

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CAMILA BOTELHO MIGUEL

**ADMINISTRAÇÃO DA LECTINA *ARTINM* EM CAMUNDONGOS FAVORECE O
CONTROLE PARASITÁRIO DURANTE A INFECÇÃO AGUDA PELO
*TRYPANOSOMA CRUZI***

UBERABA-MG

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CAMILA BOTELHO MIGUEL

**ADMINISTRAÇÃO DA LECTINA *ARTINM* EM CAMUNDONGOS FAVORECE O
CONTROLE PARASITÁRIO DURANTE A INFECÇÃO AGUDA PELO
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada à pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia Clínica

ORIENTADOR: Prof. Dr. Javier Emílio Lazo Chica

UBERABA

2012

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos àqueles que hoje sofrem com a Doença de Chagas, aos que aguardam pelo desenvolvimento de novas metodologias de tratamento, aos pesquisadores da área para que sempre busquem e descubram novas formas de tratamento para que no futuro exista uma erradicação da doença, aos animais que sem escolha, sacrificaram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela oportunidade e por me iluminar e amparar nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao meu namorado Wellington Francisco Rodrigues pela força, incentivo, ajuda, apoio em todas as etapas deste trabalho e em todos os momentos da minha vida. Pelo incentivo em prestar a prova da pós-graduação, pela ajuda em várias etapas do projeto, por todo amor, carinho, dedicação que demonstra todos os dias para que este trabalho pudesse ser finalizado.

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

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

À Prof^a. Maria Cristina Roque Barreira por aceitar a continuidade da parceria com nosso grupo de pesquisa 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.

Ao Laboratório Santa Lucília – Medicina Diagnóstica, em especial ao Dr. César Augusto de Moraes pela disponibilidade do laboratório para a realização dos hemogramas.

À amiga da disciplina de Biologia Celular Juliana Regina Dias Lemos, pelo companheirismo, força de vontade e pela amizade dentro e fora do laboratório que muito contribuiu para esta conquista.

Ao técnico do laboratório de Biologia Celular João Batista Pereira pela ajuda no processamento e corte histológico, pela atenção, paciência e amizade durante todo o tempo.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Celular; Alex, Valdira e Osvaldina; pela participação indireta, cada um desenvolvendo sua função para que nós pudéssemos realizar os procedimentos e pela ótima convivência durante esse período.

Aos colegas da pós-graduação que de diversas formas, direta ou indiretamente me ajudou a finalizar os trabalhos, pela companhia nas aulas das disciplinas cursadas, na montagem e apresentação dos inúmeros seminários, e por todo o aprendizado que a boa convivência consegue ensinar.

Aos professores que ofereceram as disciplinas cursadas, pela metodologia utilizada, pelos ensinamentos propostos e pela disposição em atender as necessidades mesmo em horários extra-aula.

Aos examinadores do trabalho pela contribuição dos conhecimentos e sugestões no aperfeiçoamento desta dissertação.

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

APOIO FINANCEIRO

A realização deste trabalho obteve apoio financeiro das seguintes instituições: Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (USP-RP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Introdução: A Doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase Americana, é uma antroponose causada pela infecção do protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), que constitui um dos principais problemas médico-sociais brasileiros e um grave problema de saúde pública na América Latina. Atualmente o tratamento é realizado através de agentes quimioterápicos e os medicamentos Benzonidazol e Nifurtimox. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas ligantes de açúcar, que aglutinam células e ou precipitam glicoconjugados. A lectina *ArtinM* é dotada de importante propriedade imunomoduladora, exercida pela indução da produção de IL-12. **Objetivos:** Analisar o efeito da imunomodulação promovida por *ArtinM* durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T.cruzi*. **Material e métodos:** Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem BALB/c com 10 semanas de idade, divididos nos grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. A infecção pelo *T.cruzi* foi realizada com inóculo de 3×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa “Colombiana”. Animais dos grupos Controle tratado com Salina e Infectado tratado com Salina receberam 100µl de solução Salina a 0,9%, e os do grupo Controle tratado com Lectina e Infectado tratado com Lectina receberam uma concentração de 0,5µg/100µl da lectina *ArtinM*. Administração da salina e lectina foi realizada durante três dias consecutivos que antecederam a infecção e no quinto, décimo e décimo quinto dias após a infecção. A parasitemia foi realizada no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após a infecção. Após 23 dias de infecção os animais foram eutanasiados e submetidos à necropsia. Coletou-se o sangue para análise do hemograma e reticulócitos; o plasma, baço e átrios para quantificação das citocinas IL-12 p40, IL-10, IFN-γ e TNF, através da técnica de ELISA; ventrículos para análise histológica, onde foram realizados cortes com 6µm de espessura e corados por HE. Analisou-se a porcentagem da área do infiltrado inflamatório através da grade de pontos com área pré-determinada e o número de ninhos de *T.cruzi* por imunohistoquímica. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. **Resultados:** O grupo Infectado tratado com Lectina apresentou menores números de parasitos, com diferença significativa no décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção. Na análise do hemograma, encontramos uma diminuição dos valores provindos do eritrograma nos grupos infectados, dentre eles número de Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, Índices Hematiméticos (VCM e HCM) e Amplitude de distribuição das hemácias (RDW), além da elevação dos Reticulócitos. Não houve diferenças na contagem de plaquetas. Aumento de leucócitos totais e conseqüentemente neutrófilos, linfócitos e monócitos. Na análise histológica, houve uma redução da porcentagem da área de infiltrado inflamatório e ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco. Na avaliação das citocinas os perfis da quantificação entre os diferentes órgãos foram similares com redução de IL-12 p40, IFN-γ e TNF e aumento de IL-10 no grupo Infectado tratado com Lectina *ArtinM* em relação ao grupo Infectado tratado com Salina. **Conclusão:** Concluimos que a lectina *ArtinM* apresenta um efeito biológico em camundongos Balb/C durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Lectina *ArtinM*, Parasitemia.

