

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CAMILA BOTELHO MIGUEL

**EFEITO BIOLÓGICO DA LECTINA ARTINM NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

UBERABA-MG

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CAMILA BOTELHO MIGUEL**

**EFEITO BIOLÓGICO DA LECTINA ARTINM NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. Javier Emílio Lazo Chica

**UBERABA
2017**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M577e Miguel, Camila Botelho
Efeito biológico da Lectina ArtinM na fase crônica da infecção
experimental pelo *Trypanosoma cruzi* / Camila Botelho Miguel. --
2017.

63 f. il. : fig., graf.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Javier Emílio Lazo Chica

1. Doença de chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Lectina de liga-
ção a manose. 4. Camundongos Endogâmicos BALB C. I. Chica,
Javier Emílio Lazo. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 616.937

***“Mais cedo ou mais tarde, a teoria sempre acaba assassinada
pela experiência”.***

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que hoje sofrem com a Doença de Chagas, aos que aguardam pelo desenvolvimento de novas formas de tratamento, aos pesquisadores para que tenham incentivo em continuarem com as pesquisas, aos animais que sem escolha, serviram de instrumento para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela oportunidade de continuar os estudos, por me iluminar e amparar nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Javier Emilio Lazo Chica pela confiança, dedicação, disposição, ensinamentos, oportunidades e pela amizade que construímos ao longo do tempo.

Aos meus pais Márcio e Fátima, minha irmã Renata, avó, tios, tias e primos, pelo apoio e compreensão nos momentos necessários.

Ao meu companheiro, amigo e namorado Wellington Francisco Rodrigues pela força, incentivo, apoio em todas as etapas deste trabalho e em momentos da minha vida.

À Prof^a. Maria Cristina Roque Barreira pela continuidade da parceria com nosso grupo de pesquisa, por fornecer a Lectina ArtinM e pela disponibilidade do laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao Thiago Aparecido da Silva, que nos ajudou em todos os procedimentos que foram realizados na USP.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Celular da UFTM: João Batista Pereira pela ajuda no processamento e corte histológico, pela atenção, paciência e amizade; Júlio César e Claudiney pela participação mesmo que indireta, promovendo uma boa convivência e ajuda nos momentos necessários.

Aos amigos e colegas pelas colaborações e apoio nos momentos necessários.

À banca examinadora pela contribuição, conhecimento e sugestões no aperfeiçoamento desta tese.

Enfim, a todos os listados, os não listados e os que participaram de alguma forma, o meu muito obrigada!!!

APOIO FINANCEIRO

- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM),
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),
- Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (USP-RP);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Introdução: A doença de Chagas é causada por infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e o perfil de resposta imune do hospedeiro é essencial para o controle da infecção. ArtinM, de *Artocarpus heterophyllus*, uma lectina que se liga a manose, modula a imunidade em relação eixo Th1 e confere resistência aos agentes patogênicos intracelulares. **Objetivos:** Analisar o efeito da imunomodulação promovida por ArtinM durante a fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. **Material e Métodos:** Foram utilizados 39 camundongos BALB/c, com 10 semanas de idade conformando os grupos: Controle, PBS e ArtinM. Para a infecção foi utilizada uma concentração de parasitos de 3×10^3 tripomastigotas sanguíneos por via subcutânea. Os animais dos grupos Controle e PBS receberam 100 μ l de solução PBS 1x e para o grupo ArtinM foram administrados lectina ArtinM na concentração de 0,5 μ g/100 μ l por via subcutânea. Foram realizados tratamentos por 3 dias consecutivos e após 2 dias de descanso foi realizada a infecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi*. Posteriormente os animais receberam tratamento a cada 5 dias após infecção por 30 dias. Foram realizadas pesagem diária e parasitemia a cada 7 dias. Após 90 dias de infecção os animais foram eutanasiados e submetidos à necropsia. Foram coletados o sangue, coração e intestino. **Resultados:** Os animais infectados obtiveram um ganho de peso até o 15º dia após a infecção. Posteriormente perderam peso, não evidenciando diferenças significativas entre os grupos infectados. Para a curva de parasitemia houve um pico com 28 dias para ambos os grupos, o grupo ArtinM mostrou diferenças significativas comparado ao grupo PBS até esta data. Para o leucograma e citocinas (TNF- α , IL-12p40, IFN- γ e IL-10) não houve diferenças entre os grupos testados. A quantificação do número de células/mm² e porcentagem de colágeno no tecido cardíaco e intestino mostrou diferenças significativas entre os grupos infectados comparados ao grupo Controle. O número de ninhos de *T. cruzi*/cm² para ambos os tecidos mostrou discreta diminuição no grupo ArtinM. **Conclusão:** A Lectina ArtinM apresentou um efeito biológico na infecção crônica por *T. cruzi*.

Palavras-chave: *T. cruzi*, Lectina ArtinM, Balb/c

ABSTRACT

Introduction: Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* infection and the host immune response profile is essential for infection control. ArtinM, from *Artocarpus heterophyllus*, a mannose-binding lectin, modulates immunity to the Th1 axis and confers resistance to intracellular pathogens. **Objectives:** To analyze the effect of the immunomodulation promoted by ArtinM during the chronic phase of the experimental infection by *T. cruzi*. **Material and Methods:** We used 39 BALB/c mice, with 10 weeks of age constituting the groups: Control, PBS and ArtinM. For the infection, a concentration of parasites of 3×10^3 blood trypomastigotes subcutaneously was used. The animals of the Control and PBS groups received 100 μ l of 1x PBS solution and for the ArtinM group, the ArtinM lectin was administered at the concentration of 0.5 μ g/100 μ l subcutaneously. Treatments were carried out for 3 consecutive days and after 2 days of rest the infection with the Colombian strain of *T. cruzi* was performed. Subsequently the animals received treatment every 5 days after infection for 30 days. Daily weighing and parasitemia were performed every 7 days. After 90 days of infection the animals were euthanized and submitted to necropsy. The blood, heart and intestine were collected. **Results:** The infected animals obtained a weight gain until the 15th day after infection. Subsequently they lost weight percentage, not evidencing significant differences between the infected groups. For the parasitemia curve there was a 28 day peak for both groups, the ArtinM group showed significant differences compared to the PBS group to date. For leukogram and cytokines (TNF- α , IL-12p40, IFN- γ and IL-10) there were no differences between the groups tested. The quantification of the number of cells/mm² and percentage of collagen in cardiac and intestinal tissue showed significant differences between the infected groups compared to the Control group. The number of *T. cruzi*/cm² nests for both tissues showed a slight decrease in the ArtinM group. **Conclusion:** Lectin ArtinM presented a biological effect on chronic *T. cruzi* infection.

Key words: *T. cruzi*, Lectin ArtinM, Balb/c

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Delineamento experimental, divisão dos grupos de animais.....22
- Figura 2** Cronograma de atividades do experimento23
- Figura 3** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de microscopia. Os cortes de 6 µm de espessura foram distribuídos em 10 lâminas, sendo quatro cortes em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60 µm. Para a contagem do número de células foram utilizados dois cortes com distância de 120 µm (lâminas destacadas em vermelho). Para quantificação do colágeno e análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados 1 lâmina com quatro cortes de cada animal.25
- Figura 4.** Figura representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das imagens com objetiva de 20X para posterior análise do número de células no tecido cardíaco. As regiões demarcadas em amarelo correspondem aos locais onde foram realizadas as capturas microscópicas nos ventrículos esquerdos, direitos e septos.27
- Figura 5.** Quantificação do número de células do tecido cardíaco utilizado o programa ImageJ no modo semi-automático. Em **A**, observa-se o layout do programa com a linha de comandos. Em **B**, a linha de comando Color Threshold com as devidas calibrações. Em **C**, a imagem capturada na objetiva de 20X com a marcação dos núcleos das células do tecido cardíaco. Em **D**, a máscara do programa mostrando os pontos que serão contados. Em **E**, os valores da contagem dos núcleos marcados das células cardíacas.28
- Figura 6.** Figura representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das imagens com objetiva de 20X para posterior quantificação do colágeno no tecido cardíaco. A região demarcada em amarelo corresponde ao local onde foram realizadas as capturas microscópicas no ventrículo esquerdo e direito.....29
- Figura 7.** Quantificação do colágeno no tecido cardíaco através da grade de pontos com área pré-determinada. Em **A**, observa-se a imagem capturada na objetiva de 20X e quadriculada em 25 áreas. A análise das áreas foi feita no sentido das linhas pontilhadas. Em **B**, mostra-se a área marcada com a letra **X** em maior aumento, onde 16 pontos amarelos recaíram sobre área com fibrose.30
- Figura 8.** Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco através da grade com área pré-determinada. Em **A**, observa-se a imagem capturada na objetiva de 40X e quadriculada em 25 áreas. A análise das áreas foi feita no sentido das linhas pontilhadas. Em **B**, mostra-se a área marcada com a letra **X** em maior aumento, onde observamos a presença de marcações exclusivas de amastigotas. 32
- Figura 9.** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de microscopia. Os cortes de 5 µm de espessura foram distribuídos em 20 lâminas, sendo quatro cortes em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 50 µm. Para a contagem do número de células foram utilizados quatro cortes com distância de 200 µm (lâminas destacadas em vermelho). Para análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados 1 lâmina com quatro cortes de cada animal infectado.34

- Figura 10.** Quantificação do número de células e ninhos de amastigotas na camada muscular do intestino através da grade com área pré-determinada. Observa-se a imagem do tecido proveniente da imunohistoquímica, onde foi capturada na objetiva de 40X e quadriculada em 25 áreas. A contagem do número de células e ninhos de amastigotas foi feita no sentido das linhas pontilhadas.....36
- Figura 11.** Representação esquemática das medições do comprimento (A) e largura (B) do intestino a fresco. As medições foram realizadas através do programa ImageJ. Em A, mostra-se o intestino grosso coletado entre a porção do ceco ao reto. A linha em vermelho mostra o local onde foi feita a medição do comprimento, expresso em cm. Em B, mostra-se a porção final do intestino grosso onde foram feitas as medições da largura. Foram usados os últimos 5 cm distais do segmento intestinal e feitas 10 medições em sentido transversal ao eixo maior, o resultado foi expresso pela média das 10 medições em mm.37
- Figura 12.** Curva de Parasitemia realizada a cada 7 dias durante 90 dias de infecção. O gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-paramétrico (Teste "Mann Whitney") e média \pm EPM quando usado teste paramétrico (Teste "t" não pareado). α = Diferenças estatisticamente significantes no décimo quarto e vigésimo primeiro dia de infecção, $p < 0,05$39
- Figura 13.** Curva de Peso. O gráfico representa a porcentagem de perda ou ganho de peso no período de 90 dias. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-paramétrico (Teste "Mann Whitney") e média \pm EPM (Teste "t" não pareado) quando usado teste paramétrico. *Diferenças estatisticamente significantes dos grupos infectados x controle, $p < 0,05$40
- Figura 14.** Curva de Sobrevida. O gráfico representa a porcentagem de sobrevida dos animais infectados com *T. cruzi* e que receberam ou não tratamento com ArtinM no período de 90 dias. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, $p > 0,05$41
- Figura 15.** Número de células no tecido cardíaco expresso em mm^2 de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em média \pm EPM. *Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PBS e ArtinM x Controle, $p < 0,05$. Teste ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison".42
- Figura 16.** Quantificação de colágeno no tecido cardíaco expresso em % de acordo com os grupos: PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). α = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PBS x ArtinM, $p < 0,05$. Teste "Mann Whitney".43
- Figura 17.** Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica, expressos em cm^2 de acordo com os grupos PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em média \pm EPM. Não houve diferenças estatisticamente significantes, $p > 0,05$. Teste "t" não pareado.44
- Figura 18.** Quantificação de citocinas TNF- α , IL-12p40, IFN- γ e IL-10 no tecido cardíaco dos animais de acordo com os grupos PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, $p > 0,05$. "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison".....45

- Figura 19.** Número de células no intestino expresso em mm² de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBS e ArtinM x Controle, p<0,05. “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.....46
- Figura 20.** Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no intestino por Imunohistoquímica, expressos em cm² de acordo com os grupos: PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, p>0,05. T não-paramétrico "Mann Whitney test".47
- Figura 21.** Medições de comprimento (A), largura (B) e relação do peso do intestino / peso corporal (C) expressos em mm, cm e % respectivamente, de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo) para A (“Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”) e média ± EPM para B e C (ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison"). *Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Infectados x Controle, p<0,05.....48
- Figura 23.** Quantificação de Leucócitos no sangue periférico dos animais de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, p>0,05. “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.50

SUMÁRIO

APOIO FINANCEIRO	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
SUMÁRIO.....	xi
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Aspectos gerais.....	13
1.2. Fisiopatologia	14
1.3. Resposta Imunológica.....	15
1.4. Tratamento.....	16
1.5. Lectina ArtinM	16
2. HIPÓTESE	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Protocolo do CEUA	21
4.2. Animais	21
4.3. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
4.4. Lectina ArtinM	22
4.5. Desenho experimental	22
4.6. Exame parasitológico	24
4.7. Eutanásia	24
4.8. Necropsia	24
4.9. Preparo do coração para cortes histológicos	24
4.10. Análise Morfométrica	26
4.10.1. Captura das imagens microscópicas	26
4.10.2. Número de células no tecido cardíaco	26
4.10.3. Quantificação do colágeno no tecido cardíaco	29
4.11. Imunohistoquímica	31
4.11.1. Quantificação do número de ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco	31
4.12. Dosagem das citocinas	32
4.13. Preparo do intestino para cortes histológicos.....	33
4.14. Análise Morfométrica	35
4.14.1. Captura das imagens microscópicas	35
4.14.2. Contagem do número de células da camada muscular do intestino e ninhos de amastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
4.15. Relação do peso do intestino / peso corporal, medidas de largura e comprimento do intestino a fresco	36
4.16. Contagem de leucócitos no sangue periférico	37
4.17. Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Curva de Parasitemia.....	39
5.2. Curva de Peso	40
5.3. Curva de Sobrevida	41
5.4. Número de células no tecido cardíaco	42
5.5. Quantificação do colágeno no tecido cardíaco	43

5.6. Quantificação dos ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco por Imunohistoquímica	44
5.7. Quantificação de citocinas no tecido cardíaco	45
5.8. Número de células no intestino	46
5.9. Quantificação dos ninhos de <i>T. cruzi</i> no intestino por Imunohistoquímica	47
5.10. Medições de largura, comprimento e relação do peso do intestino / peso corporal	48
5.11. Quantificação de Leucócitos no sangue periférico	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A doença de Chagas (DC) é classificada como uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909; Ministério da Saúde, 2015), apresenta curso clínico bifásico, com uma fase aguda por vezes não identificada, podendo evoluir para a fase crônica, a qual pode apresentar-se de quatro formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Rassi *et al.*, 2002; Chagas, 1909; Ministério da Saúde, 2015). A distribuição mundial da doença era limitada primariamente ao continente americano. Atualmente, a doença tem alcançado países não endêmicos, mediante o deslocamento de pessoas infectadas e por meio de outros mecanismos de transmissão, como resultado do intenso processo de globalização (Moncayo e Silveira, 2009; Pinto Dias, 2013; Coura *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2016).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde estima-se em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina (Dias *et al.*, 2016; WHO, 2016). O custo do tratamento para a DC continua a ser substancial. Só na Colômbia, o custo anual dos cuidados médicos para todos os pacientes com a doença foi estimado em cerca de 267 milhões de dólares em 2008. A pulverização de inseticidas para controlar vetores custaria cerca de 5 milhões de dólares por ano (WHO, 2016). Embora seja considerada uma doença negligenciada, esforços têm sido feitos para alcançar novos alvos terapêuticos e vacinais, ou mesmo na tentativa de esclarecimentos de rotas da doença, dada pela diversidade e heterogeneidade dos aspectos clínicos da doença (Rodrigues *et al.*, 2010; Da Silva e Silva, 2016; Lechuga *et al.*, 2016; Seid *et al.*, 2016; Vallejo *et al.*, 2016).

