infecção, também é observado nesse período uma alta taxa de parasitismo em alguns órgãos como fígado, cérebro, coração, pulmão, timo, rins e intestino delgado, ao 7º dia a carga parasitária varia entre 197 a 1235 de parasitas por milímetro cúbico (Pinto et al., 1999).

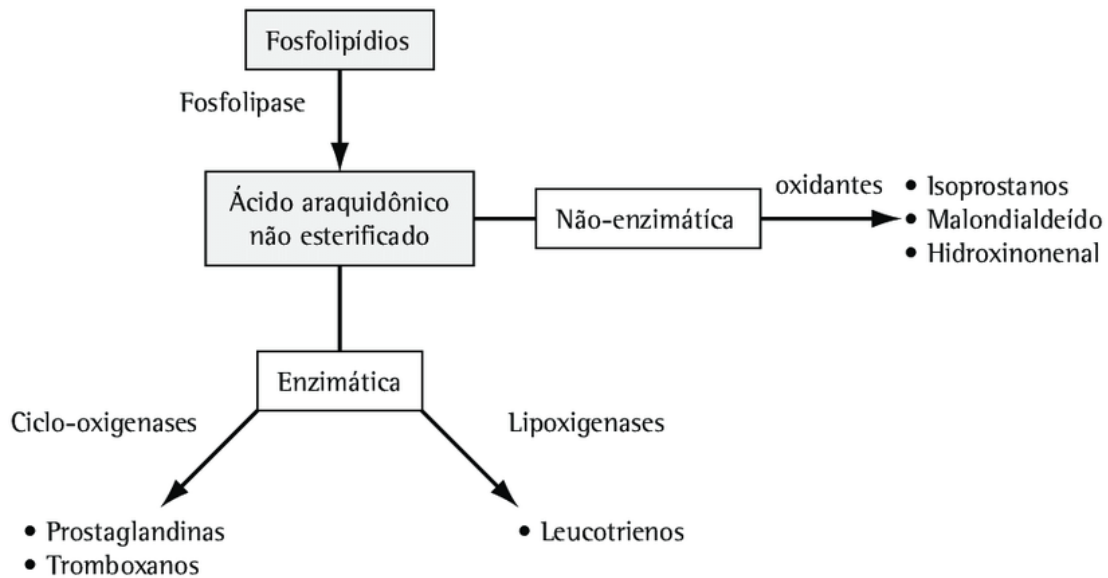
### **3.8 Ácido araquidônico (AA) e mediadores lipídicos**

A cascata do ácido araquidônico é uma via metabólica que usa o ácido araquidônico para a síntese de uma grande diversidade de mediadores lipídicos críticos na fisiologia e patologia humanas, globalmente denominados de eicosanóides e entre os quais se encontram: prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (Lima, Fraga and Barreiro, 2002), Figura 3. O AA é um composto lipídico que, para o homem, não é estritamente um ácido graxo essencial, como por vezes é descrito, mas sim um derivado de um ácido graxo essencial: o ácido linoleico (Markworth et al., 2013). A cascata do AA depende da oxidação deste composto lipídico e é dividido em duas vias principais: a dependente da ciclooxigenase (COX) e a dependente da lipoxigenase (LO).

A importância da cascata do AA radica no conjunto de funções desempenhadas pelos seus produtos, os eicosanóides, na bioquímica das células humanas. Não obstante, o papel dos eicosanóides estende-se além das propriedades pró-inflamatórias: são hormônios de ação autócrina e parácrina em vários tecidos, têm um papel crucial na hemorreologia (ramo da ciência que estuda corrente sanguínea), hemostasia e termorregulação e ainda na transmissão neuronal.

O papel mais proeminente é o de via pró inflamatória e de alvo terapêutico dos fármacos anti-inflamatórios não esteroides, como a aspirina. Nosso grupo demonstrou

em 2006 que a sinalização de lipoxina (LX) 4 e Aspirin Triggered Lipoxin (ATL) através da ativação de seus receptores entre eles o receptor aril hidrocarbono (AhR), em células dendríticas (DCs), induzem a expressão de SOCS-2, o qual regula a produção de citocinas e quimiocinas induzidas durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (Machado et al., 2006).



**Figura 3. VIA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.** Os produtos finais da cascata do AA dependem da ação que a qual ele vai ser sintetizado, sendo elas por via Enzimática ou Não-enzimática(oxidativa) (Fonte: Research Gate by Pedro Buin).

### 3.9 Lipoxinas

A resolução da inflamação é um processo endógeno ativo, e as LXs são importantes mediadores desse processo. LXs são formadas por metabolismo transcelular através de vias biossintéticas distintas dependendo do contexto celular (Serhan, 2005). Existem duas vias principais mediadas por LO da biossíntese de LX sendo elas em células e em tecidos humanos. O primeiro destes envolve a lipoxigenação sequencial de ácido araquidônico por 15-LO em células epiteliais e monócitos, e 5-LO em neutrófilos. Este caminho não leva apenas a biossíntese de LX, mas também reduz a formação de Leucotrienos (LT), resultando em uma relação inversa entre a biossíntese de LT e LX em leucócitos humanos (Serhan, 2005).

A segunda rota principal de formação de LX envolve interações de plaquetas e leucócitos ou microagregados de plaquetas e leucócitos que promovem a formação de LX por conversão transcelular (Dyke and Introduction, 2003). As plaquetas não são capazes de produzirem LXs por conta própria, mas esse caminho foi destacado como uma rota principal para a formação de LX dentro da vasculatura onde as plaquetas ativadas se tornam a principal fonte de LXs após adesão a neutrófilos (Serhan and Chiang, 2008).

As LXs exibem um grande repertório de ações pró-resolutivas, como a redução da infiltração de neutrófilos no local inflamado, diminuição da produção de superóxido e citocinas por granulócitos, ativação da fagocitose de microorganismos e de células apoptóticas por macrófagos, além de possuírem ações antinociceptivas diretas (Sordi et al., 2013). LX pode exercer seus efeitos anti-inflamatórios durante infecção intestinal via interação com leucócitos e enterócitos, reduzindo a ação de neutrófilos. Além do antagonismo de aderência de neutrófilos e migração, LX também pode inibir o recrutamento de neutrófilos atenuando seus sinais quimiotáticos.(Ungaro et al., 2017).

Existem quatro enzimas LO, 5-, 8-, 12- e 15-LO, que metabolizam AA por oxigenação de um único carbono, resultando na formação de uma variedade de compostos com diversas atividades biológicas (Sumida, Graber and Nunez, 1993). A enzima 5-LO possui um papel essencial não somente no desencadeamento de atividades pró-inflamatórias (mediada pela produção de LTB<sub>4</sub>), como também promove a síntese de fatores anti-inflamatórios como as LXs, que como mencionado anteriormente, através da ativação do AhR, induzem a expressão de SOCS2 por sinalização de LX e ATL (Machado et al., 2006).

Tratamentos com bloqueadores da enzima 5-LO podem determinar o tipo de resposta desejada durante o curso da infecção, justamente por ela ser produtora tanto de moléculas pro-inflamatórias como anti-inflamatórias. Se intervirmos num momento muito inicial da infecção, estaremos possivelmente bloqueando mais a ação dos leucotrienos, logo tendo uma resposta menos pro inflamatória, por outro lado se

bloquearmos a via de forma mais tardia, estaremos agindo sobre as lipoxinas que são responsáveis pela ação anti-inflamatória e pro-resolutiva.

### **3.10 Supressor de Sinalização de Citocinas (SOCS-2)**

SOCS são importantes proteínas reguladores fisiológicas da imunidade inata e adaptativa, apesar de ter sido descrita como supressora de sinalização de citocinas, ela atua como uma proteína de múltiplas funções (Rico-Bautista, Flores-Morales and Fernández-Pérez, 2006). Estas moléculas regulam positivamente e negativamente a ativação de MOs e DCs e são essenciais para o desenvolvimento e diferenciação de células T (Yoshimura, Naka and Kubo, 2007).

SOCS é reconhecido como uma família de proteínas intracelulares identificadas em 1997 constituída de oito membros (CIS e SOCS1-SOCS7) (Naka et al., 2001). Essa proteína exerce papel importante na regulação de MAP quinases e outras moléculas relacionadas com a sinalização intracelular de uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e hormônios (Uren et al., 2014).

As proteínas SOCS estão presentes em níveis baixos nas células não estimuladas, entretanto, sua expressão pode ser induzida rapidamente através de citocinas por uma cascata de sinalização (Rico-Bautista et al., 2006). SOCS2 está envolvido na regulação da resposta imune de diversos modelos de doenças sendo descrito pelo nosso grupo de trabalho como importante durante as infecções por *T. gondii* (Machado et al., 2006), *Tc* (Basrai and Turnley, 2016) e *Plasmodium berghei* Anka (Brant et al., 2016). SOCS-2 parece ter um papel regulatório dual: inibindo ou potencializando a sinalização dependendo da sua concentração/expressão e do contexto celular onde ele está atuando (Tregrove and Ward, 2013).