ABSTRACT

Background: Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is caused by an anthrozoosoon infection of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which is a major medical-social problem in Brazil and a serious public health problem in Latin America. Currently, the treatment is performed by chemotherapeutic agents and medications benznidazole and nifurtimox. Lectins are proteins or glycoproteins of sugar binder, which agglutinate cells and or precipitate glycoconjugates. The lectin *ArtinM* important property is endowed with immunomodulating by exerted by induction of IL-12. **Objectives:** Evaluate the effect of immunomodulation by *ArtinM* promoted during the acute phase of experimental infection with *T.cruzi*. **Methods:** Were used forty male mice of lineage BALB/c with ten week old, divided in the groups: Control treated with Saline, Control treated with Lectin, Infected treated with Saline e Infected treated with Lectin. The infection with the *T.cruzi* was performed with an inoculum of 3×10^3 blood trypomastigotes of the “Colombiana” strain. Animals from the groups Control treated with Saline and animals Infected treated with Saline received 100 μ L of saline 0,9% and the groups Control treated with Lectin and Infected treated with Lectin received 0,5 μ g/100 μ L of Lectin *ArtinM*. Saline and Lectin of administration was performed for three consecutive days prior to infection and the in the fifth, tenth and fifteenth days after infection. The parasitemia was performed on the seventh, fourteenth and twenty-first day after infection. After 23 days of infection the animals were euthanized and necropsied. Blood was collected for analysis of hemogram and count of reticulocytes. The plasma, spleen and atria performed the quantification of IL-12 p40, IL-10, IFN- γ and TNF by ELISA; ventricles for histological analysis, which were performed with 6 μ m thick sections and strained with hematoxylin and eosin. We analyzed the percentage of the area of inflammatory infiltrate through the grid points with predetermined area and the number of nests of *T.cruzi* by immunohistochemistry. Values were considered significant when $p < 0.05$. **Results:** The group Infected treated with Lectin showed lower numbers of parasites, a significant difference in the fourteenth and twenty-first day of infection. In the analysis of hemogram, we found a decrease in erythrocyte values stemming from the infected groups, including number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, hematimetrics indices (MCV and MCH) and Amplitude distribution of red blood cells (RDW), besides the increase in reticulocytes. No differences in platelet count. Increase in total leukocytes and therefore neutrophils, lymphocytes and monocytes. In histological analysis, there was a reduction in the percentage of the area of inflammatory infiltrate and nests of *T. cruzi* in heart tissue. In the cytokines evaluation of the measurement profiles of the different organs were similar reduction of IL-12 p40, TNF and IFN- γ and IL-10 increased in the group Infected treated with Lectin *ArtinM* in comparasion with group Infected treated saline. **Conclusion:** We conclude that the lectin *ArtinM* has a biological effect in Balb/C during the acute phase of experimental infection with *T.cruzi*.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Lectin *ArtinM*, Parasitemia.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Cronograma de atividades do experimento..... | 50 |
| Figura 2 Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de microscopia. Os cortes de 6µm de espessura foram distribuídos em 16 lâminas, sendo quatro cortes em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60µm. Para análise da área do infiltrado inflamatório foram utilizados dois cortes com distância de 120µm. Para análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados um corte de cada lâmina de animal infectado. | 54 |
| Figura 3 - Fórmula para determinar a quantidade de imagens e pontos a serem contados para possibilitar a quantificação do volume de infiltrado inflamatório nos ventrículos. O erro padrão relativo (EPR) deve ser menor ou igual a 5% (0,05). O Vv foi determinado pela relação entre o número de pontos pertencentes ao infiltrado inflamatório e o número de pontos teste. Com o valor de Vv obtém-se o n , sendo este utilizado para determinar o n (corrigido), o qual representa o número total de pontos a serem utilizados no coração. | 56 |
| Figura 4 Região representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das imagens com objetiva de 20X para posterior análise do volume de infiltrado inflamatório. No quadro A e B, a região demarcada em amarelo corresponde ao local que foram realizadas as capturas microscópicas no ventrículo esquerdo, direito e septo. | 57 |
| Figura 5 Quantificação do infiltrado inflamatório 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 primeira área marcada com a letra X em maior aumento, onde 11 pontos amarelos recaíram sobre área branca sendo considerado como tecido 89 pontos. Em C mostra a outra área marcada com a letra X , onde 86 pontos em amarelo recaem na área com infiltrados inflamatórios, considerando como tecido 14 pontos. | 58 |
| Figura 6 Demonstra a quantidade dos ninhos de amastigotas marcados por imunohistoquímica no tecido cardíaco dos camundongos BALB/c nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção pelo <i>T.cruzi</i> . Em A e B representa a imagem do ventrículo direito e parte do septo. Em C demonstra marcações exclusivas de amastigotas utilizando o comando “Color Threshold”, em D demonstra a área do tecido cardíaco visualizado em E. Em F e G demonstra imagens binárias utilizadas para contagens e cálculo da área do tecido visualizado em H. | 61 |
| Figura 7 Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina, após 7 dias de | |

infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores, máximo e mínimo. Teste "Mann Whitney", com $p=0,8646$65