A DC evolui em duas fases distintas: aguda com duração de aproximadamente 60 dias e crônica com duração indeterminada. A fase aguda pode apresentar-se assintomática ou com uma sintomatologia própria, caracterizada por sinal de porta de entrada (sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação), febre, sinais de insuficiência cardíaca, edema de face e de membros inferiores, enfartamento ganglionar e hepatoesplenomegalia, além da elevada parasitemia

1 circulante (Rezende *et al.*, 1993), que tendem a diminuir espontaneamente com 3 a
2 8 semanas. A evolução da doença levará para a fase crônica onde a quantidade de
3 parasitos circulantes se torna menor, porém o mesmo pode ser visualizado na
4 intimidade dos tecidos. Em alguns casos esta fase pode se apresentar
5 assintomática, caracterizando a forma indeterminada da DC. Porém, existem
6 pessoas que os sintomas se manifestam durante a fase crônica e estes irão
7 determinar formas anátomo-clínicas distintas, que são: Cardíaca, Digestiva, Mista
8 (cardíaca e digestiva), Nervosa e nas últimas décadas foram relatadas a reativação
9 da DC (Prata, 1990; Lopes *et al.*, 2000). Na fase crônica, cerca de 20% a 30% dos
10 pacientes infectados evoluem para a forma clínica cardíaca ou digestiva em até 30
11 anos. Além disso, cerca de 20% a 25% dos infectados apresentam progressivo dano
12 cardíaco resultante da destruição maciça de cardiomiócitos e do sistema condutor, a
13 cardiomiopatia chagásica crônica (Cunha-Neto *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2000).

14

15 1.2. Fisiopatologia

16

17 No período que compreende a fase aguda da doença, ocorre uma lesão
18 inflamatória causada pelo *T. cruzi* que está relacionada com a presença das distintas
19 formas do parasito no interstício, levando a uma inflamação aguda de início focal
20 podendo se tornar difusa. Esta inflamação será caracterizada por edema intersticial,
21 hiperplasia reativa de nódulos linfáticos e infiltrado mononuclear. O parasitismo
22 nessa fase é intenso, podendo ser encontrado no tubo digestivo, produzindo lesão
23 do sistema nervoso intramural, além de células musculares, fibroblastos, células
24 gliais e raramente nos neurônios do sistema nervoso. A miocardite aguda é
25 encontrada em biópsia e necropsia de pacientes com DC na fase aguda,
26 abrangendo até mesmo os pacientes que não apresentavam outro
27 comprometimento cardíaco (Lopes *et al.*, 1981; Parada *et al.*, 1997; Prata, 1990).

28

29 Com o passar do tempo já na fase crônica, os níveis de parasitos no sangue
30 circulante diminuem e os mesmos são encontrados nos tecidos afetados e são
31 responsáveis por provocar uma resposta inflamatória crônica levando à uma
32 disfunção do órgão. Neste período está instalada a fase crônica da DC. Estudos do
33 cólon e esôfago de pacientes com a forma digestiva da DC demonstram dilatação e

1 hipertrofia muscular. Há também lesões causadas por processo inflamatório focal,
2 redução no número de neurônios do plexo mioentérico, fibrose periganglionar e
3 intraganglionar acompanhada de proliferação de células de Schwann (Adad *et al.*,
4 2013; Pinheiro *et al.*, 2003; Kirchhoff, 1996; Lopes *et al.*, 2000). A forma cardíaca é
5 uma manifestação clínica da doença que caracteriza-se por palpitações (taquicardia)
6 e batimentos cardíacos fora de ritmo (extra-sístoles e arritmias), tonteiras, dor no
7 peito, falta de ar em esforços físicos, insuficiência cardíaca progressiva (Dávila *et al.*,
8 2002).

9

10 1.3. Resposta Imunológica

11

12 As manifestações clínicas da DC no homem se devem à resposta imune
13 dirigida ao parasito. A infecção pelo *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do
14 sistema imune, levando ao aparecimento de respostas celulares e humorais
15 específicas contra o parasito, sendo importantes na redução da carga parasitária,
16 porém podendo contribuir para o aparecimento de manifestações crônicas
17 observadas em alguns pacientes. Todas as fases da doença (assintomática,
18 indeterminada e sintomática) apresentam resposta imunológica contra o parasito
19 (Andrade *et al.*, 2000). A resposta imune anti-*T. cruzi* pode ser considerada mista por
20 envolver a resposta imune inata, celular e humoral. Mesmo com esses potentes
21 mecanismos de defesa, o parasito desenvolveu formas de evasão. Há mecanismos
22 de evasão que desativam o poder fagocitário de macrófagos, escape de lise por
23 complemento, supressão ectópica, ativação policlonal, imunodepressão, ativação
24 preferencial de linfócitos T CD4+ do tipo Th2 (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Durante a
25 fase aguda ocorre uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias como IL-12,
26 TNF- α e IFN- γ , além de quimiocinas que são responsáveis por direcionar a resposta
27 inflamatória para o tecido alvo. Macrófagos e células dendríticas fagocitam o parasito
28 e expressam IL-12, junto às moléculas coestimuladoras, que dará início à produção
29 de IFN- γ específica de células T (Bilate e Cunha-Neto, 2008). As células NK têm um
30 papel importante nos primeiros dias de infecção devido à manutenção da produção
31 de IFN- γ , o qual é essencial na primeira semana de infecção (Cardillo *et al.*, 1996); a

1 partir da segunda semana a produção é derivada principalmente das células T CD4+
2 (Borges *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*, 2015.)

3 4 1.4. Tratamento

5
6 Atualmente não existe uma vacina para a DC e o tratamento disponível
7 apresenta elevado custo para os serviços de saúde. Estão disponíveis no mercado
8 medicamentos como o Benznidazol e o Nifurtimox, que são drogas com elevada
9 toxicidade e não garantem a cura após a disseminação e instalação do parasito nos
10 órgãos e tecidos do hospedeiro vertebrado (WHO, 2002; Rassi e Marin-Neto, 2010;
11 Novaes *et al.*, 2015).

12 Embora atualmente sejam realizadas pesquisas na busca de drogas capazes
13 de inibir o parasitismo, instalação e desenvolvimento da doença, os alvos
14 terapêuticos apresentam eficácia limitada (Muñoz *et al.*, 2011). Na ausência de
15 drogas mais eficientes, a quimioterapia convencional permanece como a principal
16 estratégia de tratamento etiológico da DC (Cançado, 2002; Sosa-Estani *et al.*, 2009;
17 Muñoz *et al.*, 2011), porém apresenta efeitos colaterais como reações de
18 hipersensibilidade, anorexia, vômitos, polineurite e depressão da produção de
19 células pela medula óssea devido à sua elevada toxicidade (Docampo, 1990; Urbina
20 e Docampo, 2003).

21 Atualmente o Benzonidazol é uma droga clinicamente prescrita para
22 tratamento de pacientes chagásicos nas últimas décadas (Muñoz *et al.*, 2011;
23 Novaes *et al.*, 2015). Tendo em vista a elevada morbidade e mortalidade causada
24 pela DC, a toxicidade e eficiência limitada do tratamento atualmente disponível, é de
25 extrema importância desenvolver novos métodos e esquemas terapêuticos menos
26 nocivos e mais eficientes (Muñoz *et al.*, 2011).

27 28 1.5. Lectina ArtinM

29
30 Durante mais de 20 anos, a professora Doutora Maria Cristina Roque
31 Antunes Barreira (graduada em Medicina pela Universidade Federal do Paraná,
32 docente da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, vinculada ao

1 Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos) extraiu
2 uma proteína da semente da jaca, e esta proteína *Artocarpus integrifolia* é uma
3 lectina ligada à manose na superfície de células do sistema imunológico que
4 estimula a produção de substâncias contra patógenos (Rosa *et al.*, 1999; Teixeira *et*
5 *al.*, 2006; Coltri *et al.*, 2008). A proteína purificada foi designada a proteína KM+,
6 atualmente chamada ArtinM. O estudo de ArtinM é realizado na indução de células
7 do sistema imunológico para a produção de citocinas, onde uma resposta imune
8 mais eficaz ocorre contra certos microorganismos em estudo (Rosa *et al.*, 1999;
9 Teixeira *et al.*, 2006; Pereira-da-Silva *et al.*, 2008).

10 No entanto a lectina ArtinM pode demonstrar uma interação molecular
11 importante com a resposta imune do hospedeiro, além de ser aplicada em várias
12 situações, tais como para o tratamento, prevenção e cura de doenças (Panunto-
13 Castelo *et al.*, 2001; Coltri *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2011).

14 A descoberta de lectina ArtinM teve como objetivo capacitar os eventos da
15 imunidade inata. ArtinM por si só, associada ou presente no extrato da jacalina é
16 capaz de induzir respostas imune de proteção Th1 e Th17 contra infecção por
17 *Candida albicans* (Custodio *et al.*, 2011). O perfil Th1 e Th17 do sistema imune na
18 luta contra a infecção por *C. albicans* já foi abordado em outros estudos utilizando
19 camundongos como modelo experimental (Zelante *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009).

20 Além disso foi reportada a interação dos receptores D-manose em
21 macrófagos usando a lectina ArtinM e a produção de TNF- α , uma citocina importante
22 da imunidade inata capaz de mediar vários processos pró-inflamatórios (Bradley,
23 2008; Loyola *et al.*, 2012).

24 De acordo com Teixeira *et al.*, (2006), a ativação da imunidade inata
25 associada com a produção de IFN- γ induzida, é um importante mecanismo vacinal
26 contra infecção por Leishmaniose. Assim, a ação de ArtinM aumenta a potência de
27 modulação da resposta desejada para combater a doença.

28 Panunto-Castelo *et al.*, (2001), verificaram a resposta ao perfil de infecção por
29 *Leishmania major* quando estimulados por IL-12 ou IL-4, respectivamente.
30 Observações indicam que ArtinM induz IL-12 p40 *in vivo* e tem um efeito protetor
31 contra a infecção por *Leishmania major*.

1 Além disso, Kim *et al.*, (2013) analisaram os efeitos da ArtinM na cicatrização
2 de feridas na mucosa palatina de ratos e novamente ArtinM foi eficaz, através da
3 associação do TGF- β , liberação de VEGF, proliferação celular, reepitelização,
4 deposição de colágeno e arranjo das fibras. Somando-se a estes efeitos, Chahud *et*
5 *al.*, (2009) relataram que a aplicação tópica de KM+, pode facilitar a cicatrização de
6 feridas epiteliais da córnea em coelhos por meio de um mecanismo que envolve o
7 aumento do influxo de neutrófilos para a área ferida induzida por lectina.

8 No entanto esta molécula, Lectina ArtinM, demonstrou uma forte associação
9 com o sistema imunitário, o que provou ser eficaz nos processos de modulação da
10 resposta imune frente a diferentes modelos experimentais. Estes dados também
11 indicam que estudos com lectina ArtinM devem ser extrapolados para outros
12 modelos experimentais, porque pode-se encontrar mecanismos interessantes que
13 favorecem o controle de várias doenças infecciosas e não infecciosas. Assim o
14 presente estudo objetivou a compreensão da interação entre DC e tratamento com
15 lectina ArtinM na fase crônica da DC experimental.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 2. HIPÓTESE

2

3 A administração da lectina ArtinM em camundongos Balb/c poderia levar a
4 alterações na parasitemia, número de células, ninhos de *T. cruzi*, colágeno e
5 citocinas no tecido cardíaco e intestino, largura e comprimento do intestino e número
6 de leucócitos no sangue periférico durante a infecção experimental crônica por *T.*
7 *cruzi*.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar o efeito da imunomodulação promovida por ArtinM durante a fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a curva de parasitemia, sobrevida e peso diário na fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi* dos animais tratados ou não pela lectina;
- Quantificar o número de células no tecido cardíaco e intestino dos animais tratados ou não pela lectina;
- Quantificar a fibrose no tecido cardíaco dos animais tratados ou não pela lectina;
- Quantificar o número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco e intestino dos animais tratados ou não pela lectina;
- Quantificar as citocinas no homogeneizado do coração dos animais tratados ou não pela lectina;
- Medir a largura e comprimento do intestino a fresco dos animais tratados ou não pela lectina;
- Quantificar o número de leucócitos no sangue periférico dos animais tratados ou não pela lectina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Protocolo do CEUA

O parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) está registrado com o protocolo de número 157, aprovado no dia 01 de julho de 2010.

4.2. Animais

Foram utilizados 39 camundongos machos da linhagem BALB/c com 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, mantidos no biotério da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba-MG. Os animais ficaram em sala especial, com renovação constante de ar, à temperatura de 22 a 26°C e umidade entre 45 e 55%, expostos a um ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e alocados em gaiolas plásticas de 414 mm x 344 mm x 168 mm. A alimentação foi com ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. – Curitiba – PR) e água esterilizada oferecida *ad libitum*. A água e a maravalha passaram pelo processo de esterilização antes de serem oferecidas aos animais. Todos os procedimentos realizados estão em conformidade com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório, antigo COBEA (Andersen *et al.*, 2004; Mezdri *et al.*, 2004; Franco, 2005).

4.3. Cepa de Trypanosoma cruzi

Para produzir a infecção nos animais pelo *T. cruzi*, foi utilizada a cepa “Colombiana”, MHOM/CO/00Colombiana (*T. cruzi* I) (Andrade e Magalhães, 1997; De Araújo-Jorge e De Castro, 2000), que é mantida no biotério da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG.

4.4. Lectina ArtinM

A lectina ArtinM foi obtida e purificada de acordo com a padronização de Santos-De-Oliveira *et al.*, (1994). As alíquotas da lectina ArtinM foram fornecidas pelo Laboratório de Glicobiologia e Imunoquímica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque Barreira. A amostra de lectina foi mantida em freezer a -20°C, na concentração de 0,5µg/100µl de solução PBS 1x.

4.5. Desenho experimental

Os 39 animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle (**Controle**) composto por animais não infectados e tratados com solução PBS 1X n = 9; grupo infectado (**PBS**) com 3×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas e tratados com solução PBS 1X, n = 15 e grupo infectado (**ArtinM**) com 3×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas e tratados com lectina ArtinM, n = 15 (Figura 1).

Para a infecção dos camundongos foi utilizada uma quantidade de parasitos de 3×10^3 / 100 µL de tripomastigotas sanguíneos inoculados por via subcutânea. O ajuste do inóculo foi realizado conforme o método de (Brenner, 1962).

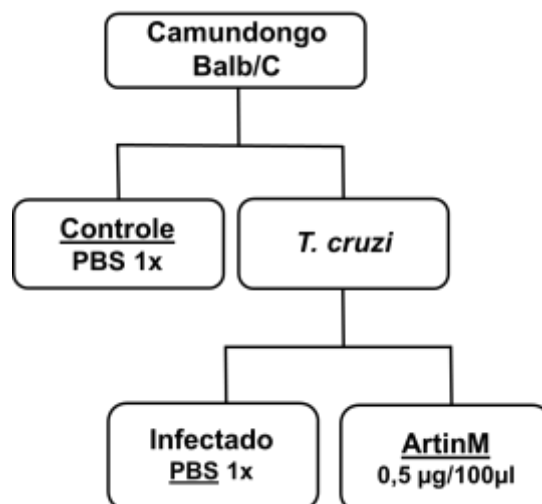


Figura 1. Delineamento experimental, divisão dos grupos de animais.

Os animais dos grupos **Controle** e **PBS** receberam 100µl de solução PBS 1X. No grupo **ArtinM** foram administrados lectina ArtinM na concentração de 0,5µg/100µl de solução PBS 1X para cada animal. Tanto a administração da solução PBS 1X quanto da lectina ArtinM foi por via subcutânea.

Os animais receberam marcação individual e durante todo o período do experimento foram pesados diariamente para construção da curva de perda/ganho de peso (%), além de verificada a data de óbito para a construção da curva de sobrevivência durante o curso da doença (90 dias).

O esquema de tratamento, assim como a quantificação de parasitos no sangue foi realizado conforme descrito por Silva, (2009) (Figura 2). Três dias que antecederam a infecção, os animais receberam os respectivos tratamentos (100 µL de PBS 1X para os grupos Controle e Infectado e 0,5 µg/ 100 µL de lectina ArtinM). Passados 2 dias foi realizado o inóculo com 3×10^3 tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* nos grupos de animais Infectado e ArtinM. Posteriormente foram realizados novos tratamentos a cada 5 dias por um período de 30 dias e a parasitemia contabilizada a cada 7 dias durante 84 dias. Aos 90 dias após a infecção os animais foram eutanasiados para a coleta do material conforme descrito no item 4.7.