SOCS-2 é induzido por diversos tipos de citocinas que ativam STAT5. Os mais importantes incluem GH, PRL, EPO, GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6 IL-15, CNTF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , LIF e insulina. Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que as proteínas SOCS têm papéis importantes na manutenção da homeostase e resolução de processos inflamatórios, SOCS estão provavelmente

envolvidas na diferenciação de células do estado inato e imunidade adaptativa, ajudando assim a moldar a resposta inflamatória (Letellier and Haan, 2016; Cramer et al., 2019; Monti-Rocha et al., 2019; Val et al., 2020). A proteína SOCS2 possui um papel importante também sobre a manutenção de células intestinais. A regulação negativa de SOCS2 aumenta a proliferação e ações anti- apoptóticas de IGF-I no intestino delgado e cólon e a capacidade do IGF-I de ativar STAT3 e regular negativamente o crescimento intestinal (excesso de GH e IGF-I23) contribuindo assim coma homeostase em caso de carcinomas (Kim et al., 2018).

### **3.11 Microbiota Intestinal**

A microbiota intestinal é composta por aproximadamente 100 trilhões de bactérias comensais de cerca de 1000 espécies com diferentes atividades metabólicas. As bactérias comensais do intestino são extremamente benéficas para a saúde humana, facilitando o metabolismo dos nutrientes e a resistência à colonização patogênica, promovendo a integridade das células epiteliais, além do claro desenvolvimento do sistema imunológico (Khan et al., 2019). Enquanto as bactérias obtêm um habitat e alimento do hospedeiro, por sua vez, ajudam o hospedeiro, regulando várias funções, incluindo a digestão dietética, e conferindo proteção contra patógenos. Alterações da microbiota intestinal às vezes chamados coletivamente de "disbiose intestinal" têm demonstrado ser associado a várias doenças e distúrbios como diabetes tipo 2 (Gurung et al., 2020), depressão (Zalar, Haslberger and Peterlin, 2018) e doença cardiovascular (Tang, Kitai and Hazen, 2017).

Sabe-se que a microbiota participa ativamente da composição e disponibilização de vitaminas essenciais para o hospedeiro, assim como na modulação da resposta imune e resistência a infecção (Chervonsky, 2013). Por outro lado, o hospedeiro pode modificar as atividades da microbiota provocando mudanças na fisiologia e/ou resposta do hospedeiro frente a infecção, como por exemplo aumentando o número de bactérias patogênicas e reduzindo bactérias benéficas que auxiliam na proteção intestinal e metabolismo de ácidos graxos e vitaminas (Teotônio et al., 2019). Essa comunicação ocorre através de vias de sinalização bidirecionais entre a microbiota-cérebro que são reguladas por mecanismos neurais, endócrinos e imunológicos (Mayer, Tillisch and Gupta, 2015).

As bactérias são responsáveis por degradar compostos alimentares entre eles fibras e aminoácidos, realizam fermentação, metabolizando e sintetizando vitaminas do complexo B e K. A microbiota é responsável pela defesa tanto da mucosa quanto das células que compõem a parede intestinal, sem a microbiota, a fisiologia do tubo digestivo não atinge a sua maturidade. É composta por 800 a 1000 espécies de bactérias sendo algumas benéficas (Ex: *Lactobacillus* sp e, *Bifidobacterium* sp) e bactérias com potencial patogênico (Ex *Salmonella* sp e *E. coli*) (Paixão and Castro, 2016).

A microbiota comensal é extremamente importante pra seu hospedeiro, pois auxilia na adaptação ao meio ambiente em situações de estresses, incluindo aqueles que causam dor, foi descrito que animais Germefree (que possuem microbiota depletada) ao sofrerem testes de nocicepção perderam a percepção da dor, porém quando tiveram a reposição da microbiota, reverteram esse fenótipo hiporresponsivo (Amaral et al., 2008).

As enterobactérias estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas no solo, água, frutas, vegetais e produtos de origem animal, como a carne e ovos. Sua ecologia é variável, bem como seu potencial patogênico para o homem, animais e vegetais. A família Enterobacteriaceae é constituída por 53 gêneros e cerca de 170 espécies conhecidas, todas estas, sabe-se que 26 gêneros são causadores de infecções em seres humanos (Cunha and da, 2017). As enterobactérias possuem um papel importante durante infecções intestinais (Ramirez and Giron, 2020).

A mucosa do trato gastrointestinal é uma área de intenso contato com o meio externo e um local onde diferentes padrões de resposta imunológica podem acontecer (Kelly et al., 2015). Estas respostas são determinadas especialmente pela natureza do antígeno, pelo período da vida em que esse contato acontece e pela existência ou não de reação inflamatória local e sistêmica (Durack and Lynch, 2019). Antígenos que penetram no organismo pelas superfícies mucosas e, em especial, pela mucosa gastrointestinal tendem a induzir respostas de tolerância, caracterizada pela produção de imunoglobulina (Ig) A e pela proliferação de células T reguladoras (Treg) (Kim et al., 2016). Para que isso aconteça é necessário que haja interação entre todos

os componentes da mucosa e a microbiota, que garantem um ambiente de homeostasia local e sistêmica, permitindo a influência positiva do sistema imunológico nos demais sistemas orgânicos (nervoso e endócrino) (Oriá et al., 2016).

Se por qualquer motivo, existe uma falha na manutenção da homeostasia ou perda da integridade do epitélio intestinal, o que pode ocorrer é o desenvolvimento de doenças como as alergias alimentares. Dessa forma, a nutrição tem importante papel na modulação imunológica, visto que diferentes compostos têm potencial para intervir nas diversas etapas das respostas imunológicas e estimular a geração/manutenção da tolerância oral (Aidy, van den Bogert and Kleerebezem, 2015).

A presença do sistema imunitário nas mucosas tem permitido o estudo de novas estratégias para a administração oral de antígenos, visando aumentar a resposta imunitária tanto local como também nas outras mucosas (Ramiro-Puig et al., 2008). No trato digestivo, os antígenos podem ser capturados por aglomerados de folículos linfóides situados na parede do intestino delgado, denominados de placas de Peyer (PPs), onde se inicia a resposta imunitária das mucosas, com a produção da IgA secretora (SIgA), somente os antígenos particulados são capturados pelas PPs (Hammer, Joel and LeFevre, 1983).

PPs possuem alguns centímetros, logo podem ser identificados mesmo sem ajuda de instrumentos. São tecidos ovalados e densos localizados na membrana mucosa do intestino, formando áreas alongadas e a sua superfície está livre das vilosidades e depressões (glândulas Lieberkühn) que caracterizam a parede intestinal (Van Kruiningen et al., 2002). Fazem parte do Tecido Linfóide Associado ao Intestino (em inglês Gut Associated Lymphoid Tissue ou GALT). Como possuem capacidade de transportar os antígenos luminiais e bactérias podem ser considerados como os sensores do sistema imunológico do intestino (MacDonald et al., 1987).

As PPs podem induzir tolerância imunológica ou de defesa contra antígenos utilizando uma complexa interação entre células do sistema imunológico localizadas nos folículos linfóides e no epitélio folicular associado (Jung, Hugot and Barreau, 2010). Esta comunicação celular parece ser regulada por receptores de reconhecimento de

patógenos, especialmente o Nucleotide Oligomerization Domain - NOD2. Embora o TLR tenha um papel limitado na homeostase, o NOD2 regula o número, o tamanho e composição de células T de PPs, em resposta à microbiota intestinal. Por sua vez, as células T CD4+ presentes na PP são capazes de modular a permeabilidade celular e intracelular (Finke, 2009).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de SOCS-2 e da enzima 5-LO durante infecção experimental por *T. cruzi*, incluindo a composição da microbiota intestinal frente essa doença

### 4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Analisar a taxa de sobrevivência dos diferentes grupos infectados.

4.2.2 Identificar se existe relação entre a microbiota intestinal e o avanço clínico da doença.

4.2.3 Verificar se existe diferença entre a taxa de parasitemia entre os grupos selvagens e nocautes.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais para experimentação

Foram utilizados camundongos tipo selvagem (WT – Wild Type) C57BL/6 e SV.129 e camundongos nocautes (KO - Knockout) SOCS-2 e 5-LO todas fêmeas com idade entre 8 a 9 semanas. Os animais C57BL/6 obtidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB) e os camundongos SV.129, SOCS-2 e 5-LO fornecidos pelo biotério do grupo de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG (ICB). Para a manutenção da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidos fêmeas Swiss de 8 a 10 semanas pelo Centro de Bioterismo da UFMG – CEBIO. Todos os camundongos estiveram acondicionados em gaiolas de micro-isoladores com filtro, maravalha autoclavada, comida, água e foto período automatizados (CEUA 305/2016).