Figura 8 Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina, após 14 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo. Teste "Mann Whitney", com $p=0,0448$66

Figura 9 Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado e tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina, após 21 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM. Teste "t" não pareado, $p=0,0008$67

Figura 10 Curva de Parasitemia no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção. O gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores estão expressos em média. *Diferença estatisticamente significativa no décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção, $p<0,05$68

Figura 11 Valores das Hemácias expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo onde * = $p=0,0022$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.69

Figura 12 Valores do Hematócrito expressos em % segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm , EPM, onde * = $p<0,0001$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison"70

Figura 13 Valores do VCM expressos em fL segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo onde * = $p=0,0020$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.71

Figura 14 Valores da Hemoglobina expressos em g/dL segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p<0,0001$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison"72

Figura 15 Valores de HCM expressos em pg segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a

distribuição e a média \pm EPM, onde * = $p=0,0016$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".....73

Figura 16 Valores do RDW expressos em % segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo, onde * = $p=0,0183$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.74

Figura 17 Valores dos Reticulócitos expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo onde * = $p=0,0056$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.75

Figura 18 Valores de Plaquetas expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p=0,5186$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".....76

Figura 19 Valores dos Leucócitos Totais expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo onde * = $p=0,0220$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.77

Figura 20 Valores absolutos dos Neutrófilos expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p=0,0393$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".78

Figura 21 Valores absolutos dos Linfócitos expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo, onde $p=0,0541$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.79

Figura 22 Valores absolutos dos Monócitos expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p=0,0051$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.80

- Figura 23** Porcentagem da área do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco expressa em μm^2 segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM onde * = $p < 0,0001$. Teste "*t*" não pareado.81
- Figura 24** Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica expressos em cm^2 segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo, onde * = $p < 0,0001$. Teste "Mann Whitney".82
- Figura 25** Em A e B: foto representativa de uma área do tecido cardíaco na qual foi utilizada para quantificação do Infiltrado Inflamatório através da grade de pontos nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina *ArtinM* respectivamente. Imagem capturada com objetiva de 20x. Em C e D: foto representativa de uma área do tecido cardíaco que foi utilizada para contagem de ninhos de *T. cruzi* por Imunohistoquímica nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina *ArtinM* respectivamente. Imagem capturada com objetiva de 10x.83
- Figura 26** Correlação de *Spearman* do Número de Ninhos de *T. cruzi* por cm^2 com o Infiltrado Inflamatório no tecido cardíaco segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. (Rho 0,8 $p < 0,0036$).84
- Figura 27** Valores da citocina TNF expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p = 0,4933$; * = $p = 0,0004$ e $0,0060$ respectivamente. Teste "*t*" não pareado.85
- Figura 28** Valores da citocina TNF expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p = 0,0102$; $p = 0,4652$ e $0,6671$ respectivamente. Teste "*t*" não pareado.86
- Figura 29** Valores da citocina IL-12 p40 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo; média \pm EPM, onde * = $p = 0,0101$; $p = 0,1508$; * = $p = 0,0019$, respectivamente. Teste "Mann Whitney" e Teste "*t*" não pareado.87
- Figura 30** Valores da citocina IL-12 p40 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e

Infectado tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p=0,0101$; $p=0,1508$ e $0,0884$, respectivamente. Teste "t" não pareado.....88

Figura 31 Valores da citocina IL-10 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM; mediana, valores máximo e mínimo, onde $p= 0,0970$; $0,2222$; * = $p= 0,0079$, respectivamente. Teste "t" não pareado e Teste "Mann Whitney"89

Figura 32 Valores da citocina IL-10 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p= 0,0006$; $p= 0,1601$ e $0,4581$, respectivamente. Teste "t" não pareado.90

Figura 33 Valores da citocina IFN- γ expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p= 0,3768$; * = $p= 0,0142$ e $p= 0,0751$, respectivamente. Teste "t" não pareado.....91

Figura 34 Valores da citocina IFN- γ expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo; média \pm EPM, onde * = $p=0,0009$; $p=0,0692$; $0,1649$ respectivamente. Teste "Mann Whitney" e Teste "t" não pareado.92