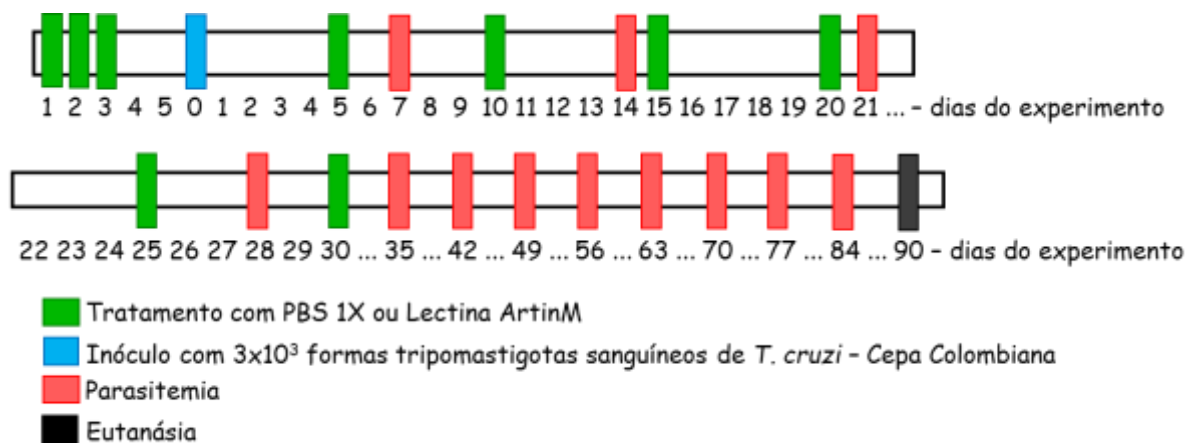


Figura 2 Cronograma de atividades do experimento

1 4.6. Exame parasitológico

2

3 A determinação do número de parasitos nos animais foi realizada a cada 7
4 dias de acordo com o esquema representado na Figura 2 e o protocolo de contagem
5 conforme descrito por (Lemos *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*, 2015).

6

7 4.7. Eutanásia

8

9 Foram administrados por via intraperitoneal 15 unidades de heparina por
10 grama de peso aos animais e em seguida submetidos à eutanásia com o uso de gás
11 carbônico. Após este procedimento foi feita a sangria pelo plexo oftálmico para obter
12 o sangue total que foi utilizado para realização do Leucograma conforme descrito no
13 item 4.16. Por fim procedeu-se à necropsia como descrito a seguir.

14

15 4.8. Necropsia

16

17 Os animais foram submetidos à incisão mento-pubiana com subsequente
18 abertura das cavidades torácica e abdominal. Neste momento foram retirados o
19 coração e intestino para análise, processamento histológico e dosagem de citocinas
20 como descrito nos itens 4.9 e 4.13, o baço, pulmão, rim, pâncreas e fígado para
21 análises posteriores. Após a necropsia as carcaças foram colocadas em formol a
22 10% por no mínimo 48 horas, para posteriormente serem descartadas em lixo
23 hospitalar (De Araújo-Jorge e De Castro, 2000).

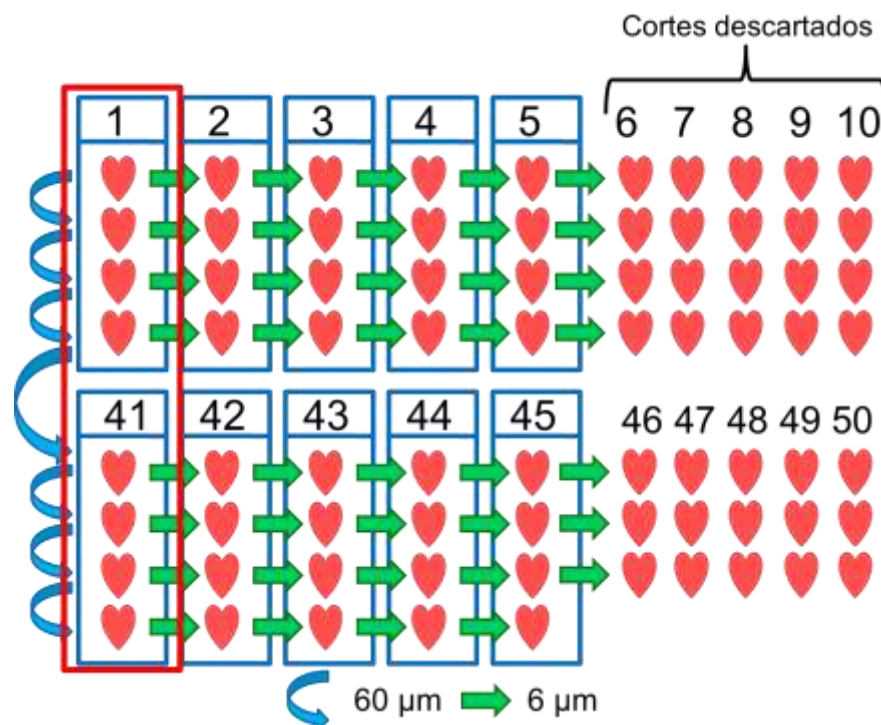
24

25 4.9. Preparo do coração para cortes histológicos

26

27 Foi realizado um corte transversal ao eixo maior do ventrículo por meio de um
28 instrumento contendo divisões com largura de 1 mm, o qual permitiu obter um corte
29 de 2 mm de espessura que correspondeu ao primeiro terço, que foi conservado em
30 freezer a -70°C em inibidor de proteases para análise das citocinas. Os dois terços
31 restantes do tecido cardíaco foram acondicionados em methacarn durante 24 horas
32 e depois armazenado em álcool 70%. Posteriormente, o coração foi submetido aos

1 processos de desidratação em uma série crescente de álcool etílico, diafanização
 2 em xilol e inclusão em parafina para microtomia. A inclusão de cada fragmento foi
 3 feita pelo posicionamento do plano obtido pelo corte transversal ao eixo maior do
 4 ventrículo, com o plano longitudinal de microtomia. Os blocos de parafina com os
 5 fragmentos de coração foram cortados em micrótomo rotativo (Leica RM2245),
 6 obtendo-se cortes com 6 micrômetros (μm) de espessura, montados em lâminas de
 7 vidro para microscopia, previamente tratadas com adesivo (Silano). Os cortes
 8 seriados foram depositados nas lâminas com intervalo de 60 μm na mesma lâmina,
 9 repetindo o ciclo até completar 10 lâminas (Figura 3). Os cortes após secagem em
 10 estufa a 60°C por um período de 24 horas, foram corados com Hematoxilina e
 11 Picrosirius (Stevens, 1990).



12

13 **Figura 3** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de
 14 microscopia. Os cortes de 6 μm de espessura foram distribuídos em 10 lâminas, sendo quatro cortes
 15 em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60 μm . Para a contagem do
 16 número de células foram utilizados dois cortes com distância de 120 μm (lâminas destacadas em
 17 vermelho). Para quantificação do colágeno e análise da área de ninhos de amastigotas por
 18 imunohistoquímica foram utilizados 1 lâmina com quatro cortes de cada animal.

19

20

21

22

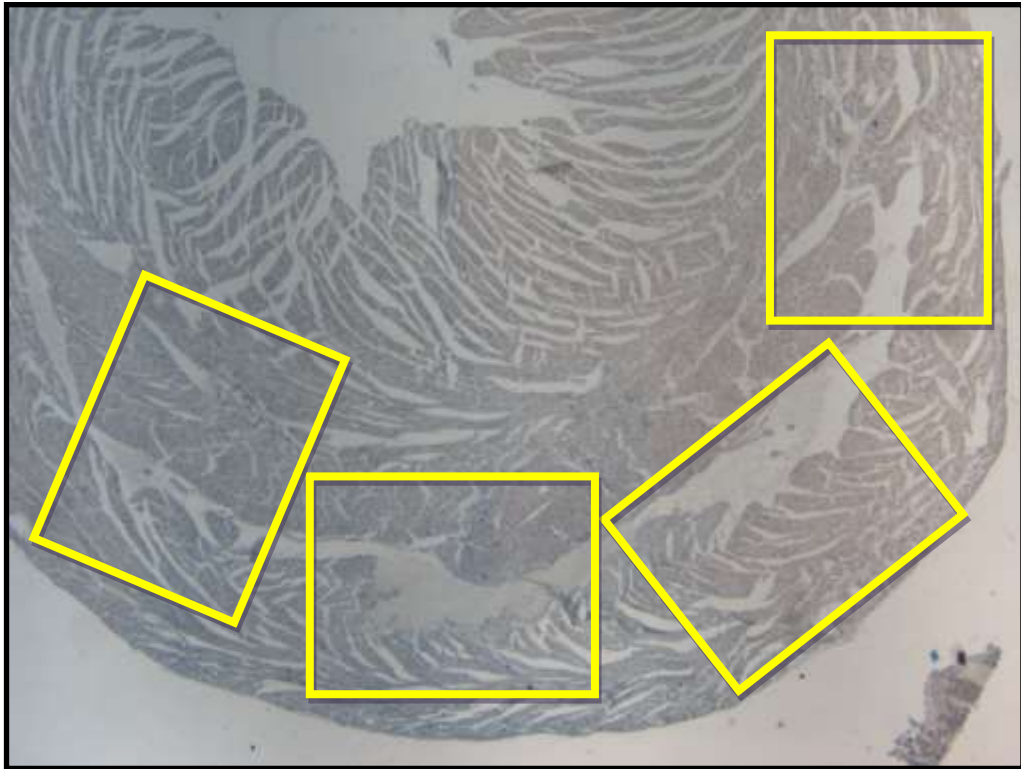
1 4.10. Análise Morfométrica

3 4.10.1. Captura das imagens microscópicas

5 Para análise morfométrica foram utilizadas as lâminas como indicado no item
6 4.9. As imagens para análise do infiltrado inflamatório e quantificação do número de
7 ninhos de *T. cruzi* foram capturadas utilizando uma câmara de vídeo digital
8 (Evolution MP 5.0 – color – Media Cibernetica) acoplada a um microscópio de luz
9 (Nikon – Eclipse 50i) que envia as imagens para um computador. As imagens foram
10 capturadas com o programa “Image – Pro Plus” (MediaCybernetics) e gravadas para
11 posterior utilização do programa de análise de imagem “ImageJ”
12 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O tamanho das imagens capturadas foi de 2560 x 1920
13 pixels. Estas imagens foram calibradas através de uma lâmina (Leica) com régua
14 graduada em dois milímetros divididos em unidades de 0,01 mm (10 µm) para
15 objetiva de 40X (imunohistoquímica do coração), 20X (quantificação de células e
16 quantificação do colágeno no tecido cardíaco) e 40X (para a quantificação de células
17 na camada muscular própria do intestino e antígenos de *T. cruzi*).

19 4.10.2. Número de células no tecido cardíaco

21 Para a quantificação das células do tecido cardíaco e infiltrado inflamatório
22 foram utilizadas lâminas coradas com Hematoxilina e as imagens capturadas com
23 objetiva de 20X no microscópio conforme o item 4.10.1. Foram utilizadas no total 10
24 imagens escolhidas aleatoriamente, distribuídas em igual número na região do
25 ventrículo direito e esquerdo (Figura 4) de cada animal em duplicata. Cada imagem
26 media 724,45 x 543,34 µm tendo uma área de 393.622,66 µm². No total foi analisada
27 uma área de 3.936.226,6 µm² que corresponde a 3,94 mm² por duplicata.



1

2 **Figura 4.** Figura representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das
3 imagens com objetiva de 20X para posterior análise do número de células no tecido cardíaco. As
4 regiões demarcadas em amarelo correspondem aos locais onde foram realizadas as capturas
5 microscópicas nos ventrículos esquerdos, direitos e septos.

6

7 Para quantificar o número de células foi utilizado o modo semi-automático do
8 programa ImageJ onde o programa reconhecia os núcleos das células do tecido
9 cardíaco (Figura 5). Primeiro foi realizada a análise do grupo **Controle** para verificar
10 o número médio de células por área analisada e em seguida foram feitos os grupos
11 **PBS** e **ArtinM**. O resultado foi expresso pela relação do número de células dividido
12 pela área em mm².

13

14

15

16

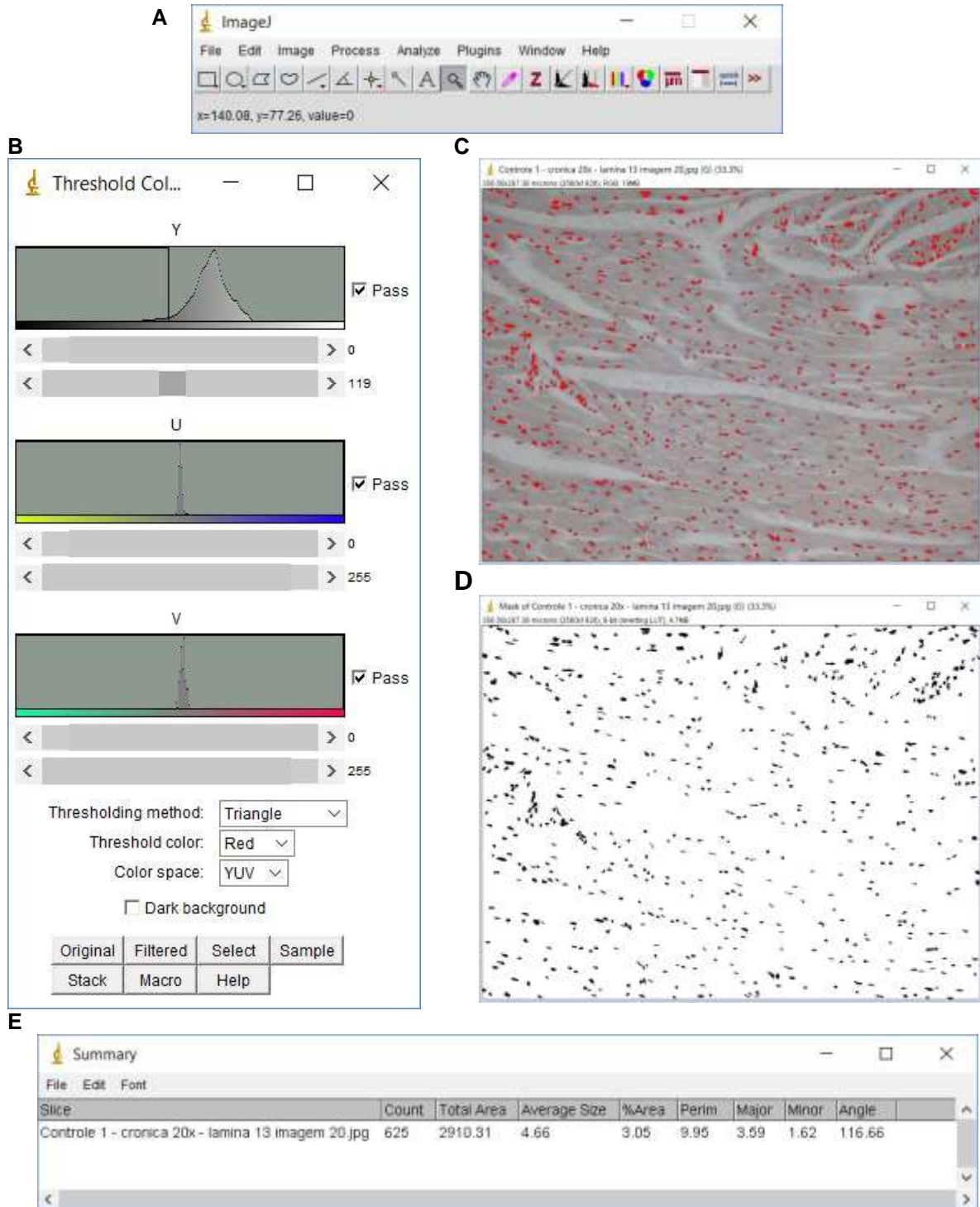
17

18

19

20

21



1 **Figura 5.** Quantificação do número de células do tecido cardíaco utilizado o programa ImageJ no
 2 modo semi-automático. Em **A**, observa-se o layout do programa com a linha de comandos. Em **B**, a
 3 linha de comando Color Threshold com as devidas calibrações. Em **C**, a imagem capturada na
 4 objetiva de 20X com a marcação dos núcleos das células do tecido cardíaco. Em **D**, a máscara do
 5 programa mostrando os pontos que serão contados. Em **E**, os valores da contagem dos núcleos
 6 marcados das células cardíacas.