### 5.2 Manutenção da cepa Y

A manutenção do parasito se teve por inoculações intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas da cepa Y num volume de 200 ul em camundongos fêmeas Swiss com idades entre 8 a 10 semanas. Os animais foram eutanasiados com (dose anestésico: 300 mg/kg de cetamina, 30 mg/kg de xilazina) injeção letal via i.p. usando agulha (30G x  $\frac{1}{2}$ ) para a retirada do sangue sem que houvesse sofrimento animal, o sangue foi retirado por incisão da veia porta-hepática para ser utilizado na infecção dos camundongos da experimentação.

### 5.3 Infecção e parasitemia

Camundongos WT (C57BL/6 e SV.129) e nocaute (KO; SOCS-2 e 5-LO) foram infectados por via i.p contendo  $1 \times 10^3$  de formas tripomastigotas de *Tc* retiradas de passagens mantidas em seus respectivos backgrounds (selvagens). Para acompanhar a liberação do parasito durante o curso da infecção foi realizado uma

cinética nos intervalos 3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias após infecção (dpi), onde foi retirado 5 µl de sangue periférico da calda desses animais e colocado entre lâmina e lamínula 22 x 22 possibilitando assim, a contagem de formas tripomastigotas em 50 campos microscópicos de 400x.

#### **5.4 Análise de peso e sobrevivência**

A taxa de mortalidade e perda de peso foi acompanhada em todos os grupos WT e KO controles e infectados ao longo das cinéticas descritas anteriormente 3,5,7,9,11 e 15 dpi. Para pesar os animais utilizou-se de uma balança eletrônica de precisão digital 1g a 5kg, MOD.LS5 devidamente calibrada.

#### **5.5 Carga bacteriana fecal**

Tubos eppendorf de 2ml autoclavados foram pesados e separados para armazenamento das amostras fecais. Todo o procedimento ocorreu dentro de um fluxo laminar previamente esterilizado com álcool e luz ultravioleta. O material fecal dos animais WT e KO controle e infectados foi coletado dentro do fluxo com auxílio de uma pinça e de um contensor mecânico e armazenados nos tubos. Para realização da diluição seriada se utilizou 270 µl de salina nas fezes coletadas, onde foi retirado 30 µl da alíquota da primeira fração  $10^{-1}$  e passado por diluição seriada para as demais. Placas de Petri contendo meio de cultura MC Conkey (seletivo para enterobactérias) ficaram divididas em 4 quadrantes onde foram semeadas a amostra nas diluições de  $10^{-1}$  á  $10^{-4}$ . Em cada quadrante foi pipetado 3 gotas contendo 10µl da diluição, posteriormente a placa foi deixada de repouso sobre uma superfície plana para absorção da alíquota pelo meio. As placas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento microbiano em incubadora B.O.D á 36°C por 24 horas para análise de enterobactérias e por 72 horas para ácido lácticas, passado esse período as colônias formadas foram contadas e as contagens foram expressas como UFC/g de fezes.

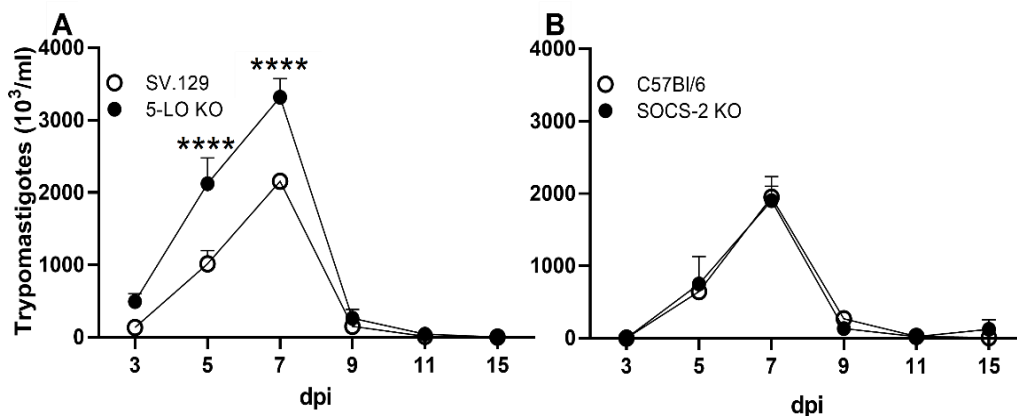
## 5.6 Análises Estatísticas

A significância estatística das diferenças nos valores entre as amostras controle (CO) e infectados (INF) analisadas por Two-way ANOVA e Survival (Graph Prism Software 7.0). As diferenças foram consideradas ser significantes onde  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 - Deficiência de 5-LO, mas não de SOCS2, resulta no aumento da parasitemia durante a infecção experimental por *Tc*.

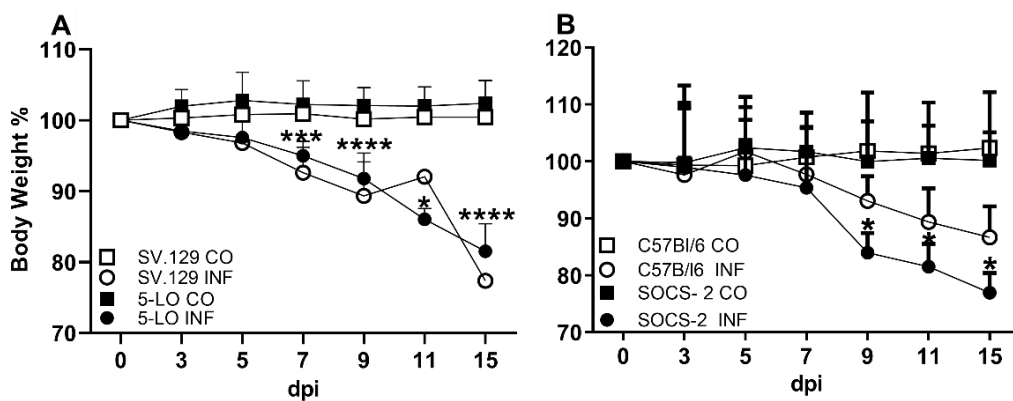
A enzima 5-LO é descrita na literatura por atuar na resposta pró-resolutiva frente a infecções e processos inflamatórios, a interação de produtos dessa enzima com o receptor de AhR induz a expressão de SOCS-2 que possui um papel na homeostasia da resposta imune inata e adaptativa. Podemos observar (**Figura 4 A**) que a deficiência de 5-LO resultou no aumento da parasitemia no 5º e 7 dpi quando comparado com o grupo WT, sugerindo a importância dessa enzima no controle da infecção por *Tc* in vivo. Por outro lado, não vimos diferença na parasitemia de animais SOCS-2 KO que seguiu o mesmo perfil do WT (C57Bl/6) (**Figura 4 B**).



**Figura 4. DEFICIÊNCIA DE 5-LO, MAS NÃO DE SOCS2, RESULTA NO AUMENTO DA PARASITEMIA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Tc*.** Camundongos C57Bl/6 e SV.129 (WT), SOCS-2 KO e 5-LO KO foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). A parasitemia (**A e B**) foi analisada na cinética de 3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias após infecção (dpi). Dados representativos da média (+/-) usando-se 2 way ANOVA (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

## 6.2 - A infecção por *Tc* resulta na redução de peso significativamente tanto em grupos WT quanto 5-LO KO e SOCS-2 KO.

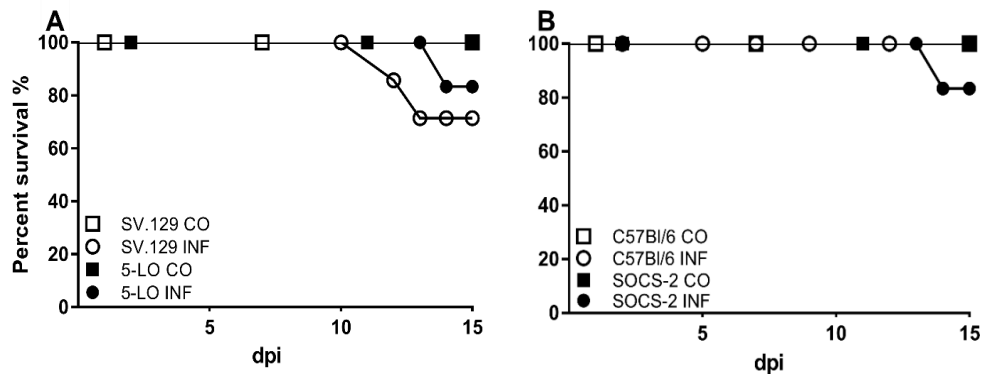
O processo de perda ponderal é bastante elucidada na literatura e pode ter diversas origens como por exemplo enfermidades e disbiose na microbiota intestinal (Barrientos et al., 2009) e que infecções parasitárias podem agravar o caso. Diante disso, analisamos o peso corporal dos camundongos nos mesmos dias que foi feito a cinética de parasitemia. Como esperado camundongos controles (CO) mantiveram o peso corporal em todos os dias de análise (**Figuras 5A e 5B**) enquanto em todos os grupos de camundongos infectados (INF) se observou uma redução significativa no peso principalmente entre o 7° e 9° dpi, o que não difere entre os grupos WT e KO. (**Figuras 5A e 5B**).