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1 Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina em relação ao sétimo dia de infecção..... | 120 |
| Anexo 2 Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina em relação ao décimo quarto dia de infecção..... | 120 |
| Anexo 3 Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina em relação ao vigésimo primeiro dia de infecção. | 121 |
| Anexo 4 Valores das Hemácias/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 121 |
| Anexo 5 Valores do Hematócrito (%) nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 121 |
| Anexo 6 Valores do Volume Corpuscular Médio (fL) nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 122 |
| Anexo 7 Valores da Hemoglobina (g/dL) nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 122 |
| Anexo 8 Valores da Hemoglobina Corpuscular Média (pg) nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 122 |
| Anexo 9 Valores da Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW) em % nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 123 |
| Anexo 10 Valores dos Reticulócitos/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 123 |
| Anexo 11 Valores das Plaquetas/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina , Controle tratado com Lectina , Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina | 123 |

| | |
|---|-----|
| Anexo 12 Valores dos Leucócitos Totais/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 124 |
| Anexo 13 Valores dos Neutrófilos/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 124 |
| Anexo 14 Valores dos Linfócitos/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 124 |
| Anexo 15 Valores dos Monócitos/mm ³ nos grupos Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 125 |
| Anexo 16 Valores da porcentagem da área de Infiltrado Inflamatório no coração nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 125 |
| Anexo 17 Valores da quantificação dos Ninhos de <i>T.cruzi</i> no tecido cardíaco por Imunohistoquímica (cm ²) nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 125 |
| Anexo 18 Valores da citocina TNF em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina. | 126 |
| Anexo 19 Valores da citocina TNF em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 126 |
| Anexo 20 Valores da citocina IL-12 p40 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina. | 127 |
| Anexo 21 Valores da citocina IL-12 p40 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 127 |
| Anexo 22 Valores da citocina IL-10 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina. | 128 |
| Anexo 23 Valores da citocina IL-10 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 128 |
| Anexo 24 Valores da citocina IFN-γ em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina. | 129 |
| Anexo 25 Valores da citocina IFN-γ em pg/mL e pg/mL/g dos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina. | 129 |

LISTA DE ABREVIATURAS

DC - Doença de Chagas

T.cruzi - *Trypanosoma cruzi*

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde

CD – Agrupamento de diferenciação

Th – Linfócitos T auxiliar

IL-12 – Interleucina 12

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral - alfa

IFN- γ – Interferon - gama

NK – Células Natural killer

NO – Óxido Nítrico

IL-10 – Interleucina 10

Tregs – Células T reguladoras

TGF- β – Fator de Crescimento de Transformação beta

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

IL-4 – Interleucina 4

mm – milímetros

μg – microgramas

mL – mililitros

mm^3 – milímetros cúbicos

μL – microlitros

40X – aumento microscópico de 40 vezes

VCM = Volume Corpuscular Médio

HCM = Hemoglobina Corpuscular Média

RDW = Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos

μm – micrômetros

μm^2 – micrômetros quadrados

EPR – Erro Padrão Relativo

Vv - Relação do número de pontos pertencentes ao infiltrado inflamatório e o número de pontos total.

n – Número de pontos a serem utilizados

Pp = Pontos pertencentes ao infiltrado inflamatório

Pt = Pontos totais na grade de pontos

PBS – Solução de Salina Tamponada com Fosfato

cm² – centímetros quadrados

pg – picogramas

g - gramas

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

M – molar

pH – Potencial Hidrogeniônico

PBS-T – Solução de Salina Tamponada com Fosfato + detergente Tween

TMB – Solução de Tetrametil-benzidina

H₂O₂ – Água Oxigenada

nm – nanômetros

EPM – Erro Padrão da Média

p – valor de significância

fL – fentolitros

g/dL – gramas por decilitro

pg – picogramas

Rho – Coeficiente de Determinação

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RANTES – Regulação mediante Ativação Normal de Células T Expressadas e Secretadas