7

8

4.10.3. Quantificação do colágeno no tecido cardíaco

Para a quantificação do colágeno no tecido cardíaco foram utilizadas lâminas coradas com picrossirius e capturadas imagens com objetiva de 20X no microscópio conforme o item 4.10.1. Foram utilizadas no total 05 imagens escolhidas aleatoriamente, distribuídas em igual número na região do ventrículo direito e esquerdo (Figura 6) de cada animal em duplicata. Cada imagem media 724,45 x 543,34 μm tendo uma área de 393.625,63 μm^2 . No total foi analisada uma área de 3936256,3 μm^2 que corresponde a 3,93 mm^2 .

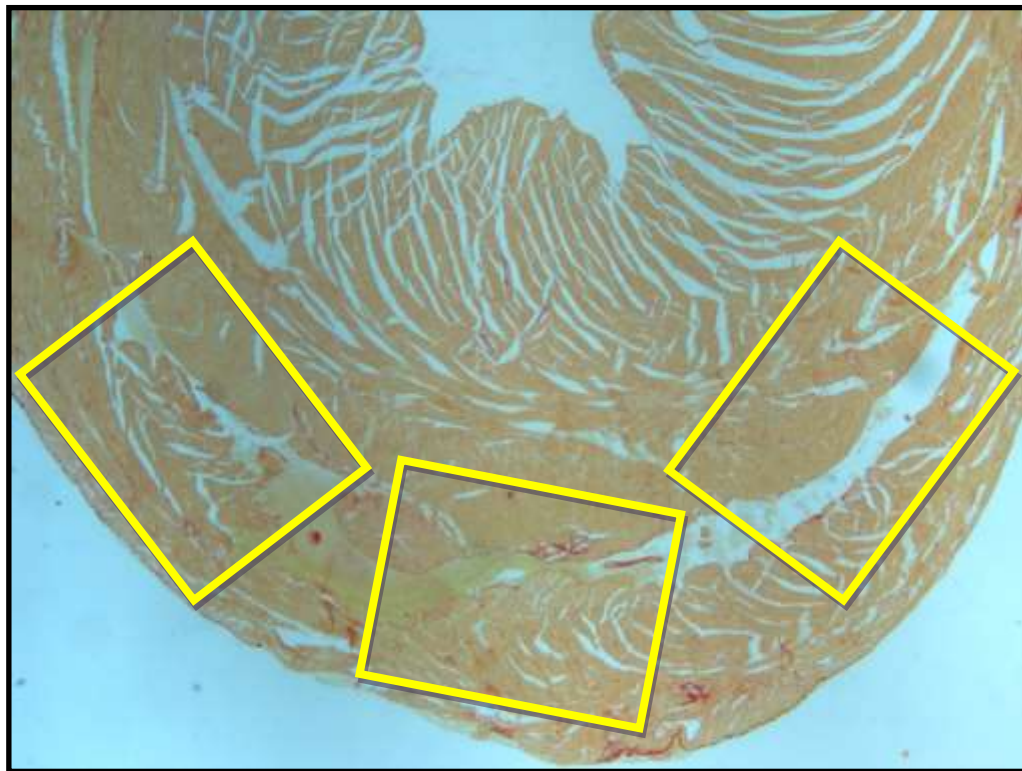
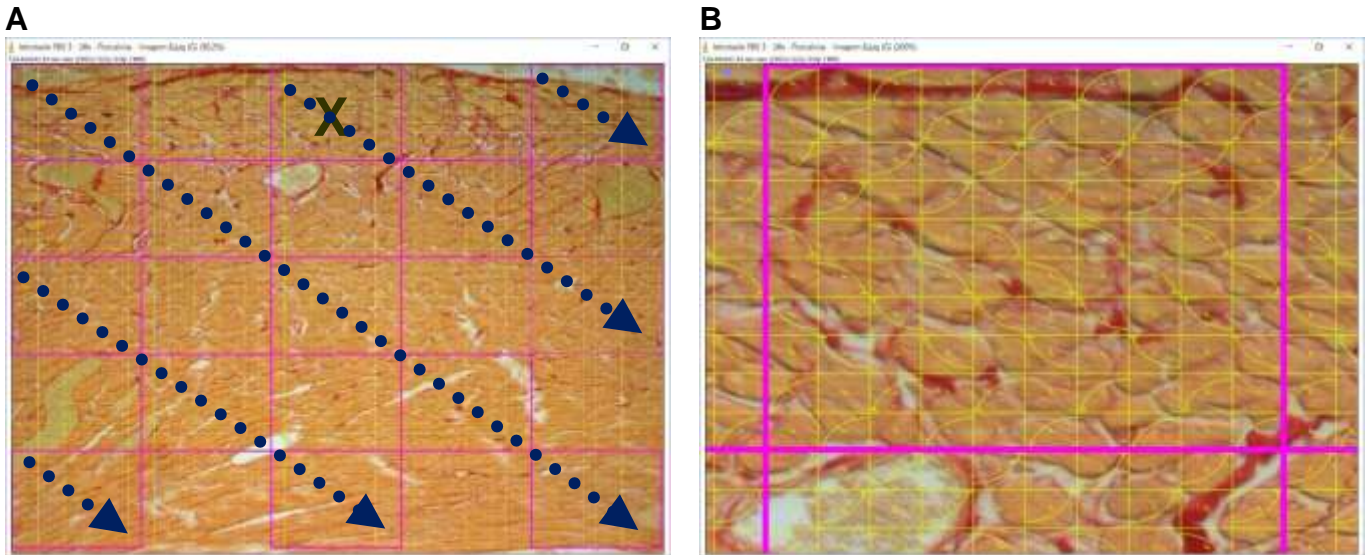


Figura 6. Figura representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das imagens com objetiva de 20X para posterior quantificação do colágeno no tecido cardíaco. A região demarcada em amarelo corresponde ao local onde foram realizadas as capturas microscópicas no ventrículo esquerdo e direito.

Cada imagem foi quadriculada com uma distância de 144,325 μm no eixo X e 107,536 μm no eixo Y que corresponde a uma área de 15.520,133 μm^2 . Foram escolhidos um total de 65 áreas nas 5 imagens de cada duplicata. Cada área apresentava uma grade de 100 pontos e cada ponto tinha uma área de 155,2 μm^2 , analisando-se no total 6500 pontos. Para calcular a porcentagem de área com

1 colágeno no coração foi contabilizado o ponto que atingisse a área que acometia o
 2 colágeno que ficava de cor vermelha. Não foram contabilizados os pontos que
 3 atingiram áreas em branco. Ao final foi feita a relação da somatória de todos os
 4 pontos que atingiram no colágeno para o total de pontos de tecidos multiplicado por
 5 100 (Figura 7).



6 **Figura 7.** Quantificação do colágeno no tecido cardíaco através da grade de pontos com área pré-
 7 determinada. Em **A**, observa-se a imagem capturada na objetiva de 20X e quadriculada em 25 áreas.
 8 A análise das áreas foi feita no sentido das linhas pontilhadas. Em **B**, mostra-se a área marcada com
 9 a letra **X** em maior aumento, onde 16 pontos amarelos recaíram sobre área com fibrose.

10

11 A quantidade de pontos que foram verificados foi determinada pela fórmula de
 12 (Hally, 1964). Esta fórmula é usada para determinar a quantidade de imagens e
 13 pontos a serem contados para possibilitar a quantificação do colágeno no tecido
 14 cardíaco. O erro padrão relativo (EPR) deve ser menor ou igual a 5% (0,05). O Vv foi
 15 determinado pela relação entre o número de pontos pertencentes à área de
 16 colágeno e o número de pontos teste. Com o valor de Vv obtém-se o n, sendo este
 17 utilizado para determinar o n (corrigido), o qual representa o número total de pontos
 18 a serem utilizados no coração.

19

$$EPR = \sqrt{\frac{(1-Vv)}{n}} \quad \text{Onde, } Vv = \frac{Pp}{Pt}$$

$$n_{\text{corrigido}} = \frac{n_{\text{calculado}}}{Vv}$$

20

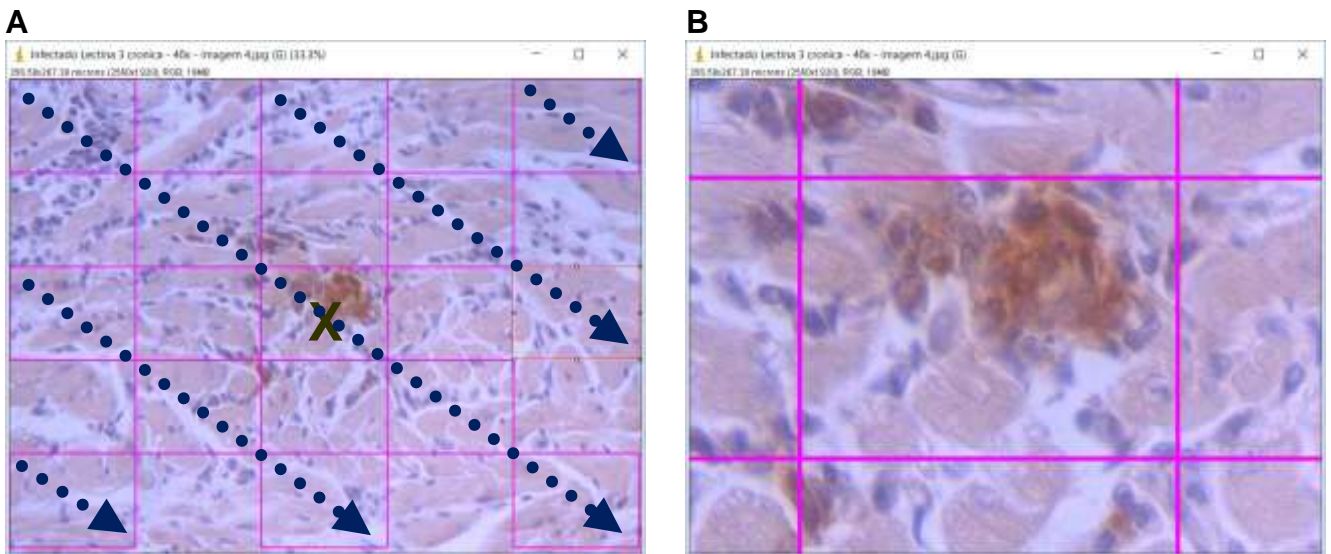
1 Pp = número de pontos que atingem a área de colágeno
2 Pt = número de pontos teste

4 4.11. Imunohistoquímica

5
6 A imunohistoquímica para a detecção de ninhos de *T. cruzi* foi realizada nos
7 cortes do coração e intestino dos camundongos infectados, obtidos conforme os
8 itens 4.9 e 4.13, respectivamente. Cada lâmina passou por processos de
9 desparafinização, hidratação e lavagem. Após o bloqueio da peroxidase endógena,
10 das ligações inespecíficas e a recuperação antigênica, os cortes foram incubados
11 com o anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi* produzido em coelho (diluição 1:250),
12 durante 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas
13 com PBS e incubadas com a proteína A conjugada com peroxidase (1:100) e
14 reveladas com DAB-diaminobenzidina, em tampão Tris-HCl pH 7,4. Os cortes foram
15 contra-corados com hematoxilina e as lâminas montadas com *Entellan* para análise
16 em microscópio de luz comum.

17 18 4.11.1. Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco

19
20 Para a quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco
21 foram utilizadas lâminas conforme descrito no item 4.11 e capturadas imagens no
22 microscópio com objetiva de 40X conforme o item 4.10.1. Foram utilizadas em média
23 218 campos por animal correspondendo a uma área total de 10,67mm². Cada área
24 de um campo correspondia a 48858,16 µm². As imagens foram distribuídas em igual
25 número na região do ventrículo direito e esquerdo de cada animal. Ao final foi feita a
26 relação da somatória de todos os ninhos de *T. cruzi* que se encontravam nessas
27 áreas pela somatória da área total analisada. O resultado foi expresso em mm²
28 (Figura 8).



1 **Figura 8.** Quantificação dos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco através da grade com área
 2 pré-determinada. Em **A**, observa-se a imagem capturada na objetiva de 40X e quadriculada em 25
 3 áreas. A análise das áreas foi feita no sentido das linhas pontilhadas. Em **B**, mostra-se a área
 4 marcada com a letra **X** em maior aumento, onde observamos a presença de marcações exclusivas de
 5 amastigotas.

6

7 4.12. Dosagem das citocinas

8

9 Foram quantificadas as citocinas IL-12 p40, IL-10, INF- γ e TNF. Todas foram
 10 detectadas no coração dos animais usando a captura por ELISA citocina específica,
 11 de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences Pharmingen – San
 12 Diego, CA, USA). A concentração de citocinas foi determinada com referência à
 13 curva padrão das diluições seriadas das citocinas recombinantes. Os valores das
 14 citocinas foram expressos em pg/mL/g.

15 A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA)
 16 utilizando o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme instruções
 17 do fabricante. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe
 18 Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de anticorpo
 19 de captura específico para cada citocina testada, diluído em tampão carbonato-
 20 bicarbonato 0,1 M e pH 9,6, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as
 21 placas foram lavadas com PBS-Tween e incubadas com solução de PBS acrescido
 22 com 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio) (Sigma) durante 1
 23 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionadas, em

1 duplicata, as quantidades conhecidas das citocinas recombinantes (curva-padrão) e
2 a amostra a ser analisada, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente
3 durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T e adicionados
4 os anticorpos secundários biotinilados (anticorpo de detecção) específicos para cada
5 citocina, diluídos, que foram pré-incubados por 15 minutos com avidina conjugada a
6 peroxidase. A solução foi adicionada às placas e seguiu-se a incubação à
7 temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o
8 revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) e o substrato H₂O₂. As reações foram
9 bloqueadas após 20 minutos com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm
10 em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

11

12 4.13. Preparo do intestino para cortes histológicos

13

14 Foi coletado o segmento distal do intestino grosso, lavado com solução PBS
15 1X, planificado em papel de filtro, acondicionado em formaldeído durante 24 horas e
16 depois armazenado em álcool 70%. Posteriormente, o intestino foi submetido aos
17 processos de desidratação em uma série crescente de álcool etílico, diafanização
18 em xilol e inclusão em parafina para microtomia. Os blocos de parafina com os
19 fragmentos de intestino foram cortados em micrótomo rotativo (Leica RM2245),
20 obtendo-se cortes com 5 µm de espessura, montados em lâminas de vidro para
21 microscopia, previamente tratadas com adesivo (Silano). Foram obtidos cortes
22 seriados depositando-se um corte a cada intervalo de 50 µm na mesma lâmina,
23 repetindo o ciclo até completar 20 lâminas (Figura 9). Os cortes após secagem em
24 estufa a 60°C, por um período de 24 horas, foram corados com Hematoxilina
25 (Stevens, 1990).

26

27

28

29

30

31

32



1
2 **Figura 9.** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de
3 microscopia. Os cortes de 5 µm de espessura foram distribuídos em 20 lâminas, sendo quatro cortes
4 em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 50 µm. Para a contagem do
5 número de células foram utilizados quatro cortes com distância de 200 µm (lâminas destacadas em
6 vermelho). Para análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados 1
7 lâmina com quatro cortes de cada animal infectado.

8
9
10
11
12
13
14

1 4.14. Análise Morfométrica

3 4.14.1. Captura das imagens microscópicas

5 Para análise morfométrica foram utilizadas as lâminas como indicado no item
6 4.13. As imagens para análise do infiltrado inflamatório e quantificação do número de
7 ninhos de *T. cruzi* foram capturadas como indicado no item 4.10.1.

9 4.14.2. Contagem do número de células da camada muscular do intestino e ninhos 10 de amastigotas de *T. cruzi*

12 Para a quantificação do número de células e ninhos de amastigotas de *T.*
13 *cruzi* foram utilizadas lâminas coradas com hematoxilina e as provenientes da
14 imunohistoquímica respectivamente. As imagens foram capturadas com objetiva de
15 40X no microscópio (Figura 10). Utilizou-se no total 20 imagens distribuídas na
16 camada muscular propriamente dita do intestino de cada animal. Cada imagem
17 media 356,50 x 267,38 μm tendo uma área de 95.320,97 μm^2 . No total foi analisada
18 uma área de 1.906.338,8 μm^2 , o que corresponde a 1,9 mm^2 . As imagens foram
19 escolhidas aleatoriamente. Cada imagem foi quadriculada com uma distância de
20 71,02 μm no eixo X e 52,78 μm no eixo Y que corresponde a uma área de 3.748,43
21 μm^2 . Foram escolhidos aleatoriamente, um total de 100 áreas nas 20 imagens o que
22 corresponde a 0,37 mm^2 . Para calcular o número de células na musculara
23 propriamente dita foram contabilizados os núcleos do tecido e/ou de antígenos de *T.*
24 *cruzi* nessas áreas. Ao final foi feita a relação da somatória de todas as células que
25 se encontravam nessas áreas pela somatória da área total analisada. O resultado foi
26 expresso em mm^2 .