**Figura 5. A INFECÇÃO POR *Tc* RESULTA NA REDUÇÃO DE PESO EM CAMUNDONGOS NOCAUTES DE 5-LO E SOCS-2.** Camundongos C57BL/6 e SV.129 (WT), SOCS-2 e 5-LO (KO) foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). O peso corporal (**A e B**) dos camundongos foi avaliado na mesma cinética (3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias após infecção (dpi)) da parasitemia. Dados representativos da média (+/-) usando-se 2 way ANOVA (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Legenda: \* (representação de camundongos WT CO para WT INF) e # (representação de camundongos KO CO para KO INF).

## 6.3 - Deficiência de SOCS-2, mas não de 5-LO, aumenta a taxa de mortalidade durante a infecção por *Tc*.

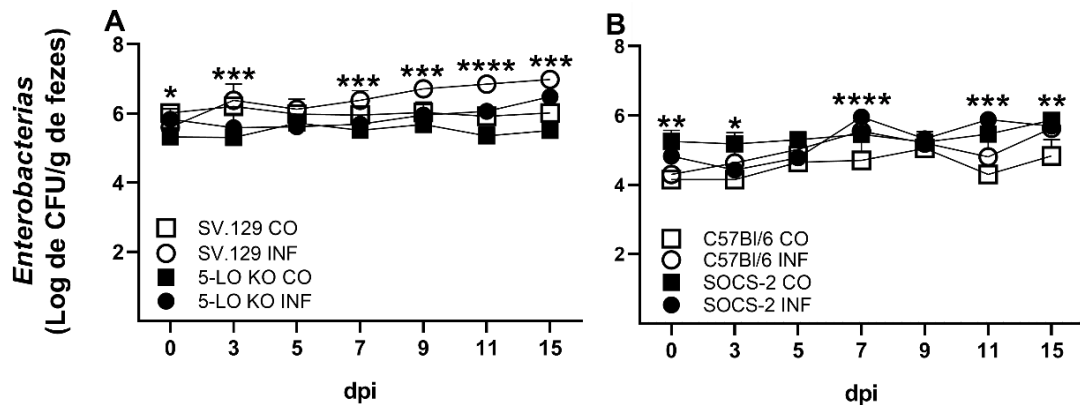
Os camundongos SOCS-2 KO apresentaram uma taxa de mortalidade acentuada em comparação ao seu selvagem, tendo maior susceptibilidade a infecção por *Tc*, entretanto o grupo 5-LO KO apresentou menos letalidade do que seu background SV129 (**Figuras 6A e 6B**).



**Figura 6. A INFECÇÃO POR *Tc* LEVA A MORTE DE CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA 5-LO E SOCS-2.** Camundongos C57BL/6 e SV.129 (WT), SOCS-2 e 5-LO (KO) foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). A sobrevivência dos camundongos (A e B) foram verificadas diariamente até o final da experimentação. Dados representativos da média (+/-) usando-se Survival.

#### 6.4 - A presença da enzima 5-LO e a ausência de SOCS-2 favorece a expansão das enterobactérias durante a infecção por *T. cruzi*.

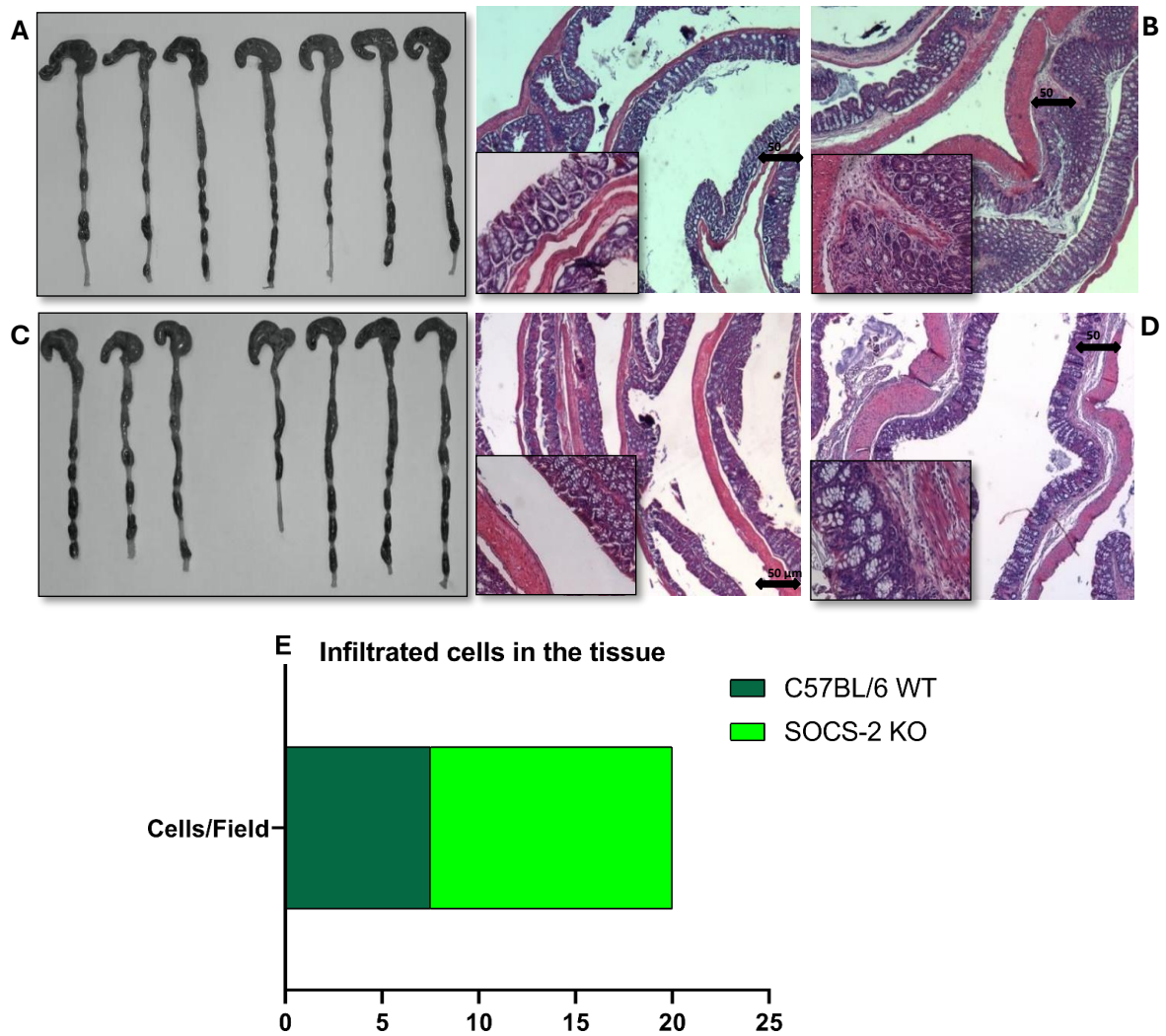
Sabemos que a microbiota intestinal desempenha um papel extremamente importante para a homeostase do organismo (Fagundes et al., 2011) e que em caso de infecção/doença ocorre uma disbiose que pode acarretar em danos ao organismo. As enterobactérias geralmente se expandem de forma exacerbada no organismo do hospedeiro quando o mesmo sofre por alguma infecção, lesão inflamatória no trato intestinal (Zhu et al., 2018). Diante disso, propusemos a analisar a composição da microbiota intestinal dos camundongos WT e KOs nos dias da cinética como mencionada na metodologia. Observamos que a presença de 5-LO (**Figura 7A**) e a ausência de SOCS-2 (**Figura 7B**) favorece a expansão de enterobactérias em comparação aos seus respectivos grupos WT.



**Figura 7. A PRESENÇA DA ENZIMA 5-LO FAVORECE A EXPANSÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS DURANTE A INFECÇÃO POR *Tc*.** Camundongos C57BL/6 e SV.129 (WT), SOCS-2 e 5- LO (KO) foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Na mesma cinética da infecção (3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias após infecção (dpi)) foi coletado o material fecal para análise da composição da microbiota intestinal (A e B). Dados representativos da média (+/-) usando-se 2 way ANOVA (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Legenda (Figuras A e B): \* (representação de camundongos WT CO para WT INF) e # (representação de camundongos WT INF para KO INF).