MCP-1 - Proteína quimiotática de macrófagos-1

MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa

IgE – Imunoglobulina E

Fc ϵ RI – Receptor de alta afinidade para IgE

LTB₄ – Leucotrieno B₄

NF κ B – Fator nuclear kappa B

NFAT – Fator Nuclear de células T ativadas

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------|------|
| DEDICATÓRIA..... | iii |
| AGRADECIMENTOS | v |
| APOIO FINANCEIRO | vii |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE ANEXOS | xix |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xxii |
| SUMÁRIO..... | xxv |
| 1.- INTRODUÇÃO | 29 |
| 1.1 Doença de Chagas | 30 |
| 1.1.1 Aspectos Gerais | 30 |
| 1.1.2 Ciclo biológico..... | 31 |
| 1.1.3 Epidemiologia | 32 |
| 1.1.4 Fases da doença | 33 |
| 1.1.5 Fisiopatologia..... | 34 |
| 1.1.6 Resposta imunológica..... | 35 |
| 1.1.7 Tratamento | 38 |
| 1.2- Lectinas | 39 |
| 1.2.1- Aspectos gerais | 39 |
| 1.2.2- Lectina <i>ArtimM</i> | 40 |
| 2.- HIPÓTESE | 43 |
| 3.- OBJETIVOS | 45 |
| 3.1.-Objetivo geral..... | 46 |
| 3.2.-Objetivos específicos | 46 |
| 4.- MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.1.- Protocolo do CEUA..... | 48 |
| 4.2.- Animais..... | 48 |
| 4.3.- Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 48 |
| 4.4.- Lectina <i>ArtimM</i> | 49 |
| 4.5.- Desenho experimental..... | 49 |
| 4.6.- Exame parasitológico..... | 50 |
| 4.7.- Eutanásia..... | 51 |
| 4.8.- Necropsia..... | 51 |
| 4.9.- Hemograma e Contagem de Reticulócitos | 52 |
| 4.10.- Preparo do coração para cortes histológicos..... | 53 |
| 4.11.- Análise Morfométrica | 54 |
| 4.12.- Imunohistoquímica..... | 59 |
| 4.13.- Dosagem das citocinas..... | 62 |
| 4.14.- Análise estatística..... | 63 |
| 4.15 - Normas Adotadas..... | 63 |
| 5.-RESULTADOS..... | 64 |
| 5.1.-Parasitemia..... | 65 |
| 5.2.- Hemograma e contagem de Reticulócitos | 69 |
| 5.2.1.- Hemácias..... | 69 |
| 5.2.2.- Hematócrito | 70 |
| 5.2.3.- Volume Corpuscular Médio (VCM) | 71 |
| 5.2.4.- Hemoglobina | 72 |
| 5.2.5.- Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) | 73 |
| 5.2.6.- Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW) | 74 |
| 5.2.7.- Reticulócitos | 75 |
| 5.2.8.- Plaquetas..... | 76 |
| 5.2.9.- Leucócitos Totais..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.10.- Neutrófilos/mm ³ | 78 |
| 5.2.11.- Linfócitos/mm ³ | 79 |
| 5.2.12.- Monócitos/mm ³ | 80 |
| 5.3.- Porcentagem da área de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco | 81 |
| 5.4.- Quantificação dos ninhos de <i>T.cruzi</i> no tecido cardíaco por imunohistoquímica | 82 |
| 5.5.- Correlação do número de ninhos de <i>T.cruzi</i> no tecido cardíaco com o infiltrado inflamatório. | 84 |
| 5.6.- Quantificação das citocinas | 85 |
| 5.6.1.- Quantificação de TNF..... | 85 |
| 5.6.2.- Quantificação de IL-12 p40..... | 87 |
| 5.6.3.- Quantificação de IL-10..... | 89 |
| 5.6.4.- Quantificação de IFN-γ | 91 |
| 6.-DISCUSSÃO | 93 |
| 7.-CONCLUSÃO | 104 |
| 8.-REFERÊNCIAS..... | 106 |
| 8.-ANEXOS | 119 |

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

1.- INTRODUÇÃO

1 1.1 Doença de Chagas

2

3 1.1.1 Aspectos Gerais

4

5 A Doença de Chagas (DC), descoberta por Carlos Chagas no dia 14 de abril
6 de 1909 (CHAGAS,1909), é alvo de muitos estudos realizados por inúmeros
7 pesquisadores no mundo inteiro que buscam compreender os mecanismos que
8 controlam a interação entre o parasita e a célula, os efeitos patológicos e a influência
9 de fatores genéticos ligados ao hospedeiro e ao parasito, a resposta imune, o
10 diagnóstico e controle da doença. A infecção em humanos acomete populações
11 pobres, sem condições de habitação que favorecem o contato entre o inseto
12 transmissor e o homem (LANA; TAFURI, 2003).

13 A DC, também conhecida como Tripanosomíase Americana, é uma
14 antroponose causada através da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*
15 (*T. cruzi*), que é um membro da família *Trypanosomatidae* da ordem *Kinetoplastida*,
16 que se desenvolve em insetos hematófagos da família *Reduviidae*, em pequenos
17 mamíferos de vida silvestre e em humanos. (CHAGAS, 1909).

18 O *T.cruzi* apresenta diferentes ciclos evolutivos onde circula entre animais e
19 triatomíneos silvestres, caracterizando o ciclo silvestre. Quando animais domésticos
20 e vetores peridomiciliares permutam o parasito com animais e vetores silvestres,
21 temos o ciclo peridoméstico; e por fim o ciclo doméstico, no qual o parasito circula
22 entre vetores e os habitantes domiciliares. (COUTINHO, DIAS, 1999)

23 A DC constitui um dos principais problemas médico-sociais brasileiros e um
24 grave problema de saúde pública na América Latina. Uma estimativa da
25 Organização Mundial de Saúde (OMS) indica uma prevalência da infecção pelo *T*

1 *cruzi* em torno de 13 milhões de pessoas em 15 países, com incidência anual de
2 200.000 casos. No Brasil, estima-se em 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com
3 prevalência atual da infecção inferior a 0,2%. (WHO, 2000, 2002; DIAS, 2006).

4

5 **1.1.2 Ciclo biológico**

6

7 O *T.cruzi* realiza o seu ciclo biológico nos hospedeiros vertebrados e
8 invertebrados através de várias formas evolutivas. As formas amastigotas,
9 epimastigotas e tripomastigotas do parasito interagem com células do hospedeiro
10 vertebrado e apenas as epimastigotas não são capazes de nelas se desenvolver e
11 multiplicar. Considerando o mecanismo natural de infecção pelo *T. cruzi*, os
12 tripomastigotas eliminados nas fezes e urina do vetor, penetram pelo local da picada
13 e interagem com células do sistema fagocitário mononuclear – macrófagos - da pele
14 ou mucosas. Neste local, ocorre a diferenciação dos tripomastigotas em
15 amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples. Em seguida as
16 formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas pela célula
17 do hospedeiro, caem na corrente circulatória e atingem outras células de qualquer
18 órgão ou tecido para cumprir novo ciclo celular ou são destruídas por mecanismos
19 imunológicos do hospedeiro. Os triatomíneos vetores se infectam ao ingerir as
20 formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado
21 durante o hematofagismo. No estômago do inseto eles se diferenciam em formas
22 epimastigotas. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão
23 binária simples, sendo, portanto, responsável pela manutenção da infecção no vetor.
24 No reto, porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em

1 tripomastigotas metacíclicas (infectantes para os vertebrados), sendo eliminados nas
2 fezes ou urina (DE SOUSA, 2002; LANA, TAFURI, 2003).