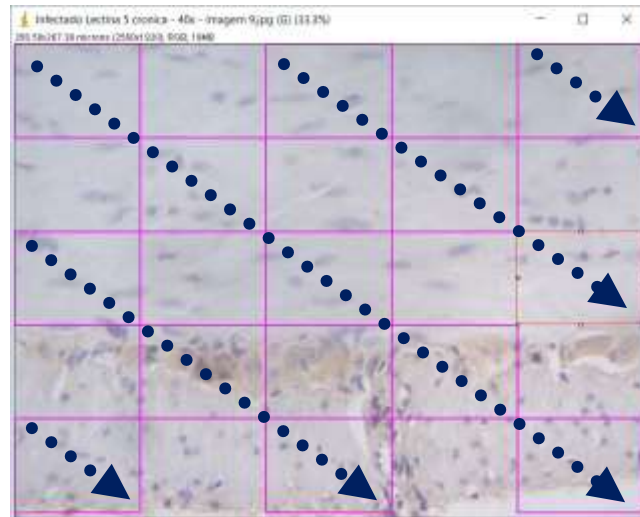


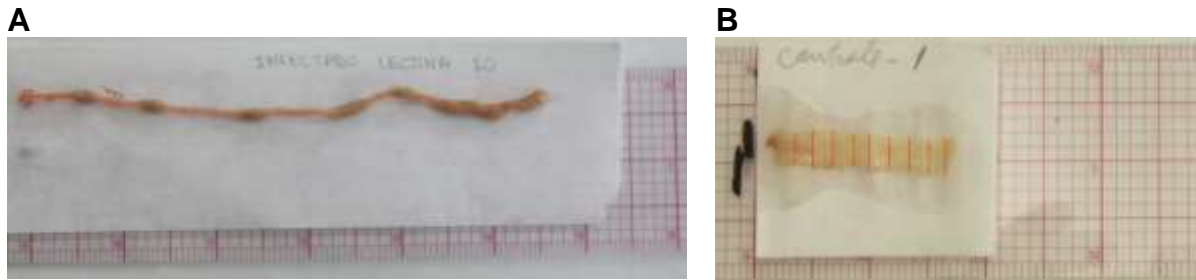
Figura 10. Quantificação do número de células e ninhos de amastigotas na camada muscular do intestino através da grade com área pré-determinada. Observa-se a imagem do tecido proveniente da imunohistoquímica, onde foi capturada na objetiva de 40X e quadriculada em 25 áreas. A contagem do número de células e ninhos de amastigotas foi feita no sentido das linhas pontilhadas.

4.15. Relação do peso do intestino / peso corporal, medidas de largura e comprimento do intestino a fresco

Todo o segmento do intestino grosso foi coletado desde o ceco até a parte do reto, colocado em papel filtro para a pesagem em balança eletrônica (GEHAKA, model BG 4400, SP - Brazil). Após este procedimento foi identificado e fotografado com régua calibrada em 25 mm, que corresponde a 8 pequenos quadrados da régua utilizada. A câmera fotográfica utilizada foi da marca SONY, modelo SLT-A33 e as fotos com dimensões de 4592 pixels de largura por 2576 pixels de altura. Em seguida foram coletados 5 cm da porção distal do intestino grosso, planificado em papel de filtro e fotografado com a mesma câmera descrita anteriormente (Figura 11). Todas as imagens foram armazenadas para posterior utilização com o programa ImageJ.

Para fazer as medidas do comprimento foi utilizado como ponto de partida a parte proximal estendendo se até o distal, conforme ilustrado na Figura 12A. O resultado foi expresso em cm. Para verificar a largura (Figura 12B) foi utilizada a foto dos últimos 5 cm distais do segmento intestinal e feitas 10 medições em sentido transversal ao eixo maior. O resultado foi expresso pela média das 10 medições em mm.

1



2 **Figura 11.** Representação esquemática das medições do comprimento (A) e largura (B) do intestino a
 3 fresco. As medições foram realizadas através do programa ImageJ. Em A, mostra-se o intestino
 4 grosso coletado entre a porção do ceco ao reto. A linha em vermelho mostra o local onde foi feita a
 5 medição do comprimento, expresso em cm. Em B, mostra-se a porção final do intestino grosso onde
 6 foram feitas as medições da largura. Foram usados os últimos 5 cm distais do segmento intestinal e
 7 feitas 10 medições em sentido transversal ao eixo maior, o resultado foi expresso pela média das 10
 8 medições em mm.

9

10 4.16. Contagem de leucócitos no sangue periférico

11

12 Após coletado o sangue total realizou-se uma diluição 1:20 em líquido de
 13 Turck (*NewProv* - Produtos para Laboratório LTDA – Brasil) para contagem manual
 14 de leucócitos total no sangue periférico utilizando câmara de Neubauer. Em seguida
 15 foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de
 16 Leucócitos e coradas por Panótico (*NewProv* - Produtos para Laboratório LTDA –
 17 Brasil).

18

19 4.17. Análise estatística

20

21 A análise estatística foi realizada por meio do programa "Instat e Prisma" da
 22 Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a
 23 distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov) e a variância homogênea (teste "F" ou
 24 Teste de *Bartlett's*). Quando a distribuição foi considerada normal e com variância
 25 homogênea utilizou-se testes paramétricos. Quando comparado dois grupos foi
 26 utilizado o teste "t" não-pareado e mais de três grupos foi utilizado ANOVA com *post*
 27 *test* de comparação múltipla de Tukey's. Os resultados foram expressos em média \pm
 28 EPM. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, utilizaram-se os testes
 29 não paramétricos. Quando dois grupos foi utilizado o Teste "Mann Whitney" e mais
 30 de 3 grupos utilizamos o teste "Kruskal-Wallis" com comparação múltipla de Dunn's.

1 Para correlação das variáveis foi utilizada a correlação de *Spearman*. Os resultados
2 foram expressos em mediana, valores máximos e mínimos. As diferenças
3 observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%) (Arango, 2001;
4 Mandarim-De-Lacerda, 2003).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

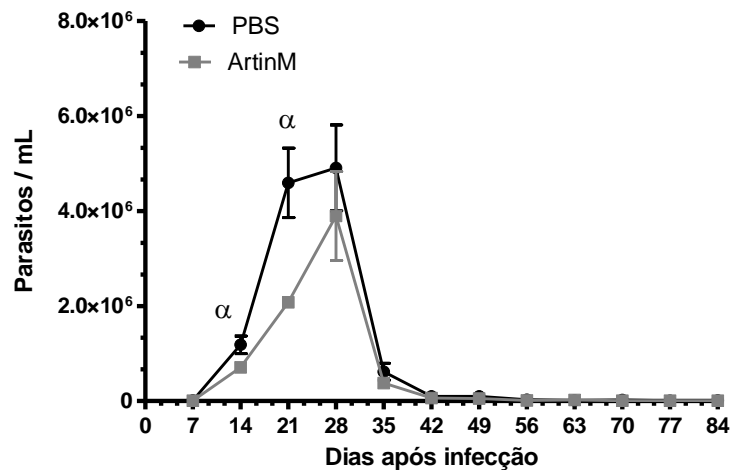
31

32

5. RESULTADOS

5.1. Curva de Parasitemia

A curva de Parasitemia (Figura 12) demonstra o número de parasitos dos animais infectados ao longo do período analisado, com destaque para o décimo quarto e vigésimo primeiro dias após a infecção, onde houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados ($p < 0,05$). Após 14 dias de infecção foram utilizados valores expressos em média \pm EPM. Para o grupo **PBS**, os valores foram de $1.184.000,0 \pm 185.354,0$ e para o grupo **ArtinM** $707.500,0 \pm 73.306,0$. Após 21 dias de infecção, foram usados valores expressos em mediana (máximo – mínimo). Para o grupo **PBS**, os valores foram $4.350.000,0$ ($6.520.000,0 - 2.240.000,0$) e para o grupo **ArtinM** $2.080.000,0$ ($2.320.000,0 - 1.840.000,0$).



$\alpha = p < 0,05$ vs PBS

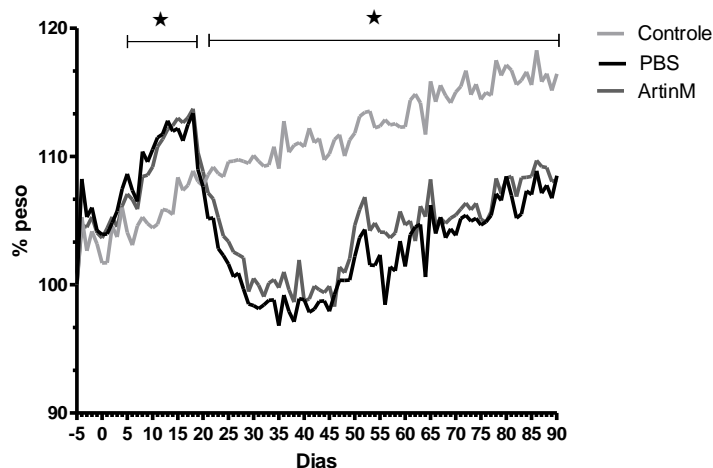
Figura 12. Curva de Parasitemia realizada a cada 7 dias durante 90 dias de infecção. O gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-paramétrico (Teste "Mann Whitney") e média \pm EPM quando usado teste paramétrico (Teste "t" não pareado). α = Diferenças estatisticamente significantes no décimo quarto e vigésimo primeiro dia de infecção, $p < 0,05$.

1 5.2. Curva de Peso

2

3 A curva de peso (Figura 13) foi realizada diariamente e demonstra a média da
 4 porcentagem de perda ou ganho de peso ao longo de 90 dias de infecção, com
 5 destaque para os dias que correspondem à fase aguda da doença, onde o grupo
 6 **Controle** mostrou menor valor de porcentagem de perda de peso comparado aos
 7 grupos **PBS** e **ArtinM** ($p < 0,05$) e, após o vigésimo primeiro dia ao final do
 8 experimento houve uma inversão dos valores e os animais dos grupos **PBS** e
 9 **ArtinM** mostraram uma diferença estatisticamente significativa em comparação ao
 10 grupo **Controle**, com valores menores de porcentagem de peso, $p < 0,05$. Os valores
 11 foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-
 12 paramétrico e média \pm EPM quando usado teste paramétrico.

13



14

15 **Figura 13.** Curva de Peso. O gráfico representa a porcentagem de perda ou ganho de peso no
 16 período de 90 dias. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste
 17 não-paramétrico (Teste "Mann Whitney") e média \pm EPM (Teste "t" não pareado) quando usado teste
 18 paramétrico. *Diferenças estatisticamente significantes dos grupos infectados x controle, $p < 0,05$.

19

20

21

22

23

24

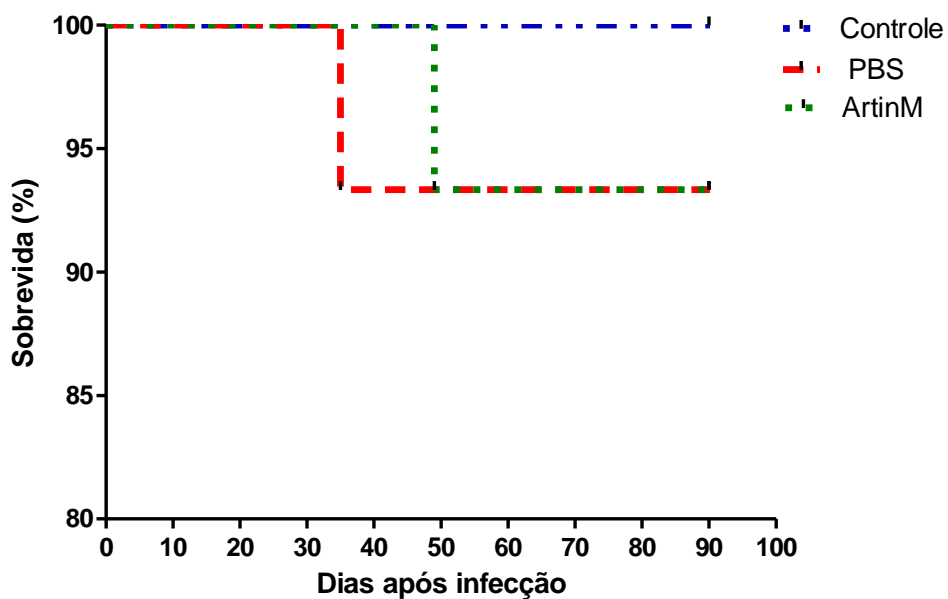
25

1 5.3. Curva de Sobrevida

2

3 A curva de sobrevida (Figura 14) demonstra a porcentagem de sobrevida dos
4 animais ao longo de 90 dias de infecção. Observou-se 100% de sobrevivência para
5 os animais do grupo **Controle**, 93,3% de sobrevivência para os animais do grupo
6 **PBS** e 93,3% de sobrevivência para os animais do grupo **ArtinM**, onde não houve
7 diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, com $p>0,05$.

8



9

10 **Figura 14.** Curva de Sobrevida. O gráfico representa a porcentagem de sobrevida dos animais
11 infectados com *T. cruzi* e que receberam ou não tratamento com ArtinM no período de 90 dias. Não
12 houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, $p>0,05$.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

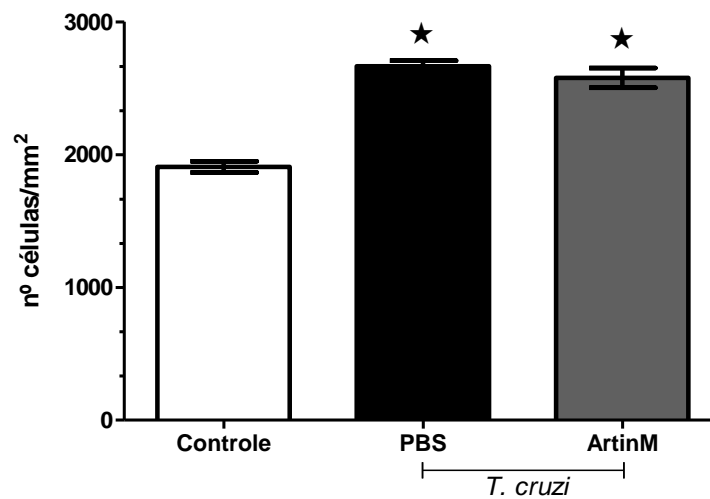
22

23

5.4. Número de células no tecido cardíaco

Foi realizada a contagem do número de células do tecido cardíaco e os valores foram expressos em média \pm EPM (Figura 15).

O grupo **Controle** obteve os valores $1.908,0 \pm 41,9$; o grupo **PBS** obteve os valores $2.665,0 \pm 41,5$ e o grupo **ArtinM** obteve valores de $2.578,0 \pm 74,0$. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde $*$ = $p < 0,05$ vs **Controle**.



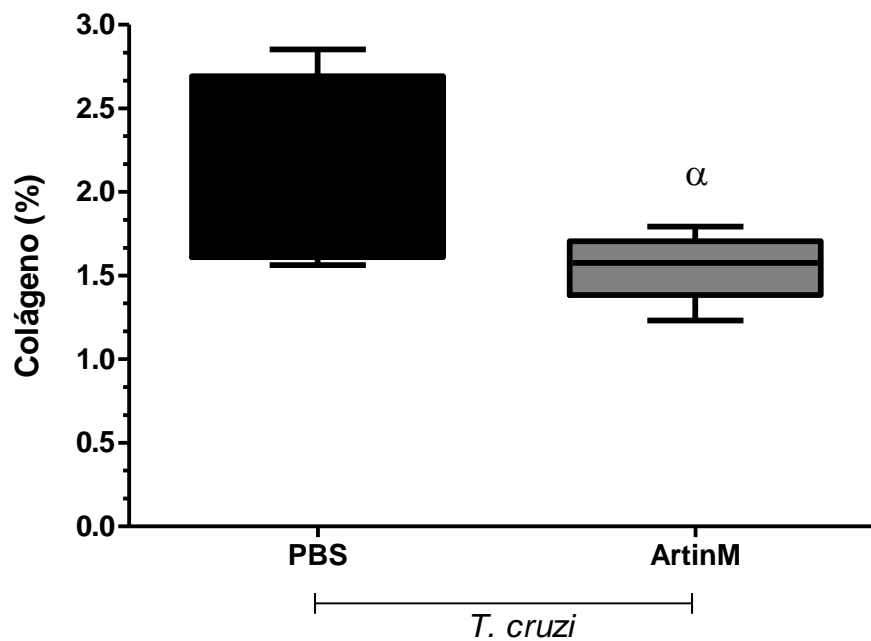
\star = $p < 0,05$ vs Controle

Figura 15. Número de células no tecido cardíaco expresso em mm^2 de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em média \pm EPM. *Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PBS e ArtinM x Controle, $p < 0,05$. Teste ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison".