### 6.5 - A deficiência de SOCS-2 aumenta o processo inflamatório no intestino/cólon durante a infecção.

Como nossos resultados anteriores demonstraram que durante a infecção por *Tc* a ausência de SOCS-2 resulta no aumento significativo da quantidade de enterobactérias (descritas na literatura como indutoras de processos inflamatórios), e baseado nos resultados do nosso grupo que demonstraram a importância de SOCS-2 na homeostase/função de vários tecidos durante processos inflamatórios infecciosos e “estéreis” (Esper et al., 2012; Brant et al., 2016; Cramer et al., 2019; Monti-Rocha et al., 2019; Val et al., 2020), avaliamos macroscopicamente e histologicamente o intestino/colón durante a infecção por *Tc*. Na Figura 8 podemos observar que a infecção por *Tc* induz uma dilatação no início do cólon de camundongos WT (Figura 8A). Em contraste, a deficiência de SOCS2 resulta na dilatação do início do colón nos camundongos controles, e a infecção por *Tc* leva a sua obstrução (Figura 8B). Podemos observar que a ausência de SOCS-2 durante a infecção por *Tc* resulta no aumento do processo inflamatório e dano tecidual no cólon quando comparado com WT.



**Figura 8. A DEFICIÊNCIA DE SOCS-2 AUMENTA O PROCESSO INFLAMATÓRIO NO INTESTINO/CÓLON DURANTE A INFECCÃO.** Camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS-2 KO foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Após 15 dias de infecção (dpi) foi retirado o intestino/colon para análise morfológica e histológica. Na **Figura A e B** podemos verificar diferenças morfológicas entre grupos WT e KO infectados, onde SOCS-2 KO apresenta ter uma dilatação próxima ao cécum que se estreita durante a infecção enquanto o animal WT é o oposto. Foi analisado o número de infiltrado celular em 10 campos entre os animais WT e KO infectados, se observou um número maior desse perfil celular em animais SOCS-2 KO **Figura E**.

## 7. DISCUSSÃO

Na fase inicial da infecção por *Tc*, a imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção, atuando como a primeira barreira. As células do sistema imune inato incluem macrófagos, células NK e células dendríticas que produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (intermediários reativos de nitrogênio (RNIs) e GTPases induzíveis por IFN) que controlam a replicação do parasito (Rezende-oliveira, Sarmiento and Junior, 2012).

Ao mesmo tempo, as células imunes inatas, particularmente as células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adaptativa, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T helper 1 (Th1) CD4 +, bem como células T CD8 + e células B do plasma (Aliberti et al., 1996). O IFN- $\gamma$  produzido por células T CD4 +, Th1 ou CD8 + ativam mecanismos efetores em macrófagos para destruir os parasitos fagocitados, enquanto a atividade citotóxica exibida pelas células T CD8 + destroem as células contendo amastigotas intracelulares (Bogdan and Röllinghoff, 1999).

Além das nossas células imunes, possuímos sistemas que transcrevem e sintetizam moléculas que irão interagir no nosso organismo como é o caso do receptor AhR, que são importantes reguladores gênicos e possuem já descritos uma gama diversa de ligantes (Larigot et al., 2018). A ativação de AhR pode regular as respostas imunes inatas e adaptativas por meio da regulação de vários AhREs presentes nas regiões promotoras de vários genes, como aqueles implicados na regulação de NF- $\kappa$ B e o desenvolvimento de Treg (Foxp3, TGF- $\beta$  e IL-10), células Th1 (IL-12) e Th17 (IL-21 e IL-23) (Cerbán et al., 2020). Recentes estudos comprovaram que IL-17 confere resistência contra invasão por *Tc* no organismo, sugerindo que células Th17 poderiam desempenhar um papel protetor durante combate á infecções parasitárias e não somente contra vírus e bactérias como é descrito na literatura (Cai et al., 2016).

Nosso sistema imune é bastante complexo e conta com a ajuda de diversos componentes, entre eles se destacam os mediadores lipídicos. Os mediadores lipídicos desenvolvem um papel essencial não somente para a homeostase do nosso

organismo, como também no combate contra infecções parasitárias, o AA induz a produção de corpos lipídicos (LPs) nas células do nosso corpo que interagem com outras células da nossa imunidade, quando as formas infectantes de *Tc* invadem as células inflamatórias do nosso organismo, ocorre uma interação hospedeiro/parasito que podem modular a formação de LPs no parasito, que são reconhecidos por células da resposta imune como MOs e CDs mediando assim o processo inflamatório (Toledo et al., 2016).

O papel dos ácidos graxos poli-insaturados sobre o sistema imune vem sendo bastante estudado nos últimos anos com o objetivo de elucidar a dinâmica dos eicosanóides e leucotrienos derivados do ácido araquidônico na modulação das respostas inflamatórias e na imunidade (Andrade and Carmo, 2006).

Está claro que eicosanoides desempenham papéis essenciais e potentes na patogênese da CD experimental. Deficiência de ácidos graxos essenciais (incluindo AA) resulta em uma redução de até 63% na parasitemia periférica e mais do que o dobro da taxa de sobrevivência normal durante a doença aguda (Santos, 1998).

Os leucotrienos são produtos da via enzimática das Lipoxigenases responsáveis pela síntese das LXs e ATLs (Serhan and Chiang, 2008). Desde a descoberta das LXs e do ATL, estudos celulares e pré-clínicos confirmaram o potencial anti-inflamatório e propriedades pró-resolutivas, sendo assim visadas como alvos na produção de possíveis medicamentos (Romano et al., 2015).

As LXs são geradas dentro do lúmen vascular durante as interações plaquetas-leucócitos e em superfícies mucosas via interações leucócito-célula epitelial. Durante as interações célula-célula, as vias biossintéticas transcelulares são as principais rotas biossintéticas das LXs portanto elas são formadas in vivo durante as respostas multicelulares, como por exemplo durante uma inflamação (Dyke and Introduction, 2003). Nossos resultados com a cepa Y de *Tc* demonstraram que camundongos deficientes em 5-LO aumentaram o número de parasitos circulantes no sangue (parasitemia) corroborando com a literatura (Pinto et al., 1999). Durante a infecção por *Tc*, animais deficientes em 5-LO apresentam alterações hematológicas como

trombocitopenia e neutropenia seguida por neutrofilia e eosinofilia (Borges et al., 2009).

O aumento da parasitemia em camundongos 5-LO pode ser justificado pelo fato de que a atividade dessa enzima está relacionada com a produção de leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) e LXs (LXA<sub>4</sub>) já descritos importantes na modulação das respostas imunes inatas e adaptativas durante processos infecciosos (Secatto, 2018). LTB<sub>4</sub> desempenha um papel inflamatório importante para o controle da replicação do parasito (Talvani et al., 2002). Por outro lado, a LXA<sub>4</sub> desempenha um papel pró-resolutivo (Tateishi et al., 2014). Durante a infecção por *Tc*, os valores de LTB<sub>4</sub> tem uma variação nos níveis circulantes e os tratamentos com inibidores dessa via pode ocasionar aumento da parasitemia (Machado et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que a ausência de SOCS-2 não altera o perfil de parasitemia nos períodos analisados. Nosso grupo demonstrou que durante a infecção por *Tc*, SOCS-2 é expresso, porém é parcialmente reduzido em animais deficientes para a enzima 5-LO. LXA<sub>4</sub>, produzida pela via 5-LO, é um potente ativador do receptor AhR, consequentemente levando aumento da expressão de SOCS-2 (Machado et al., 2006). Durante a infecção por *Tc*, camundongos deficientes em SOCS-2 produzem elevados níveis de LXA<sub>4</sub>, demonstrando assim uma inter-relação entre a via 5- LO/LXA<sub>4</sub>/AhR/SOCS2 (Esper et al., 2012).

As proteínas SOCS são reguladoras da transdução de sinal de citocinas que são essenciais para a fisiologia imunológica normal e também parecem contribuir na resposta imune durante doenças. Estudos bioquímicos definiram regiões específicas de proteínas SOCS que podem ser direcionadas para alterar sua função, chamadas sequências amino- terminais específicas e o domínio SH2 – Hidrogenossulfeto o qual controlam as interações com parceiros dessa proteína, e a caixa SOCS que regula a degradação de proteínas mediadas por SOCS (Alexander, 2002).

A perda de peso não intencional significativa se caracteriza geralmente quando se perde mais que 10% do peso corporal normal, é um indicador geralmente de prognóstico em doenças crônicas (Norman et al., 2008). O controle da perda de peso

não intencional em pessoas com doença crônica é difícil, pois as mudanças na taxa metabólica e no processamento de nutrientes para obter energia pode significar um grande problema para a homeostase do sistema endócrino (Payne, Wiffen and Martin, 2017).