3 O mecanismo de transmissão da infecção chagásica ocorre através dos
4 vetores (triatomídeos) e é considerado como primário, onde o indivíduo contamina-
5 se pelo contato das dejeções do inseto infectado com as mucosas ou pele. Além
6 desta forma de infecção, existe também o contágio através da transfusão de sangue,
7 via oral (alimentos contaminados) e via transplacentária ou no canal do parto. Já
8 mecanismos secundários ocorrem por acidentes de laboratório, manejo de animais
9 infectados, transplante de órgãos e até mesmo por vetores que não os triatomídeos
10 (COURA, 2002, REZENDE, 1981; PRATA, 1990; KIRCHHOFF, 2006, DIAS, 2002;
11 LOPES *et al.*, 2000).

12

13 **1.1.3 Epidemiologia**

14

15 A Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) estima que 7,7 milhões de
16 pessoas apresentam infecção por *T.cruzi* em 21 países endêmicos, sendo o total da
17 população de 532 milhões. Conforme dados da PAHO, os países mais afetados pela
18 DC são: Bolívia (6,8%); Argentina (4,1%); El Salvador (3,4%); Honduras (3,1%);
19 Paraguai (2,5%); Guatemala (2%); Equador (1,7%); Venezuela (1,2%); Nicarágua
20 (1,1%); Brasil (1%) e México (1%) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD,
21 2006). Ocorrem aproximadamente 20 mil mortes por ano atribuídas à DC,
22 tipicamente causadas por miocardites e em menor frequência por
23 meningoencefalopatia. A mortalidade é primeiramente atribuída aos distúrbios
24 cardíacos e insuficiência cárdio-congestiva que resultam da inflamação crônica dos
25 cardiomiócitos (KIRCHHOFF, *et al.*, 2004).

1 **1.1.4 Fases da doença**

2

3 A DC se desenvolve em duas fases distintas: aguda com duração de
4 aproximadamente 60 dias e crônica com duração indeterminada. A fase aguda pode
5 apresentar-se assintomática ou com uma sintomatologia própria, caracterizada por
6 sinal de porta de entrada (sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação), febre,
7 sinais de insuficiência cardíaca, edema de face e de membros inferiores,
8 enfartamento ganglionar e hapatoesplenomegalia, além da elevada parasitemia
9 circulante (REZENDE *et al.*, 1981), que tendem a resolver espontaneamente com 3
10 a 8 semanas. A evolução desta fase da doença irá culminar na fase crônica onde é
11 difícil a observação do protozoário no sangue circulante, mas é possível verificar na
12 intimidade dos tecidos. Em um primeiro momento na fase crônica, o indivíduo pode
13 não apresentar sinais e sintomas clínicos, o que caracteriza a forma indeterminada
14 da DC. Porém, há outras pessoas que durante a fase crônica podem manifestar
15 sintomas e estes irão determinar formas anátomo-clínicas distintas, que são:
16 Cardíaca, Digestiva, Mista (cardíaca e digestiva), Nervosa e nas últimas décadas, a
17 reativação da DC (PRATA *et al.*, 1990; LOPES *et al.*, 2000). Na fase crônica cerca
18 de 20% a 30% dos pacientes infectados evoluem para a forma clínica cardíaca ou
19 digestiva em até 30 anos, além disso, cerca de 20% a 25% dos infectados
20 apresentam progressivo dano cardíaco resultante da destruição maciça de
21 cardiomiócitos e do sistema condutor, a cardiomiopatia chagásica crônica (CUNHA-
22 NETO *et al.*, 1995; LOPES *et al.*, 2000).

23

24

1 1.1.5 Fisiopatologia

2

3 Durante a fase aguda, a lesão inflamatória causada pelo *T.cruzi* está
4 relacionada com a presença das distintas formas do parasito no interstício,
5 acarretando uma inflamação aguda de início focal podendo se tornar difusa. Esta
6 inflamação será caracterizada por edema intersticial, hiperplasia reativa de nódulos
7 linfáticos e infiltrado mononuclear. O parasitismo nessa fase é intenso, podendo ser
8 encontrado no tubo digestivo, produzindo lesão do sistema nervoso intramural, além
9 de células musculares, fibroblastos, células gliais e raramente nos neurônios do
10 sistema nervoso. A miocardite aguda é encontrada em biópsia e necropsia de
11 pacientes com DC na fase aguda, abrangendo até mesmo os pacientes que não
12 apresentavam outro comprometimento cardíaco (PARADA *et al.*, 1997).