5.5. Quantificação do colágeno no tecido cardíaco

Foi realizada a quantificação do colágeno no tecido cardíaco através da coloração de Picrosirius e os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) (Figura 16).

O grupo **PBS** obteve os valores 1,9 (2,8 ± 1,4) e o grupo **ArtinM** obteve valores de 1,6 (2,2 ± 1,2). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde $\alpha = p < 0,05$ vs **PBS**.



$\alpha = p < 0,05$ vs PBS

Figura 16. Quantificação de colágeno no tecido cardíaco expresso em % de acordo com os grupos: PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). α = Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PBS x ArtinM, $p < 0,05$. Teste "Mann Whitney".

5.6. Quantificação dos ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica

Foi realizada a quantificação de ninhos de *T. cruzi*/cm² no tecido cardíaco através da imunohistoquímica e os valores foram expressos em média ± EPM (Figura 17).

O grupo **PBS** obteve os valores de 248,2 ± 9,2 e o grupo **ArtinM** obteve valores de 220,0 ± 12,8. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, p>0,05.

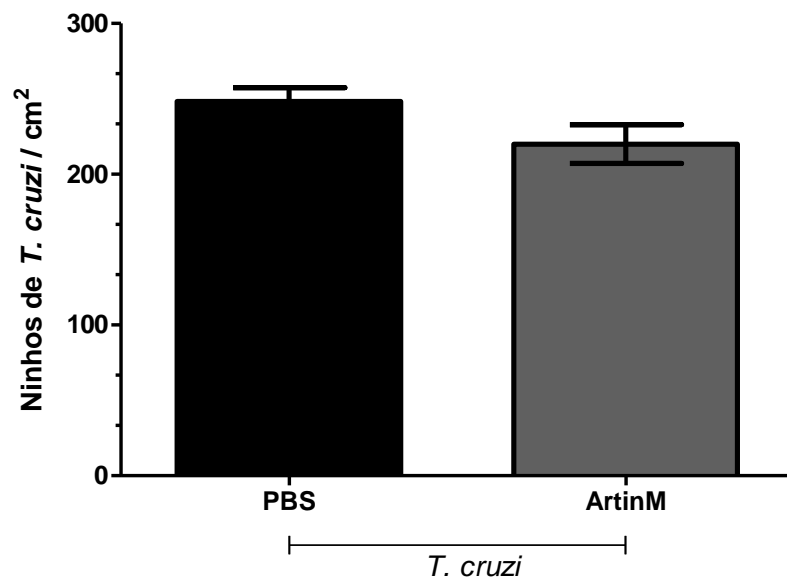


Figura 17. Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica, expressos em cm² de acordo com os grupos PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em média ± EPM. Não houve diferenças estatisticamente significantes, p>0,05. Teste "t" não pareado.

5.7. Quantificação de citocinas no tecido cardíaco

Foram quantificadas as citocinas TNF- α , IL-12p40, IFN- γ e IL-10 no tecido cardíaco dos animais infectados com *T. cruzi* (Figura 18).

Os valores foram expressos em pg/mL/mg de tecido, onde não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com $p > 0,05$. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo), usando o teste não-paramétrico. Para TNF- α , o grupo **Controle** obteve os valores 14,1 (46,0 – 7,9), grupo **PBS** 20,5 (72,0 – 7,7) e grupo **ArtinM** 12,0 (42,8 – 5,5). Para IL-12p40, o grupo **Controle** obteve os valores 12,2 (34,5 – 7,5), grupo **PBS** 19,7 (83,3 – 4,5) e grupo **ArtinM** 13,4 (37,9 – 7,5). Para IFN- γ , o grupo **Controle** obteve os valores 2,6 (4,1 – 1,3), grupo **PBS** 2,8 (4,3 – 1,2) e grupo **ArtinM** 2,3 (5,8 – 0,9). Para IL-10, o grupo **Controle** obteve os valores 0,27 (0,40 – 0,06), grupo **PBS** 0,17 (0,25 – 0,9) e grupo **ArtinM** 0,24 (0,62 – 0,03).

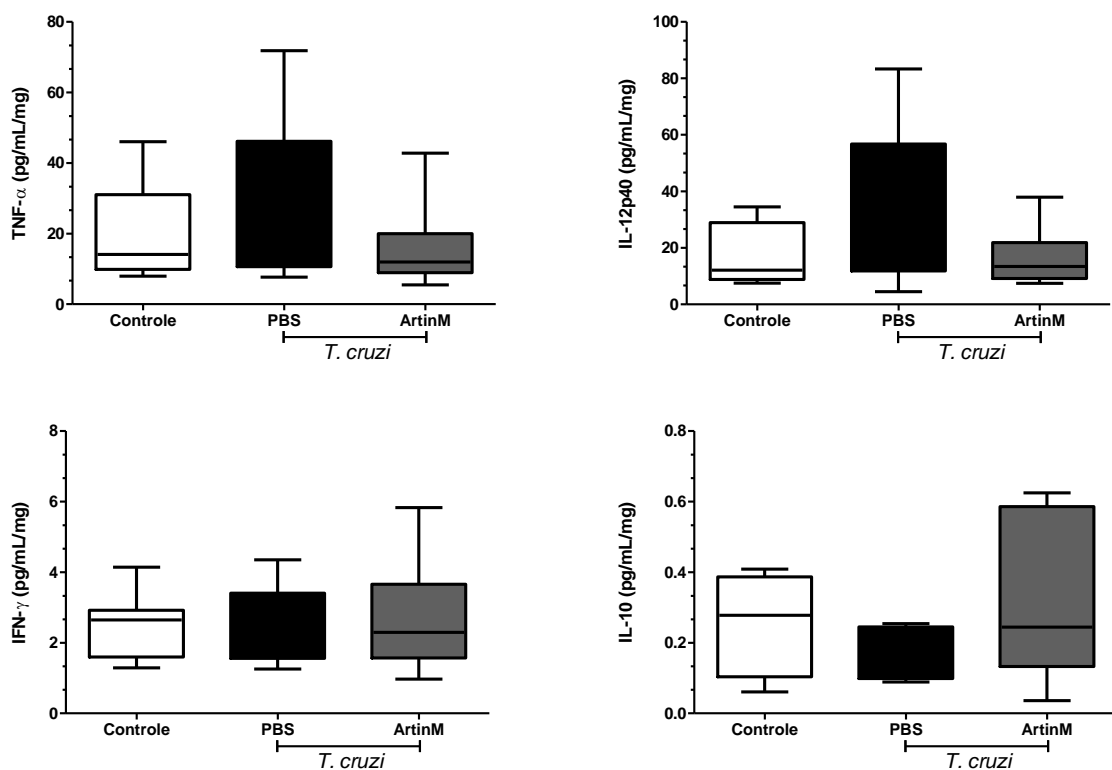
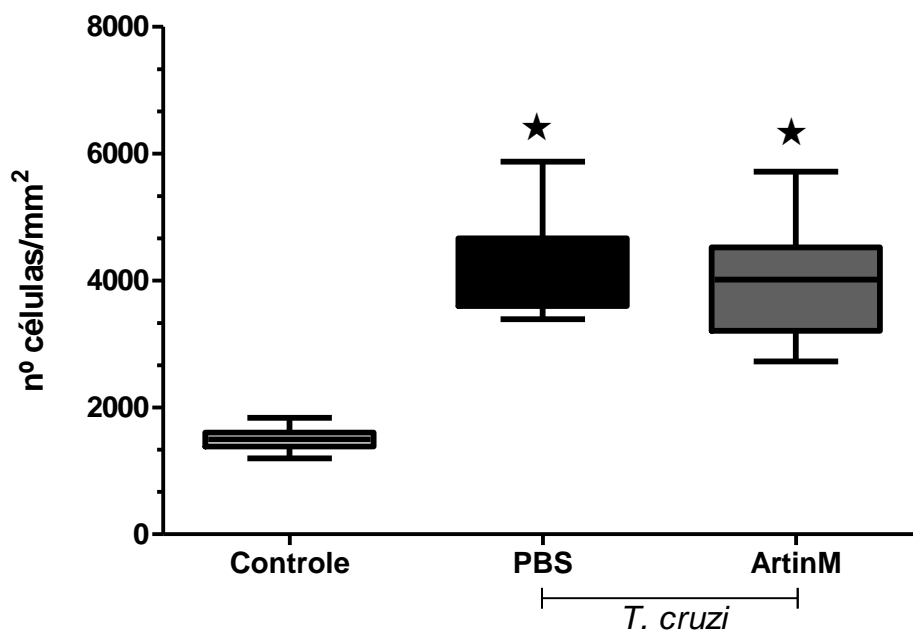


Figura 18. Quantificação de citocinas TNF- α , IL-12p40, IFN- γ e IL-10 no tecido cardíaco dos animais de acordo com os grupos PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, $p > 0,05$. “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.

5.8. Número de células no intestino

Foi realizada a contagem do número de células do intestino dos animais infectados com *T. cruzi* e os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) (Figura 19).

O grupo **Controle** obteve os valores de 1.498,0 (1.835,0 – 1.195,0), grupo **PBS** 4.319,0 (5.874,0 – 3.388,0) e o grupo **ArtinM** 4.014,0 (5.714,0 – 2.726,0). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos **PBS** e **ArtinM** x **Controle**, $p < 0,05$.



★ = $p < 0,05$ vs Controle

Figura 19. Número de células no intestino expresso em mm^2 de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBS e ArtinM x Controle, $p < 0,05$. “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.

5.9. Quantificação dos ninhos de *T. cruzi* no intestino por Imunohistoquímica

Foi realizada a quantificação de ninhos de *T. cruzi* no intestino expresso em cm^2 e os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) (Figura 20).

O grupo **PBS** obteve os valores 46,7 (106,7 – 20,0) e o grupo **ArtinM** 26,7 (66,7 – 6,7). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, $p > 0,05$.

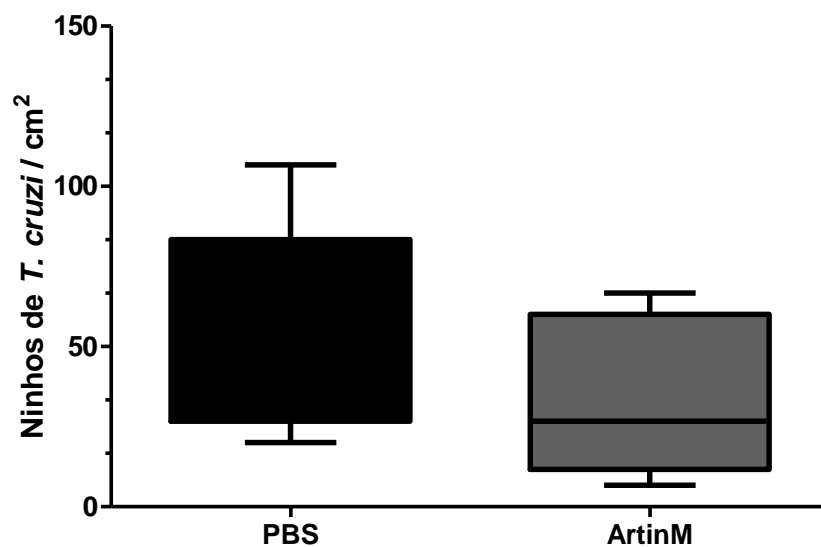


Figura 20. Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no intestino por Imunohistoquímica, expressos em cm^2 de acordo com os grupos: PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, $p > 0,05$. T não-paramétrico "Mann Whitney test".

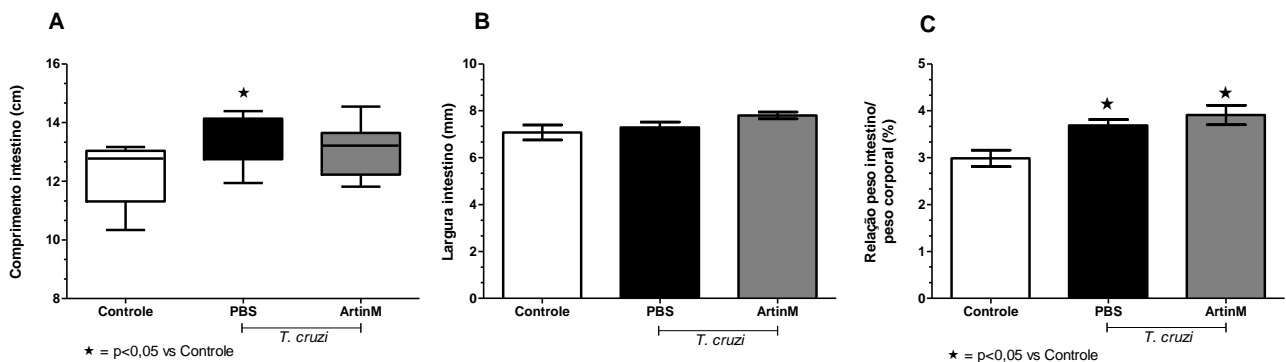
1 5.10. Medições de largura, comprimento e relação do peso do intestino / peso
2 corporal

3

4 Foram realizadas as medições do comprimento, largura e relação do peso do
5 órgão / peso corporal (Figura 21 A, B e C) de acordo com os grupos: **Controle**, **PBS**
6 e **ArtinM** após 90 dias de infecção com *T. cruzi*.

7 Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo) para comprimento
8 (Figura 21A). O grupo **Controle** obteve os valores 12,7 (13,1 - 10,3), grupo **PBS**
9 13,5 (14,4 - 11,9) e grupo **ArtinM** 13,2 (14,5 - 11,8). Foram observadas diferenças
10 significativas entre os grupos **PBS x Controle**, $p < 0,05$. Para a medição da largura
11 (Figura 21B) e relação do peso do órgão / peso corporal (Figura 21C), foram
12 utilizados os valores de média \pm EPM. Para largura o grupo **Controle** obteve os
13 valores $7,1 \pm 0,3$, o grupo **PBS** $7,3 \pm 0,2$ e grupo **ArtinM** $7,8 \pm 0,1$. Não houve
14 diferenças estatisticamente significativas, $p > 0,05$. Já para a relação do peso do
15 órgão / peso corporal o grupo **Controle** obteve valores $2,9 \pm 0,2$, o grupo **PBS** $3,7 \pm$
16 $0,1$ e grupo **ArtinM** $3,9 \pm 0,2$. Foram observadas diferenças significativas entre os
17 grupos **PBS e ArtinM x Controle**, $p < 0,05$.

18



19

20

21 **Figura 21.** Medições de comprimento (A), largura (B) e relação do peso do intestino / peso corporal
22 (C) expressos em mm, cm e % respectivamente, de acordo com os grupos: Controle, PBS e ArtinM
23 após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo)
24 para A ("Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison") e média \pm EPM para B e C
25 (ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison"). *Diferenças estatisticamente significantes entre
26 os grupos Infectados x Controle, $p < 0,05$.