O sistema imune se comunica com todos os demais sistemas do nosso organismo, sabe-se que as influências centrais e periféricas são estabelecidas de forma recíproca entre o sistema imune-endócrino e a resposta e metabolismo energético (Nagajyothi et al., 2013). Durante infecção por *Tc* acontecem uma redução da ingestão de alimentos por parte dos animais para estabelecer um novo set point metabólico, devido ao alto custo energético exigido pela resposta imune, ocorre uma desregulação das leptinas levando uma sensação de saciedade dos animais que reduzem a alimentação e conseqüentemente começam a perder peso (Manarin et al., 2013).

Em relação a perda de peso, nossos resultados demonstraram que os animais infectados por *Tc* tiveram uma queda muito acentuada principalmente após o pico da doença ao 7° dpi onde a parasitemia se encontrava bastante alta no hospedeiro, entretanto não houve diferença significativa entre os grupos KO e WT infectados, demonstrando que a perda de peso é independente de 5-LO e SOCS-2, sugerindo assim que o fator determinante para a progressão da perda de peso está relacionada diretamente com a infecção causada pela cepa Y de *Tc* nesses hospedeiros. Vale ressaltar que a perda excessiva de peso se não for intermediada pode gerar danos ao organismo e sucessivamente até ao óbito (Xie et al., 2020).

A cepa Y de *Tc* possui um perfil mais virulento que as demais, podendo atingir o pico de sua parasitemia mais cedo e conseqüentemente entrando para a fase crônica antecipadamente (Amato Neto, Campos and Higaki, 1974). Ao entrar no organismo do hospedeiro, *Tc* consegue ativar seus mecanismos de evasão contra o sistema imunológico inato, conseguindo sobreviver até mesmo dentro de células de defesa primária como os macrófagos (Bogdan and Röllinghoff, 1999). A interação parasito-hospedeiro vai depender bastante de como o organismo infectado reage como resposta ao parasito (Junqueira et al., 2010), isso pode ocasionar desde danos

permanentes aos tecidos parasitados como até mesmo a morte do hospedeiro, caso sua imunidade seja deficiente (Borges et al., 2016).

Nossos dados demonstraram que a taxa de mortalidade entre os camundongos infectados foi maior nos camundongos SOCS2 KO. Curiosamente os camundongos 5- LO KO demonstram uma mortalidade similar com tendência a ser menor quando comparados aos seus respectivos WT, sugerindo que no início da infecção, apesar de aumentar a parasitemia, possivelmente a redução dos níveis de LTB4 reduzem a toxicidade sistêmica encontrada durante a infecção por *Tc* (Williams et al., 2020). Vale ressaltar que é descrito que LTB4 é produzido no início de processos inflamatórios e que a produção de LXs seria em uma fase mais tardia da mesma (Machado and Aliberti, 2006). Não foi possível associar a perda de peso com a taxa de sobrevivência pois, não apresentou estatística entre os grupos analisados.

O aparecimento de mega síndromes durante infecção por *Tc* já é bastante elucidado pela literatura, entretanto o desenvolvimento da forma digestiva ainda não está bastante descrito, sabe-se que *Tc* em muitos casos têm o intestino como sítio preferencial de ocupação (Silberstein et al., 2018). Portanto, nessa região poderia estar ocorrendo interação entre o parasito e milhares de bactérias comensais de maneira direta ou indireta (Teotônio et al., 2019). O *Tc* quando se aloja nos tecidos do intestino causa inflamação e desgaste tecidual, isso por sua vez gera uma perturbação no ambiente desbalanceando a composição de microrganismos ali presentes (McCall et al., 2018). Nossos resultados demonstraram um importante papel “fisiológico” basal de SOCS-2 no intestino/colon de camundongos, e durante a infecção essa proteína é essencial na modulação do processo inflamatório nesse tecido. Importante salientar que SOCS-2 é importante não somente na modulação da produção e sinalização de mediadores inflamatórios, mas também nas respostas/desenvolvimento de neurônios (Wang and Campbell, 2002; Brant et al., 2016). Portanto, as alterações encontradas nos camundongos SOCS-2 KO no colon, mesmo na ausência de infecção, pode estar relacionada com a sua importância também em células constituintes desse órgão/tecido como os neurônios.

Outro ponto importante a ser discutido é que a perturbação causada na região intestinal pode levar a alterações no conjugado de derivados do ácido linoléico (CLA) e em membros específicos das famílias *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, bem como alterações nos ácidos biliares secundários e membros da ordem Clostridiales (Duarte- Silva et al., 2020). É descrito que ocorre uma alta expressão de receptores imunes inatos como TLR8 em pacientes com síndrome digestiva ocasionada por *Tc*, o que conseqüentemente induz um aumento da expressão de citocinas que participam dos processos que corroboram para o desenvolvimento dessas síndromes no hospedeiro (de Souza-Basqueira et al., 2020).

Na avaliação da microbiota intestinal foi observado que no grupo WT (background SV129; mesmo background dos camundongos 5-LO KO) houve uma expansão de enterobactérias muito significativa após o pico da parasitemia (7º dia), mantendo o crescimento exponencial até o último dia de análise. Esses resultados sugerem que a 5- LO favorece a expansão do conteúdo de membros dessa família durante a infecção experimental por *Tc*. De fato, houve diferença estatística entre os grupos SOCS-2 KO e seu WT, sendo que a expansão do conteúdo de enterobactérias em animais SOCS-2-KO foi maior. A literatura descreve a via das LXs como reguladoras da inflamação intestinal (Goh et al., 2003), entretanto nossos dados sugerem que a enzima 5-LO durante a infecção pela cepa Y de *Tc* pode estar contribuindo com o crescimento da população de enterobactérias por vias celulares dependentes, como por exemplo, via células dendríticas, fazendo com que essa expansão ocorra na medida que a parasitemia aumenta no hospedeiro (Werz et al., 2018).

Esse trabalho teve como premissa averiguar o papel da via 5- LO bem como da proteína reguladora SOCS-2 no contexto do desenvolvimento da fase aguda da Doença de Chagas e como seria a relação parasito/microbiota durante a infecção em modelo murino, utilizando animais KO para essas proteínas importantes da resposta imune, buscando assim possíveis alvos terapêuticos, sejam eles compostos por microrganismos ou produtos celulares. Estudos adicionais serão necessários como análises histo-patológicas, isolamento microbiano para determinar qual a composição dessas enterobactérias, análises de PCR qualitativo e quantitativo, além de testes in vitro, para que possamos afunilar nossos possíveis alvos.

## 8. CONCLUSÃO

Coletivamente, nossos dados sugerem que a enzima 5-LO e SOCS-2 desempenham um papel crucial no desenvolvimento da patogênese da Doença de Chagas, afetando a taxa de sobrevivência, além de regular a expansão de enterobactérias no intestino durante a infecção experimental por Tc, e que SOCS-2 é essencial na proteção desse tecido.

## REFERÊNCIAS

1. Aidy, S. E., van den Bogert, B. and Kleerebezem, M. (2015) 'The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health', *Current Opinion in Biotechnology*, 32, pp. 14–20. doi: 10.1016/j.copbio.2014.09.005.
2. Alexander, W. S. (2002) 'Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 2(6), pp. 410–416. doi: 10.1038/nri818.
3. Aliberti, J. C. S. et al. (1996) 'Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes', *Infection and Immunity*, 64(6), pp. 1961–1967. doi: 10.1128/iai.64.6.1961-1967.1996.
4. Amaral, F. A. et al. (2008) 'Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), pp. 2193–2197. doi: 10.1073/pnas.0711891105.
5. Amato Neto, V., Campos, R. and Higaki, Y. (1974) 'Análise clínica e baseada em exames subsidiários de pacientes da qual foi isolada, há vinte e três anos, a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, pp. 238–244.
6. Andrade, P. M. M. and Carmo, M. G. T. (2006) 'Ácidos graxos n-3: Um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade', *MN-Metabólica*, 8(3), pp. 135–143.
7. Araújo-Jorge, T. C. de and Castro, S. L. de (2000) *Doença de chagas: manual para experimentação animal*, *Doença de chagas: manual para experimentação animal*. doi: 10.7476/9788575413937.
8. Barbosa, M. das G. V. et al. (2015) 'Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(September 2014), pp. 27–33. doi: 10.1590/0037-8682-0258-2013.
9. Barrientos, R. M. et al. (2009) 'Characterization of the sickness response in young and aging rats following *E. coli* infection', *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(4), pp. 450–454. doi: 10.1016/j.bbi.2009.01.016.