13 Na fase crônica, os baixos níveis de parasitos nos tecidos afetados são
14 responsáveis por provocar uma resposta inflamatória crônica levando à uma
15 disfunção do órgão. Estudos do cólon e esôfago de pacientes com a forma digestiva
16 da DC demonstram dilatação e hipertrofia muscular. Há também lesões causadas
17 por processo inflamatório focal, redução no número de neurônios do plexo
18 mioentérico, fibrose periganglionar e intraganglionar acompanhada de proliferação
19 de células de Schwann (KIRCHHOFF *et al.*, 1996; LOPES *et al.*, 2000). A forma
20 cardíaca é a mais grave e importante manifestação clínica da doença, caracteriza-se
21 por palpitações (taquicardia) e batimentos cardíacos fora de ritmo (extra-sístoles e
22 arritmias), tonteiras, dor no peito, falta de ar em esforços físicos, insuficiência
23 cardíaca progressiva (DAVILA, 2002).

24

1 **1.1.6 Resposta imunológica**

2

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

1 ANTÚNEZ *et al.* (2000) realizaram um estudo com a cepa “Tulahuén”,
2 classificada como tipo 1, em camundongos BALB/c com inóculo de 150 formas
3 tripomastigotas sanguíneas na fase aguda. Com este estudo demonstraram porque
4 o nível da citocina IL-12 p40 apresentou um pico no terceiro dia de infecção,
5 decrescendo até o sétimo dia, permanecendo estacionado até o décimo quarto dia e
6 no vigésimo primeiro dia o nível foi o mais baixo. Já os níveis de INF- γ no sétimo dia
7 de infecção apresentaram valores muito baixos atingindo o valor máximo no décimo
8 quarto dia e, posteriormente, decaindo para o menor valor no vigésimo primeiro dia
9 de infecção. Estes autores, ao verificarem a parasitemia e os níveis de IL-12 e INF- γ
10 nos camundongos C3H e BALB/c, inferiram que BALB/c apresentaram resposta do
11 tipo Th1 mais tardia. Além disso, foi verificada a atividade das células NK em ambas
12 as linhagens durante a fase aguda, demonstrando que a produção tardia de INF- γ
13 está relacionada com a menor atividade das células NK nos BALB/c. A baixa
14 citotoxicidade das células NK também pode estar relacionada com a baixa produção
15 de IL-12 na linhagem BALB/c. Na infecção aguda pelo *T.cruzi* há o predomínio de
16 uma progressiva e intensa supressão da resposta linfoproliferativa causada por
17 ativadores policlonais e de antígenos dos parasitos (CUROTTO-DE-LAFAILLE,
18 1990). Vários mecanismos supressores podem afetar a proliferação linfocítica que
19 estão relacionados com o bloqueio da síntese de NO e com a neutralização de INF- γ
20 e/ou TNF- α (ABRAHAMSOHN, 1995). O padrão de resposta imune do tipo Th1 foi
21 caracterizado por produção de IL-12 a qual ativa as células NK e TCD8+, além do
22 estímulo de síntese de INF- γ , com o intuito de aumentar a atividade microbida dos
23 macrófagos. Como na infecção por *T.cruzi* há uma dependência da resposta imune
24 mediada por célula com produção de INF- γ para ativar a produção de NO nos
25 macrófagos, a resposta imune do tipo Th1 é essencial no combate do parasito. A

1 citocina IL-10 apresenta funções imunossupressoras que podem alterar a regulação
2 dos macrófagos e conseqüentemente a produção de IFN- γ e NO. A incapacidade de
3 controlar completamente a infecção pelo *T.cruzi* pode estar relacionada com a
4 alteração do mecanismo regulador do sistema imune, o qual envolve células TCD4+
5 CD25+ reguladoras (Tregs), representando cerca de 5-10% de todas as células
6 TCD4+ em camundongos adultos (MARIANO *et al.*, 2008). A persistência do
7 parasito está relacionada com a população de Tregs, as quais são importantes na
8 proteção contra a reação inflamatória crônica por suprimir a resposta imune
9 (BELKAID, 2007).

10 Na infecção aguda experimental pelo *T.cruzi* estudada por MARIANO *et al.*
11 (2008), foi verificado que a inibição de células Tregs acarretava o aumento da
12 mortalidade e induzia à miocardite, além de ocasionar uma significativa redução nos
13 níveis de IL-10, IFN- γ , IL-12 e TGF- β após 10 dias de infecção. Na fase crônica da
14 DC, em humanos, os níveis de IL-10 e IFN- γ apresentam diferença significativa entre
15 os grupos da forma indeterminada e cardíaca. O grupo que apresentou a forma
16 cardíaca mostrou um significativo aumento na secreção de IFN- γ do que o grupo da
17 forma indeterminada, além dos baixos níveis de IL-10 que foram similares em todos
18 os grupos de pacientes com problemas cardíacos. Já na forma indeterminada existe
19 uma correlação inversa devido à alta produção de IL-10 e pela baixa produção de
20 IFN- γ . GOMES *et al.* (2003) demonstraram a relação entre a produção de IFN- γ e o
21 desenvolvimento de patologias cardíacas, mostrando que o aumento do nível de
22 IFN- γ é paralelo ao grau da gravidade do envolvimento cardíaco.