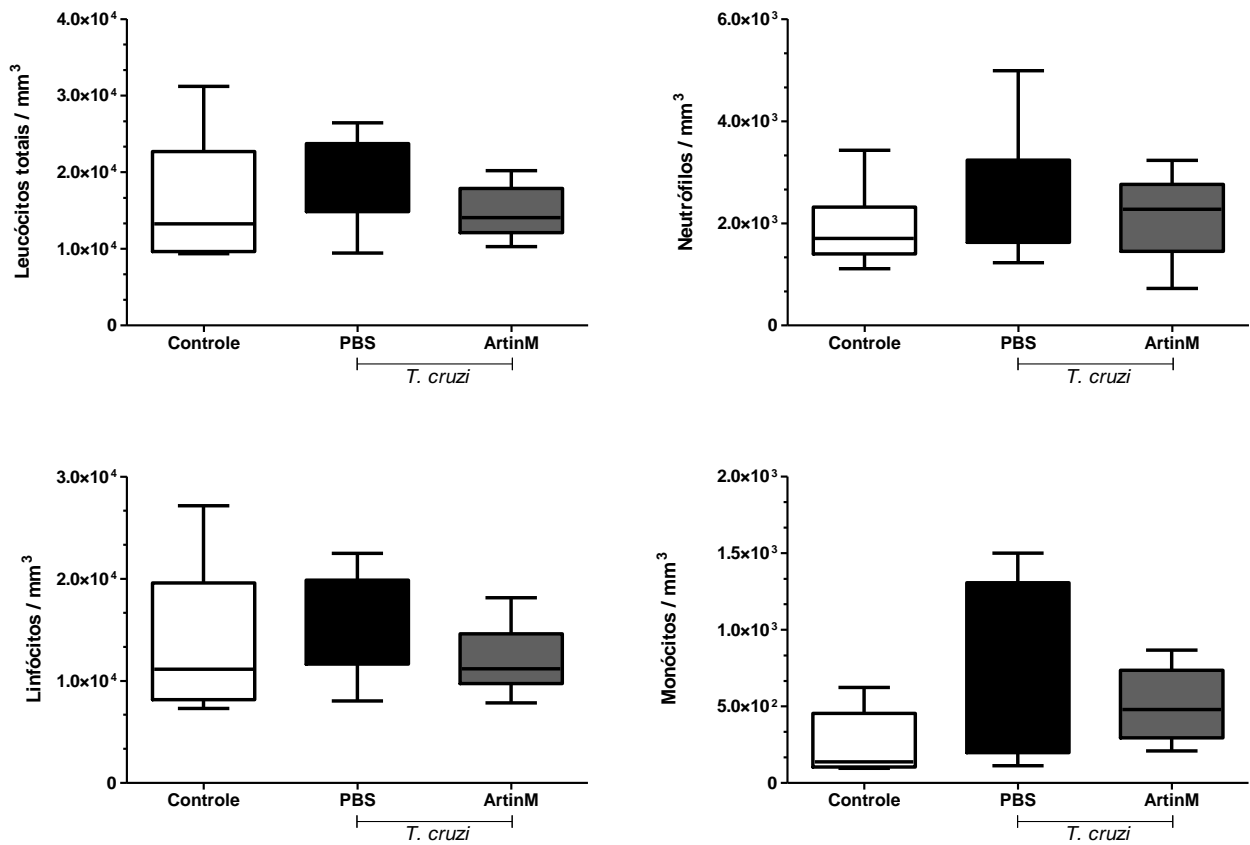
27

28

5.11. Quantificação de Leucócitos no sangue periférico

Foi realizada a quantificação dos Leucócitos totais e diferencial no sangue dos animais infectados com *T. cruzi* (Figura 23).

Os valores foram expressos em mm^3 , onde não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com $p > 0,05$. Os valores foram expressos em mediana (máximo-mínimo), usando o teste não-paramétrico. Para Leucócitos totais, o grupo **Controle** obteve os valores 13.250,0 (31.200,0 – 9.350,0), grupo **PBS** 19.075,0 (26.450,0 – 9.450,0) e grupo **ArtinM** 14.050,0 (20.200,0 – 10.300,0). Para Neutrófilos, o grupo **Controle** obteve os valores 1.704,0 (3.432,0 – 1.112,0), grupo **PBS** 2.369,0 (4.988,0 – 1.229,0) e grupo **ArtinM** 2.275,0 (3.232,0 – 721,0). Para Linfócitos, o grupo **Controle** obteve os valores 11.130,0 (27.144,0 – 7.293,0), grupo **PBS** 16.310,0 (22.483,0 – 8.033,0) e grupo **ArtinM** 11.176,0 (18.135,0 – 7.844,0). Para Monócitos, o grupo **Controle** obteve os valores 137,3 (624,0 – 96,5), grupo **PBS** 334,0 (1.500,0 – 113,0) e grupo **ArtinM** 479,3 (867,5 – 209,0).



1

2

3 **Figura 22.** Quantificação de Leucócitos no sangue periférico dos animais de acordo com os grupos:
 4 Controle, PBS e ArtinM após 90 dias de infecção com *T. cruzi*. Os valores foram expressos em
 5 mediana (máximo-mínimo). Não houve diferenças estatisticamente significantes, $p > 0,05$. “Kruskal-
 6 Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

6. DISCUSSÃO

A DC já passa do seu primeiro centenário após a sua descoberta e ainda continua intrigando a ciência pela sua variabilidade em sintomatologia clínica, resistência parasitária e relação com o hospedeiro. Embora exista uma tendência de declínio significativo pelas próximas 3 décadas de indivíduos infectados com a doença, existem pessoas que sofrem com o desenvolvimento da doença e um risco iminente em novos focos de contágios. Assim, a ciência busca minimizar os danos associados a esta doença através da busca de medidas profiláticas cada vez mais eficientes, terapias vacinais, tratamentos com efeitos deletérios menores, até mesmo a cura na forma crônica da doença.

Neste sentido, um grande desafio é a modulação da resposta imune, pois este é um dos mecanismos que se interagem e colabora para os danos associados com a doença na forma crônica sintomática. Além disso, a ativação imune e participação de proteínas que em concentrações elevadas favorecem para dano tecidual e instalação de alterações fisiológicas observadas na doença. A lectina ArtinM demonstrou ter um papel imunomodulador em algumas doenças parasitárias, com um perfil Th1 tendencioso, tornando assim um alvo interessante em se avaliar na DC, uma vez que respostas Th1 são relacionadas ao controle parasitário na doença, bem como a resistência de seu hospedeiro. Assim avaliou-se o efeito do tratamento da lectina ArtinM na DC experimental em sua forma crônica.

O estudo possibilitou avaliar a relação do tratamento com a ArtinM na DC experimental após 90 dias de infecção, através do monitoramento de peso, curva de parasitemia, curva de sobrevida, leucograma, quantificação de citocinas inflamatórias no tecido cardíaco e parâmetros morfométricos do coração e intestino, tais como: quantificação da área de ninhos de amastigostas e número de células do infiltrado inflamatório, além da quantificação de colágeno no tecido cardíaco e padrões histométricos intestinais (largura, comprimento e relação de peso do órgão pelo peso corporal).

Existem algumas diferenças que são verificadas entre as cepas de *T. cruzi*, dentre elas a virulência, patogenicidade e o tropismo. A cepa utilizada neste estudo (Colombiana) é caracterizada por tropismo tecidual para musculatura esquelética e miocárdica, apresenta elevada patogenicidade, além de extensas lesões necrótico-

1 inflamatórias do vigésimo ao trigésimo dias de infecção (Brener e Chiari, 1963;
2 Andrade e Rocha Silva, 1995; Rossi, 1995; Andrade, 1999; De Souza *et al.*, 2003).
3 Na infecção pelo *T. cruzi* o tipo de cepa testada é importante para avaliar a evolução
4 da doença, o grau da lesão nos tecidos, principalmente na curva de parasitemia
5 onde a cepa “Colombiana” apresenta pico entre o vigésimo e trigésimo dias de
6 infecção (Camandaroba *et al.*, 2001).

7 Outro fator analisado e também de extrema importância é o inóculo. Neste
8 trabalho realizamos um inóculo com 3×10^3 tripomastigotas sanguíneas da cepa
9 “Colombiana” de *T. cruzi*. A curva de parasitemia apresentou o pico do número de
10 parasitos/mL entre o vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia após a infecção,
11 estando de acordo com a característica da cepa já descrita anteriormente (Andrade
12 *et al.*, 1985; Andrade e Magalhães, 1997; Borges *et al.*, 2013).

13 Os resultados da parasitemia mostraram que ao sétimo dia de infecção, tanto
14 o grupo PBS quanto o grupo ArtinM não apresentaram diferenças estatisticamente
15 significantes, uma vez que se tratava do início da infecção, onde as formas
16 tripomastigotas no sangue se apresentavam em baixo número, apesar de já nesta
17 data se observar uma tendência à diminuição do grupo tratado com Lectina.

18 Ao analisar a parasitemia no período do décimo quarto ao vigésimo primeiro
19 dia de infecção e comparar os grupos infectados, o grupo que havia recebido
20 tratamento com lectina ArtinM apresentou números menores de parasitos/mL do que
21 o grupo que recebeu tratamento com PBS 1x, demonstrando que a lectina ArtinM
22 tem a capacidade em diminuir a parasitemia.

23 O controle da proliferação de microrganismos pela lectina ArtinM também foi
24 descrito em outras infecções como, por exemplo, na leishmaniose, onde a lectina
25 ArtinM induz um papel protetor conduzido por macrófagos, resultando em resistência
26 à infecção em camundongos Balb/c. Na paracoccidiodomicose a partir de um
27 tratamento terapêutico com a lectina após 10 dias de infecção com o
28 *Paracoccidioides brasiliensis*, observou-se redução da formação de unidades de
29 colônias bem como a diminuição da formação de granulomas pulmonares. Já na
30 neosporose canina, a imunização com lectina ArtinM associada ao antígeno lisado
31 de *Neospora* conferiu uma alta proteção à infecção parasitária pela indução de uma

1 resposta imune protetora vacinal em camundongos C57BL/6 (Panunto-Castelo *et al.*,
2 2001; Coltri *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2011).

3 Levando em consideração de que o infiltrado inflamatório se relaciona com o
4 estado de ativação do sistema imune e a capacidade de lesão tecidual, dado ao
5 efeito vinculado à causa de infecção e mediadores inflamatórios, quantificou-se o
6 número de células teciduais. Foi evidenciado um aumento de ambos os grupos
7 infectados, com uma ligeira diminuição do grupo que recebeu a Lectina ArtinM.
8 Acredita-se que este aumento de células, em relação ao grupo que não recebeu o *T.*
9 *cruzi* se deve à exposição antigênica no tecido após instalação de ninhos de
10 amastigotas, como já observado em outros estudos (Borges *et al.*, 2013; Da Costa
11 *et al.*, 1984; De Lourdes Higuchi *et al.*, 1993). Já a ligeira diminuição observada no
12 grupo em que recebeu Lectina ArtinM é suportado pela discreta diminuição de
13 ninhos de amastigotas tecidual, fato este que colabora para diminuição da exposição
14 antigênica e migração celular, mecanismo amplamente conhecido para mediar a
15 diapedese (Pereira e Burini, 1991; Silva, 2012).

16 A carga antigênica vinculada à capacidade imunogênica reconhecida pelo
17 hospedeiro, irá dirigir maior ou menor lesão tecidual, o que levaria aos processos de
18 reparos distintos pela deposição de colágeno e formação de fibrose. A deposição de
19 colágeno é precedida de diversos eventos vinculados ao sistema imune na fase
20 crônica da doença. De forma curiosa, além da exposição antigênica e o
21 reconhecimento do hospedeiro a autoimunidade já foi associada com processos pró-
22 inflamatórios observados na fase crônica da doença, uma vez que há diminuição
23 significativa da parasitemia, persistência inflamatória, com uma indução humoral
24 demonstrada pela positividade de anticorpos na fase crônica da doença (Tafari,
25 1987). Embora se acredite que a permanência humoral seja um fator desencadeante
26 de lesão pela ativação do sistema complemento pela via clássica (Coelho-Castelo *et al.*,
27 2009; De Melo Cruvinel *et al.*, 2010), posteriormente tornou-se até um indicativo
28 de cura da doença anticorpo-dependente (títulos de anticorpo lítico) (Galvão *et al.*,
29 1993; Cançado, 1999).

30 Por outro lado sabe-se que a inflamação tecidual na fase crônica da doença
31 permite que macrófagos sensibilizados e ativados, além de destruir componentes do
32 interstício através de enzimas líticas (colagenases, elastases) e prostaglandinas,

1 liberem o fator fibronectina, uma glicoproteína quimiotática para fibroblastos e mais
2 os fatores moduladores diretos como os fatores de crescimento; além disso,
3 linfócitos T parecem ter papel importante, pois citocinas constituem fatores
4 quimiotáticos e estimuladores da proliferação fibroblástica no foco inflamatório, onde
5 o fibroblasto irá se proliferar e sintetizar colágeno, que passa ser importante no
6 processo de reparo por cicatrização (fibrose), e o que se evidencia na DC é um
7 descontrole na formação do colágeno e o seu excesso resulta em dano para a célula
8 tecidual e/ou órgãos na fase crônica da doença acarretando em disfunção (Tafari,
9 1979; Cançado e Chuster, 1985; Tafari, 1987). Evidentemente qualquer interação
10 molecular que permita a imunorregulação e o controle no processo de reparo
11 tecidual se torna um alvo bastante valioso na luta contra danos irreversíveis até aqui
12 na DC crônica.

13 Colaborando com as descrições citadas anteriormente pode-se observar
14 neste estudo uma redução no colágeno quantificado no grupo infectado que recebeu
15 Lectina ArtinM quando comparado ao grupo PBS. Outros estudos visam restituir o
16 tecido que sofreu reparo por fibrose, como observado no transplante de medula
17 óssea e transplante de células mesenquimais de tecido adiposo no tratamento da
18 cardiopatia chagásica (Vilas-Boas *et al.*, 2004). Bustamante *et al.*, (2007)
19 observaram diminuição da fibrose em camundongos tratados com benznidazol,
20 medicamento de escolha atualmente para tratamento da DC. Acredita-se que esta
21 atividade de diminuição de colágeno se deve pelo controle precoce parasitário e
22 menores efeitos deletérios ao longo da doença, dado demonstrado na curva de
23 parasitemia. Isto enfatiza a importância de novos estudos para avaliar a
24 funcionalidade do órgão, tanto a nível cardíaco como digestivo.

25 A presença do infiltrado inflamatório está relacionado com lesões em diversos
26 locais, assim demonstra-se que em relação aos dados histométricos intestinais
27 (comprimento, largura e relação peso corporal pelo peso do órgão), o grupo que
28 recebeu a Lectina não apresentou diferenças quanto ao comprimento comparado
29 com controle, relação não verdadeira de grupo infectado PBS. Por outro lado, na
30 relação de pesos (corporal/órgão) não observou-se diferenças entre os grupos
31 infectados. A perda das dimensões histométricas já é algo esperado na fase crônica
32 da doença (Pinheiro *et al.*, 2003); uma vez que alterações no tecido intestinal

1 associadas à DC já são conhecidos e amplamente estudados na fase crônica da
2 doença (Todd *et al.*, 1969; Fernandes *et al.*, 1991; Lopes *et al.*, 2013). Uma vez que
3 as alterações morfométricas estão associados à desnervação da camada muscular,
4 que facilita a dilatação do tecido, diminuindo assim a sua espessura. Estas
5 modificações além de serem cepa e hospedeiro dependente, nosso grupo
6 demonstrou em outro estudo estar também associado à concentração do inóculo e
7 com modificações já proeminentes na fase aguda da doença, com o pico de
8 parasitemia (Vazquez *et al.*, 2015). No presente estudo o inóculo foi considerado
9 médio, o que já não se esperava grandes modificações histométricas, mas o
10 suficiente para correlacionar com modificações funcionais. Da mesma forma
11 relacionamos uma menor injúria tecidual pelo controle parasitário em resposta
12 imunomodulatória observada no grupo infectado tratado com a Lectina ArtinM. Algo
13 semelhante foi observado por Teixeira *et al.*, (2006) na infecção por *Leishmania*
14 *amazonenses*, quando a Lectina ArtinM foi capaz de induzir a produção de IFN- γ ,
15 importante citocina vinculada ao processo de retroativação macrofágica,
16 potencializando o seu poder tripanocida via óxido nítrico.

17 Na fase crônica da doença espera-se menores concentrações de citocinas
18 pró-inflamatórias levando em consideração a redução parasitária. No entanto este
19 estado é variável e poderá direcionar a forma clínica da doença. Infiltrado de células
20 mononucleares no tecido cardíaco expressam IFN- γ , TNF- α e IL-6, com baixos
21 níveis de IL-2, IL-4 e IL-10 (Reis *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2001).
22 Neste estudo foi observada uma tendência de elevação para as citocinas pró-
23 inflamatórias TNF- α , IL-12p40 no grupo infectado sem tratamento; o mesmo não foi
24 observado no grupo tratado. O oposto foi observado na avaliação da IL-10, onde o
25 grupo infectado que recebeu a Lectina ArtinM apresentou maiores níveis em relação
26 ao grupo infectado sem tratamento, demonstrando assim uma atividade anti-
27 inflamatória em estágios crônicos da doença.