10. Basrai, H. S. and Turnley, A. M. (2016) 'The suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS2), traumatic brain injury and microglial/macrophage regulation', *Neural Regeneration Research*. Editorial Board of Neural Regeneration Research, pp. 1405– 1406. doi: 10.4103/1673-5374.191206.
11. Bassi, M. A. et al. (2020) 'Enhanced Reader.pdf', *Nature*, pp. 539–547.
12. Becerra, M. C. et al. (2012) 'In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms', *Experimental Parasitology*, 131(1), pp. 57–62. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.028.
13. Bogdan, C. and Röllinghoff, M. (1999) 'How do protozoan parasites survive inside macrophages?', *Parasitology Today*, 15(1), pp. 22–28. doi: 10.1016/S0169- 4758(98)01362-3.
14. Borges, B. C. et al. (2016) 'Mechanisms of infectivity and evasion derived from microvesicles cargo produced by *trypanosoma cruzi*', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(NOV), pp. 1–7. doi: 10.3389/fcimb.2016.00161.
15. Borges, C. L. et al. (2009) '5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease', *Immunology Letters*, 123(1), pp. 38–45. doi: 10.1016/j.imlet.2009.02.002.
16. Brant, F. et al. (2016) 'Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria', *Brain, Behavior, and Immunity*, 54, pp. 73–85. doi: 10.1016/j.bbi.2016.01.002.
17. Cai, C. W. et al. (2016) 'Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*', *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1005902.
18. Camposl, D. E. and Rami, a (1997) 'E. C. Oliveira', M. M. A. Stefani<sup>2</sup>, D. E. Camposl, A. L. S. S. Andrade<sup>3</sup>, S. A. Silva<sup>3</sup>, A. Rami and A. O.', *World Health*, pp. 25–27.
19. Caso, D. C. A. et al. (2019) 'Boletim Epidemiológico de Doença de Chagas Boletim Epidemiológico de Doença de Chagas', (Figura 1). Available at: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/2019-Boletim-epidemiológico-Doenças-de-Chagas-n.-01-3.pdf>.

20. Cerbán, F. M. et al. (2020) 'Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi* infection and immune response', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), p. 165707. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165707.
21. Chagas disease (American trypanosomiasis) (no date). Available at: [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1) (Accessed: 29 January 2021).
22. Chervovsky, A. V. (2013) 'Microbiota and autoimmunity', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). doi: 10.1101/cshperspect.a007294.
23. Costa, M. et al. (2013) 'Doença De Chagas: Uma Revisão Bibliográfica', *Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres*, 2(1). doi: 10.36607/refacer.v2i1.3376.
  
24. Coura, J. R. and De Castro, S. L. (2002) 'A critical review on chagas disease chemotherapy', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), pp. 3–24. doi: 10.1590/S0074-02762002000100001.
25. Cramer, A. et al. (2019) 'Role of SOCS2 in the Regulation of Immune Response and Development of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *Mediators of Inflammation*, 2019. doi: 10.1155/2019/1872593.
26. Cunha, P. A. da and da, P. A. (2017) 'Identificação e caracterização de enterobactérias de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar', pp. 1–157. Available at: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/180918>.
27. Custódio das Dôres, S. M., Rupp de Paiva, S. A. and Campana, Á. O. (2001) 'Vitamina K: Metabolismo e nutrição', *Revista de Nutricao*, 14(3), pp. 207–218.
28. Dias, J. C. P. et al. (2016) 'Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil', *Epidemiologia e serviços de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil*, 25(SPE), pp. 7–86. doi: 10.5123/S1679-49742016000500002.
29. Dorn, P. L. et al. (2017) 'The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9). doi: 10.1371/journal.pntd.0005878.

30. Duarte-Silva, E. et al. (2020) 'Targeting the Gut Microbiota in Chagas Disease: What Do We Know so Far?', *Frontiers in Microbiology*, 11(December). doi: 10.3389/fmicb.2020.585857.
31. Durack, J. and Lynch, S. V. (2019) 'The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy', *Journal of Experimental Medicine*, 216(1), pp. 20–40. doi: 10.1084/jem.20180448.
32. Dyke, T. E. Van and Introduction, I. (2003) 'Lipoxins in', *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(1), pp. 4–12.
33. Esper, L. et al. (2012) 'Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease', *American Journal of Pathology*, 181(1), pp. 130–140. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.042.
34. Esper, L. et al. (2014) 'Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection', *Microbes and Infection*, 16(6), pp. 481–490. doi: 10.1016/j.micinf.2014.03.007.
35. Fagundes, C. T. et al. (2011) 'Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system', *Microbes and Infection*, 13(14–15), pp. 1121–1132. doi: 10.1016/j.micinf.2011.07.012.
36. Finke, D. (2009) 'Induction of intestinal lymphoid tissue formation by intrinsic and extrinsic signals', *Seminars in Immunopathology*, 31(2), pp. 151–169. doi: 10.1007/s00281-009-0163-6.
37. Goh, J. et al. (2003) 'Lipoxins: Pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation', *Gastroenterology*, 124(4), pp. 1043–1054. doi: 10.1053/gast.2003.50154.
38. Gurung, M. et al. (2020) 'Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology', *EBioMedicine*, 51, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.051.
39. Hammer, R., Joel, D. D. and LeFevre, M. E. (1983) 'Ultrastructure of macrophages of the murine Peyer's patch dome', *Experimental Cell Biology*, 51(2), pp. 61–69. doi: 10.1159/000163175.

40. Jung, C., Hugot, J.-P. and Barreau, F. (2010) 'Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine', *International Journal of Inflammation*, 2010, pp. 1–12. doi: 10.4061/2010/823710.
41. Junqueira, C. et al. (2010) 'The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12(September), pp. 1–23. doi: 10.1017/S1462399410001560.
42. Kelly, J. R. et al. (2015) 'Breaking down the barriers: The gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(OCT). doi: 10.3389/fncel.2015.00392.
43. Khan, I. et al. (2019) 'Alteration of gut microbiota in inflammatory bowel disease (IBD): Cause or consequence? IBD treatment targeting the gut microbiome', *Pathogens*, 8(3), pp. 1–28. doi: 10.3390/pathogens8030126.
44. Kim, J. H. et al. (2018) 'Alterations in the p53-SOCS2 axis contribute to tumor growth in colon cancer', *Experimental and Molecular Medicine*, 50(4), pp. 1–10. doi: 10.1038/s12276-017-0001-1.
  
45. Kim, M. et al. (2016) 'Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses', *Cell Host and Microbe*, 20(2), pp. 202–214. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.001.
46. Van Kruiningen, H. J. et al. (2002) 'Distribution of Peyer's patches in the distal ileum', *Inflammatory Bowel Diseases*, 8(3), pp. 180–185. doi: 10.1097/00054725-200205000-00004.
47. Larigot, L. et al. (2018) 'AhR signaling pathways and regulatory functions', *Biochimie Open*, 7, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
48. Letellier, E. and Haan, S. (2016) 'SOCS2: Physiological and pathological functions', *Frontiers in Bioscience - Elite*, 8(1), pp. 189–204. doi: 10.2741/760.
49. Lima, L. M., Fraga, C. A. M. and Barreiro, E. J. (2002) 'Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos', *Química Nova*, 25(5), pp. 825–834. doi: 10.1590/s0100-40422002000500019.
50. MacDonald, T. T. et al. (1987) 'Selective biopsy of human Peyer's patches during ileal endoscopy', *Gastroenterology*, 93(6), pp. 1356–1362. doi: 10.1016/0016-5085(87)90266-6.

51. Machado, F. S. et al. (2006) 'Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent', *Nature Medicine*, 12(3), pp. 330–334. doi: 10.1038/nm1355.
52. Machado, F. S. et al. (2011) *Bioactive lipids in trypanosoma cruzi infection*. 1st edn, *Advances in Parasitology*. 1st edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3.
53. Machado, F. S. et al. (2012) 'Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease', *Seminars in Immunopathology*, 34(6), pp. 753–770. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7.
54. Machado, F. S. and Aliberti, J. (2006) 'Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease', *Immunologic Research*, 35(3), pp. 209–218. doi: 10.1385/IR:35:3:209.
55. Manarin, R. et al. (2013) 'Reciprocal influences between leptin and glucocorticoids during acute *trypanosoma cruzi* infection', *Medical Microbiology and Immunology*, 202(5), pp. 339–352. doi: 10.1007/s00430-013-0294-1.
56. Markworth, J. F. et al. (2013) 'Human inflammatory and resolving lipid mediator responses to resistance exercise and ibuprofen treatment', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 305(11). doi: 10.1152/ajpregu.00128.2013.
57. Martinez-Perez, A. et al. (2016) 'Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain', *Acta Tropica*, 157, pp. 145–150. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.032.
58. Mayer, E. A., Tillisch, K. and Gupta, A. (2015) 'Gut/brain axis and the microbiota', *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), pp. 926–938. doi: 10.1172/JCI76304.
59. McCall, L. I. et al. (2018) 'Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal microbiome and metabolome', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0006344.
60. Moncayo, A. and Ortiz Yanine, M. I. (2006) 'An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis)', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100(8), pp. 663–677. doi: 10.1179/136485906X112248.
61. Monti-Rocha, R. et al. (2019) 'SOCS2 is critical for the balancing of immune response and oxidative stress protecting against acetaminophen-induced acute