28 Levando em consideração os efeitos imunomodulatórios dado a mediadores
29 químicos observados na infecção pelo *T. cruzi*, tanto no pelo processo de migração
30 celular quanto na interação da hematopoese, quantificou-se os leucócitos no sangue
31 periférico, onde não houveram modificações significativas na interação com células
32 leucocitárias do sangue e citocinas após 90 dias de infecção pelo *T. cruzi*. Este fato é

1 relevante, uma vez que a atividade imunorregulatória pode favorecer ao
2 desequilíbrio celular e/ou de proteínas expressas pelo sistema imune, como já
3 observado em outros mecanismos (Santos, 2013).

4 Na avaliação intestinal, observou-se a redução da área de ninhos de
5 amastigotas em 39,29% do grupo que recebeu o tratamento com ArtinM em
6 comparação com grupo infectado que recebeu somente PBS. Assim, a lectina
7 ArtinM foi capaz de modular a resposta imune frente a infecção pelo *T. cruzi*, sem
8 que houvesse alterações significativas em números de células de expressão de
9 proteínas inflamatórias após os 90 dias da doença. Ao mesmo tempo, contribuiu
10 para a redução do colágeno no tecido cardíaco, sem manifestações de aumento
11 celular. Assim o presente estudo permite concluir um efeito benéfico
12 imunomodulatório associado ao tratamento com a lectina AtinM na infecção crônica
13 experimental pelo *T. cruzi*.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1 7. CONCLUSÃO

2

3 Conclui-se que a lectina ArtinM apresenta um efeito biológico durante a fase
4 crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*, com a diminuição dos níveis de
5 parasitos/mL, diminuição do número de células no tecido cardíaco e intestino,
6 diminuição significativa da porcentagem de colágeno no tecido cardíaco e tendência
7 à diminuição do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco e intestino

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

8. REFERÊNCIAS

- 1
2
- 3 ABEL L.C. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an
4 increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of autoimmunity,
5 v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.
- 6 ADAD SJ, SILVA GB, JAMMAL AA. The development of chagasic megacolon
7 requires severe denervation and the reduction in interstitial cells of Cajal number
8 might be a contributing factor. Virchows Archiv. 462:127-127, 2013.
- 9 ANDERSEN M.L. *et al.* Princípios éticos e práticos do uso de animais de
10 experimentação. Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina.
11 Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- 12 ANDRADE S. *et al.* Patologia experimental da doença de Chagas. *Trypanosoma*
13 *cruzi* e Doença de Chagas, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 177-200, 2000.
- 14 ANDRADE S.G.; MAGALHÃES J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma*
15 *cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Revista da
16 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.
- 17 ANDRADE V. *et al.* Avaliação do comportamento de diferentes cepas do
18 *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos.
19 Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 18, n. 3, p. 143-154, 1985.
- 20 ANDRADE Z.A. Immunopathology of Chagas disease. Memórias do Instituto
21 Oswaldo Cruz, v. 94, p. 71-80, 1999.
- 22 ANDRADE Z.A.; ROCHA SILVA, H. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*.
23 Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 90, p. 521-522, 1995.
- 24 ARANGO H.G. Bioestatística teórica e computacional. In: (Ed.). Bioestatística teórica
25 e computacional: Guanabara Koogan, 2001.
- 26 BILATE A.; CUNHA-NETO E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of
27 an old disease. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, n. 2, p.
28 67-74, 2008.
- 29 BORGES DC, ARAÚJO NM, CARDOSO CR, LAZO CHICA JE. Different parasite
30 inocula determine the modulation of the immune response and outcome of
31 experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. 138(2):145-56, 2013.
- 32 BRADLEY J. TNF-mediated inflammatory disease. The Journal of pathology, v. 214,
33 n. 2, p. 149-160, 2008.
- 34 BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected
35 with *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo, v. 4, n.
36 11-12, p. 389-396, 1962.
- 37 BRENER Z.; CHIARI E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras
38 de *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo, v. 5, n.
39 5, p. 220-224, 1963.
- 40 BUSTAMANTE J.M. *et al.* Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic
41 phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy. International journal of
42 antimicrobial agents, v. 29, n. 6, p. 733-737, 2007.

- 1 CAMANDAROBA, E.L.P. *et al.* Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian
2 strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of
3 seven isolated clones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34,
4 n. 2, p. 151-157, 2001.
- 5 CANÇADO J.R. Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo*
6 *Cruz*, v. 94, p. 331-335, 1999.
- 7 CANÇADO J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with
8 benzimidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n. 1, p.
9 29-37, 2002.
- 10 CANÇADO J.R.; CHUSTER M. Cardiopatia chagásica. In: (Ed.). *Cardiopatia*
11 *chagásica*: Fundação Carlos Chagas, 1985.
- 12 CARDILLO F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma
13 interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and immunity*, v. 64, n. 1, p.
14 128-134, 1996.
- 15 CARDOSO M.R. *et al.* ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus*
16 *integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization
17 against *Neospora caninum*. *Vaccine*, v. 29, n. 49, p. 9183-9193, 2011.
- 18 CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo
19 evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade
20 morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-218,
21 1909.
- 22 CHAHUD F. *et al.* The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits.
23 *International journal of experimental pathology*, v. 90, n. 2, p. 166-173, 2009.
- 24 COELHO-CASTELO A.A. *et al.* Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina*
25 *(Ribeirao Preto. Online)*, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.
- 26 COLTRI K.C. *et al.* Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against
27 *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like
28 receptor 2-dependent mechanism. *The American journal of pathology*, v. 173, n. 2, p.
29 423-432, 2008.
- 30 COURA J.R. *et al.* Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in
31 the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias*
32 *do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 856-862, 2014.
- 33 CUNHA-NETO E. *et al.* Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular.
34 *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 5, p. 217-229,
35 1995.
- 36 CUSTODIO L.A. *et al.* Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus*
37 *integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by
38 *Candida albicans*. *International immunopharmacology*, v. 11, n. 10, p. 1510-1515,
39 2011.
- 40 DA COSTA S.G. *et al.* Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology
41 of experimental chagas' disease: I.—Histopathological studies. *Annales de l'Institut*
42 *Pasteur/Immunologie, Elsevier*. p.317-332, 1984.

- 1 DA SILVA B.; SILVA B. Thio-and semicarbazones: Hope in the search for treatment
2 of Leishmaniasis and Chagas disease. Medicinal chemistry (Sharīqah - United Arab
3 Emirates), 2016.
- 4 DÁVILA D.F. *et al.* Effects of metoprolol in chagasic patients with severe congestive
5 heart failure. International journal of cardiology, v. 85, n. 2, p. 255-260, 2002.
- 6 DE ARAÚJO-JORGE T.C.; DE CASTRO S.L. Doença de Chagas: Manual para
7 experimentação animal. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2000.
- 8 DE LOURDES HIGUCHI M. *et al.* Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism
9 and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light
10 microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovascular Pathology, v. 2, n. 2,
11 p. 101-106, 1993.
- 12 DE MELO CRUVINEL W. *et al.* Sistema Imunitário–Parte I Fundamentos da
13 imunidade inflata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta
14 inflamatória. Rev Bras Reumatol, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.
- 15 DE SOUZA E. *et al.* Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi*
16 infection in in vitro and in vivo models. Cell and tissue research, v. 314, n. 2, p. 223-
17 235, 2003.
- 18 DIAS J.C.P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiologia e
19 Serviços de Saúde, v. 25, n. ESP, p. 7-86, 2016.
- 20 DOCAMPO R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs.
21 Chemico-biological interactions, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990.
- 22 FERNANDES M. *et al.* Morphometric investigations of the colon mucosa in chronic
23 *Trypanosoma cruzi* infected rats. Virchows Archiv B, v. 60, n. 1, p. 119-122, 1991.
- 24 FRANCO M. Centro de desenvolvimento de modelos experimentais:
25 CEDEME/COBEA da Universidade de São Paulo, 2005.
- 26 GALVÃO L. *et al.* Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of
27 Chagas disease: a 10 years follow-up study. Transactions of the Royal Society of
28 Tropical Medicine and Hygiene, v. 87, n. 2, p. 220-223, 1993.
- 29 HALLY A.D. A counting method for measuring the volumes of tissue components in
30 microscopical sections. Journal of Cell Science, v. 3, n. 72, p. 503-517, 1964.
- 31 KIM Y.J. *et al.* Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in
32 rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production. Wound Repair and
33 Regeneration, v. 21, n. 3, p. 456-463, 2013.
- 34 KIRCHHOFF L.V. American Trypanosomiasis (Chagas'disease). Gastroenterology
35 Clinics of North America, v. 25, n. 3, p. 517-533, 1996.
- 36 LECHUGA G.C. *et al.* Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising
37 mechanism against *Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology: Drugs
38 and Drug Resistance, v. 6, n. 3, p. 154-164, 2016.
- 39 LEMOS J.R.D. *et al.* Influence of parasite load on renal function in mice acutely
40 infected with *Trypanosoma cruzi*. PloS One, v. 8, n. 8, p. e71772, 2013.

- 1 LIN L. *et al.* Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against
2 *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. PLoS Pathog, v. 5, n.
3 12, p. e1000703, 2009.
- 4 LOPES E. *et al.* Patologia das principais doenças tropicais. Bogliolo patologia. 6th
5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1165-1275, 2000.
- 6 LOPES ER, CHAPADEIRO E, ANDRADE ZA, ALMEIDA H, ROCHA A. Anatomia
7 patológica dos corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento.
8 Memória do Instituto Oswaldo Cruz, 76: 189-197, 1981.
- 9 LOPES G.P. *et al.* Length and caliber of the rectosigmoid colon among patients with
10 Chagas disease and controls from areas at different altitudes. Revista da Sociedade
11 Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 6, p. 746-751, 2013.
- 12 LOYOLA W. *et al.* ArtinM enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida*
13 *albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. International
14 immunopharmacology, v. 12, n. 2, p. 378-383, 2012.
- 15 MANDARIM-DE-LACERDA C.A. Stereological tools in biomedical research. Anais da
16 Academia brasileira de Ciências, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.
- 17 MEZADRI T.J. *et al.* Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental.
18 Editora da UFSC, 2004.
- 19 MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Doença de
20 Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Bol Epidemiol, v. 46, n. 21,
21 2015.
- 22 MONCAYO Á.; SILVEIRA A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in
23 Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy.
24 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 17-30, 2009.
- 25 MUÑOZ M.J. *et al.* The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment
26 of Chagas disease. Expert review of anti-infective therapy, v. 9, n. 1, p. 5-7, 2011.
- 27 NOVAES R.D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy
28 independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the
29 liver tissue in mice. Parasitology research, v. 114, n. 8, p. 2873-2881, 2015.
- 30 PANUNTO-CASTELO A. *et al.* KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-
31 12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated
32 immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to
33 infection. Glycobiology, v. 11, n. 12, p. 1035-1042, 2001.
- 34 PARADA H. *et al.* Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas'
35 disease: a clinical, parasitological and histopathological study. International journal of
36 cardiology, v. 60, n. 1, p. 49-54, 1997.
- 37 PEREIRA P.C.M.; BURINI R.C. Resposta do hospedeiro à infecção: inativação de
38 mediadores e morte do agressor. Arq. bras. med, v. 65, n. 5, p. 501-4, 1991.
- 39 PEREIRA-DA-SILVA G. *et al.* ArtinM: a rational substitution for the names artocarpin
40 and KM+. Immunology letters, v. 119, n. 1, p. 114-115, 2008.

- 1 PINHEIRO S.W. *et al.* Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the
2 circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon.
3 Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36, n. 4, p. 461-466, 2003.
- 4 PINHEIRO SW, RUA AM, ETCHEBEHERE RM, CANÇADO CG, CHICA JE, LOPES
5 ER, ADAD SJ. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular
6 colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. Rev Soc
7 Bras Med Trop. 36(4):461-6. 2003.
- 8 PINTO DIAS J.C. Human chagas disease and migration in the context of
9 globalization: some particular aspects. Journal of tropical medicine, v. 2013, 2013.
- 10 PRATA A. Classificação da infecção chagásica no homem. Revista da Sociedade
11 Brasileira de Medicina Tropical, 23: 109-113, 1990.
- 12 RASSI A. *et al.* Tratamento da fase crônica da doença de Chagas com nifurtimox
13 associado a corticóide. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35,
14 n. 6, p. 547-550, 2002.
- 15 RASSI A.; MARIN-NETO J.A. Chagas disease. The Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-
16 1402, 2010.
- 17 REIS D.A. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic
18 myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of
19 granzyme A+, CD8+ lymphocytes. The American journal of tropical medicine and
20 hygiene, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993.
- 21 REIS M.M. *et al.* Anin Situ Quantitative Immunohistochemical Study of Cytokines and
22 IL-2R+ in Chronic Human Chagasic Myocarditis: Correlation with the Presence of
23 Myocardial *Trypanosoma cruzi* Antigens. Clinical immunology and immunopathology,
24 v. 83, n. 2, p. 165-172, 1997.
- 25 REZENDE J.D. *et al.* Manifestações digestivas da doença de Chagas.
26 Gastroenterologia clínica, v. 3, p. 1729-1755, 1993.
- 27 RODRIGUES W.F. *et al.* 15d-PGJ2 modulates acute immune responses to
28 *Trypanosoma cruzi* infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 2, p.
29 137-143, 2010.
- 30 ROSA J.C. *et al.* KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino
31 acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of
32 the β -prism fold. Protein science, v. 8, n. 1, p. 13-24, 1999.
- 33 ROSSI M.A. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. Sao Paulo Medical
34 Journal, v. 113, n. 2, p. 750-756, 1995.
- 35 SANTOS H.A.D. Avaliação da influência do interferon gama durante a infecção por
36 *Corynebacterium pseudotuberculosis* em modelo murino. 2013.
- 37 SANTOS-DE-OLIVEIRA R. *et al.* A neutrophil migration-inducing lectin from
38 *Artocarpus integrifolia*. The Journal of Immunology, v. 153, n. 4, p. 1798-1807, 1994.
- 39 SEID C.A. *et al.* Cysteine Mutagenesis Improves the Production without Abrogating
40 Antigenicity of a Recombinant Protein Vaccine Candidate for Human Chagas
41 Disease. Hum Vaccin Immunother, p. 1-13, 2016.

- 1 SILVA F.H.G.D. Avaliação da angiogênese inflamatória em camundongos induzida
2 por antígenos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado) -
3 Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas.
4 Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em
5 Ciências Biológicas, 2012.
- 6 SILVA T.A. Efeito biológico da Lectina ArtinM em camundongos Balb/C durante a
7 fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Curso de Biomedicina,
8 Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2009.
- 9 SOSA-ESTANI S. *et al.* Etiological treatment of young women infected with
10 *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. Revista da
11 Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 5, p. 484-487, 2009.
- 12 STEVENS A. The haematoxylin. Theory and practice of histological techniques.
13 Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 111-113, 1990.
- 14 TAFURI W. Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infections. Biology of the
15 Kinetoplastida, v. 2, p. 547-618, 1979.
- 16 TAFURI W.L. Patogenia da doença de Chagas. Revista do Instituto de Medicina
17 Tropical de São Paulo, v. 29, n. 4, p. 194-199, 1987.
- 18 TEIXEIRA C.R. *et al.* Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania*
19 *amazonensis* infection. Vaccine, v. 24, n. 15, p. 3001-3008, 2006.
- 20 TODD I. *et al.* Chagas disease of the colon and rectum. Gut, v. 10, n. 12, p. 1009-
21 1014, 1969.
- 22 URBINA J.A.; DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease:
23 controversies and advances. Trends in parasitology, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- 24 VALLEJO A. *et al.* Changes in the immune response after treatment with
25 benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas
26 disease. Acta Tropica, v. 164, p. 117-124, 2016.
- 27 VAZQUEZ B.P. *et al.* Inflammatory responses and intestinal injury development
28 during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load.
29 Parasites & Vectors, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- 30 VILAS-BOAS F. *et al.* Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a
31 patient with heart failure due to Chagas' disease. Arquivos brasileiros de cardiologia,
32 v. 82, n. 2, p. 181-184, 2004.
- 33 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis).
34 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >.
35 Acesso em: 30 de junho de 2016.
- 36 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease: second report of the
37 WHO expert committee. 2002.
- 38 ZELANTE T. *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair
39 antifungal immune resistance. European journal of immunology, v. 37, n. 10, p. 2695-
40 2706, 2007.
- 41