- liver injury', *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2018.03134.
62. Nagajyothi, F. et al. (2013) 'Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease', *American Journal of Pathology*, 182(3), pp. 886–894. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.11.027.
63. Naka, T. et al. (2001) 'SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN- $\gamma$  and IL-4 signaling in vivo', *Immunity*, 14(5), pp. 535–545. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00132-7.
64. Norman, K. et al. (2008) 'Prognostic impact of disease-related malnutrition', *Clinical Nutrition*, 27(1), pp. 5–15. doi: 10.1016/j.clnu.2007.10.007.
65. OPAS/OMS Brasil - Dia Mundial da Doença de Chagas: trazendo uma doença esquecida à atenção mundial (no date). Available at: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6144:dia-mundial-da-doenca-de-chagas-trazendo-uma-doenca-esquecida-a-atencao-mundial&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6144:dia-mundial-da-doenca-de-chagas-trazendo-uma-doenca-esquecida-a-atencao-mundial&Itemid=812) (Accessed: 30 January 2021).
66. Oriá, Reinaldo Barreto et al. (2016) 'Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal', *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*, pp. 369–388. doi: 10.5151/9788580391893-15.
67. Paixão, L. A. and Castro, F. F. dos S. (2016) 'Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro - doi: 10.5102/ucs.v14i1.3629', *Universitas: Ciências da Saúde*, 14(1). doi: 10.5102/ucs.v14i1.3629.
68. Payne, C., Wiffen, P. J. and Martin, S. (2017) 'Interventions for fatigue and weight loss in adults with advanced progressive illness', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(4). doi: 10.1002/14651858.CD008427.pub3.
69. Pinto, P. L. et al. (1999) 'Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice.', *Revista do Hospital das Clínicas*, 54(5), pp. 141–146. doi: 10.1590/S0041-87811999000500002.
70. Punukollu, G. et al. (2007) 'Clinical aspects of the Chagas' heart disease', *International Journal of Cardiology*, 115(3), pp. 279–283. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.03.004.

71. Ramirez, D. and Giron, M. (2020) Enterobacter Infections, StatPearls. Available at:
72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644722> (Accessed: 30 January 2021).
73. Ramírez, J. D. and Hernández, C. (2018) 'Trypanosoma cruzi I: Towards the need of genetic subdivision?, Part II', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., pp. 53–58. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.05.005.
74. Ramiro-Puig, E. et al. (2008) 'El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario', *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 100(1), pp. 29–34. doi: 10.4321/s1130-01082008000100006.
75. Rassi, A. et al. (1999) 'Efeito protetor do benznidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo Trypanosoma cruzi e tratados com corticóide em virtude de afecções associadas', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(5), pp. 475–482. doi: 10.1590/s0037-86821999000500002.
76. Rassi, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. (2009) 'Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), pp. 152–158. doi: 10.1590/s0074-02762009000900021.
77. Rezende-oliveira, K., Sarmiento, R. R. and Junior, V. R. (2012) 'Article / Artigo Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with Trypanosoma cruzi Produção de citocinas e quimiocinas por células mononucleares e células do sangue total humano após infecção com', *European Journal of Immunology*, 45(1), pp. 45–50.
78. Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A. and Fernández-Pérez, L. (2006) 'Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 17(6), pp. 431–439. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.008.
79. Rodrigues Coura, J. et al. (no date) 'Case Report Editorial Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(4):389-390, The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges'. doi: 10.1590/0037-8682-0143-2013.

80. Romano, M. et al. (2015) 'Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation', *European Journal of Pharmacology*, 760, pp. 49–63. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.083.
81. Santos, C. F. (1998) 'Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice'.
82. Santos, E. F. et al. (2020) 'Acute chagas disease in brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pntd.0008445.
83. Schwabl, P. et al. (2020) 'Culture-free genome-wide locus sequence typing (GLST) provides new perspectives on *Trypanosoma cruzi* dispersal and infection complexity', *PLoS Genetics*, 16(12). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1009170.
84. Secatto, A. (2018) '5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection'. doi: 10.1371/journal.pone.0031701.
85. Serhan, C. N. (2005) 'Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution', *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(3–4), pp. 141–162. doi: 10.1016/j.plefa.2005.05.002.
86. Serhan, C. N. and Chiang, N. (2008) 'Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A new pharmacologic genus', *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1), pp. 200–215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707489.
87. Silberstein, E. et al. (2018) 'A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging', *PLoS ONE*, 13(4), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0195879.
88. Da Silveira, E. A. et al. (2016) 'Correlation between infection rate of triatomines and chagas disease in southwest of Bahia, Brazil: A warning sign?', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(3), pp. 1941–1951. doi: 10.1590/0001-3765201620150744.

89. Simões, M. V. et al. (2018) 'Chagas Disease Cardiomyopathy', *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 31(2), pp. 173–189. doi: 10.5935/2359-4802.20180011.
90. Sordi, R. et al. (2013) 'Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis', *International Immunopharmacology*, 17(2), pp. 283–292. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.010.
91. Souza-Basqueira, M. et al. (2020) 'Gut Dysbiosis in Chagas Disease. A Possible Link to the Pathogenesis', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(August), pp. 1–8. doi: 10.3389/fcimb.2020.00402.
92. Sumida, C., Graber, R. and Nunez, E. (1993) 'Role of fatty acids in signal transduction: Modulators and messengers', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 48(1), pp. 117–122. doi: 10.1016/0952-3278(93)90019-S.
93. Talvani, A. et al. (2002) 'Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection', *Infection and Immunity*, 70(8), pp. 4247–4253. doi: 10.1128/IAI.70.8.4247-4253.2002.
94. Tang, W. H. W., Kitai, T. and Hazen, S. L. (2017) 'Gut microbiota in cardiovascular health and disease', *Circulation Research*, 120(7), pp. 1183–1196. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
95. Tateishi, N. et al. (2014) 'Dietary supplementation of arachidonic acid increases arachidonic acid and lipoxin A4 contents in colon, but does not affect severity or prostaglandin E2 content in murine colitis model', *Lipids in Health and Disease*, 13(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1476-511X-13-30.
96. Teotônio, I. M. S. N. et al. (2019) 'Intestinal microbiota – A modulator of the *Trypanosoma cruzi*-vector-host triad', *Microbial Pathogenesis*, 137(July). doi: 10.1016/j.micpath.2019.103711.
97. Toledo, D. A. M. et al. (2016) 'Lipid body organelles within the parasite *trypanosoma cruzi*: A role for intracellular arachidonic acid metabolism', *PLoS ONE*, 11(8), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0160433.
98. Trengove, M. C. and Ward, A. C. (2013) 'Review Article SOCS proteins in development and disease', *American journal of clinical and experimental immunology*, 2(1), pp. 1–29. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3714205&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> (Accessed: 30 January 2021).
99. Ungaro, F. et al. (2017) 'Actors and factors in the resolution of intestinal inflammation: Lipid mediators as a new approach to therapy in inflammatory bowel diseases', *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), pp. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2017.01331.
  100. Uren, R. T. et al. (2014) 'A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology', *Journal of Neurochemistry*, 129(4), pp. 614–627. doi: 10.1111/jnc.12671.
  101. Val, C. H. et al. (2020) 'SOCS2 modulates adipose tissue inflammation and expansion in mice', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 76, p. 108304. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108304.
  102. Wang, J. and Campbell, I. L. (2002) 'Cytokine signaling in the brain: Putting a SOCS in it?', *Journal of Neuroscience Research*, 67(4), pp. 423–427. doi: 10.1002/jnr.10145.
  103. Werz, O. et al. (2018) 'Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-017-02538-5.
  104. Williams, T. et al. (2020) 'Induction of effective immunity against *Trypanosoma cruzi*', *Infection and Immunity*, 88(4). doi: 10.1128/IAI.00908-19.
  105. Xie, W. et al. (2020) 'Association of Weight Loss Between Early Adulthood and Midlife With All-Cause Mortality Risk in the US', *JAMA network open*, 3(8), p. e2013448. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.13448.
  106. Yoshimura, A., Naka, T. and Kubo, M. (2007) 'SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation', *Nature Reviews Immunology*, 7(6), pp. 454–465. doi: 10.1038/nri2093.
  107. Zalar, B., Haslberger, A. and Peterlin, B. (2018) 'The role of microbiota in depression - A Brief review', *Psychiatria Danubina*, 30(2), pp. 136–141. doi: 10.24869/spsih.2018.136.
  108. Zhu, W. et al. (2018) 'Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis', *Nature*, 553(7687), pp. 208–211. doi: 10.1038/nature25172.