23

24

25

1 1.1.7 Tratamento

2

3 Após várias décadas da descoberta da DC, vários aspectos relacionados ao
4 tratamento ainda apresentam-se complexos devido à baixa eficácia e elevada
5 toxicidade dos agentes quimioterápicos que são indicados para o tratamento da
6 doença, além dos efeitos colaterais adversos que requerem supervisão médica. Os
7 únicos medicamentos aprovados para tratamento da DC são o Benzonidazol e o
8 Nifurtimox (RAETHER, HANEL, 2003).

9 Estudos realizados por DOYLE *et al.* (2007) em camundongos
10 imunodeficientes infectados com *T. cruzi*, após tratamento com dipeptídeo inibidor
11 de cisteína protease, obtiveram resultados onde se verificaram o aumento da
12 sobrevida, negatividade do PCR e exame histopatológico normal dos animais
13 tratados.

14 ALBUQUERQUE *et al.* (1999), demonstraram que animais imunizados e
15 estimulados com jacalina apresentaram elevados títulos de anticorpos, além de
16 mostrarem uma ação protetora com anticorpos específicos na infecção aguda por
17 levar à uma queda significativa na parasitemia.

18 Alguns ensaios que visam à descoberta de vacinas contra o *T. cruzi*,
19 verificaram o efeito positivo do uso de diferentes cepas de epimastigotas de
20 *Trypanosoma rangeli* contra a infecção pelo *T. cruzi*. Em camundongos BALB/c
21 vacinados foram observados baixos níveis de parasitemia, melhora na sobrevida e
22 moderado infiltrado inflamatório no estudo histológico do coração e músculo
23 esquelético enquanto nos animais não vacinados foram encontradas intensas áreas
24 com infiltrado inflamatório (BASSO *et al.*, 2008).

1 1.2- Lectinas

2

3 1.2.1- Aspectos gerais

4

5 As lectinas podem ser encontradas no reino vegetal, animal e nos
6 microrganismos. Nas plantas são detectadas principalmente nos cotilédones e
7 endosperma das sementes e constituem de 2 a 10% de toda proteína. No reino
8 animal são encontradas em invertebrados, caranguejos, camarões, caracóis,
9 minhocas e moluscos (DIAZ *et al.*, 1999). Em 1888, STILLMARK realizou o primeiro
10 estudo utilizando lectinas e descreveu fenômenos de hemaglutinação com extratos
11 de sementes de *Ricinus communis*. Em 1919, a primeira lectina obtida em forma
12 cristalina foi a concanavalina A do feijão (*Canavalia ensiformis*). De acordo com
13 GOLDSTEIN (1980), as lectinas são proteínas ou glicoproteínas ligantes de açúcar,
14 que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. Elas reconhecem a porção
15 carboidrato de componentes da superfície de diferentes organismos, ou de
16 diferentes órgãos e tecidos de um mesmo organismo (BARONDES, 1988; SHARON,
17 LIS, 1989). As lectinas podem ser classificadas de acordo com a seqüência de
18 aminoácidos do domínio de reconhecimento de carboidratos, a natureza dos ligantes
19 carboidratos e a dependência de cátions divalentes para ligação (DRICKAMER;
20 TAYLOR,1993). A interação das lectinas com carboidratos tem sido estudada em
21 diversos contextos, como por exemplo, na relação parasita-hospedeiro, nos
22 transplantes de órgãos, no processo neoplásico, na inflamação, em doenças
23 degenerativas, dentre outras (ROQUE BARREIRA *et al.*, 2006). As interações
24 estabelecidas pelas lectinas estão envolvidas no desencadeamento de fenômenos
25 biológicos diversos como endocitose, translocação intracelular de glicoproteínas,

1 regulação de migração, adesão celular, reconhecimento de determinantes da
2 fagocitose não imune e na ligação de bactérias às células epiteliais (OFEK *et al.*,
3 1977; SHARON, LIS, 1993).

4

5 **1.2.2- Lectina *ArtimM***

6

7 A presença de lectina no extrato bruto de sementes de jaca, *Artocarpus*
8 *integrifolia*, aglutina hemácias de diferentes espécies animais (MOREIRA, AINOZ,
9 1978; BRUNN-MORENO, CAMPOS-NETO, 1981). A purificação da jacalina e
10 utilização em ensaios biológicos (ROQUE-BARREIRA *et al.*, 1986), sugeriu que,
11 dentre as atividades desencadeadas pelo extrato bruto de sementes de jaca
12 (BRUNN-MORENO, CAMPOS-NETO, 1981; ROQUE-BARREIRA, CAMPOS-NETO,
13 1985), pelo menos uma - a atividade mitogênica sobre monócitos do sangue
14 periférico humano – não parecia ser atribuível à jacalina (ROQUE-BARREIRA *et al.*,
15 1986). Foi constatado que as atividades de proliferação de linfócitos T e de ativação
16 policlonal de linfócitos B, presentes no extrato bruto, eram mediadas por outra lectina
17 diferente da jacalina (MIRANDA-SANTOS *et al.*, 1991). Esta lectina, caracterizada
18 como uma proteína ligante de D-manose, foi denominada KM+. Atualmente, a lectina
19 KM+ apresenta uma nova nomenclatura, lectina *ArtimM*, que apresenta uma elevada
20 homologia com a jacalina, porém apresenta-se em baixa quantidade no extrato bruto
21 de jaca, 0,5% a 1% do total de proteína extraída (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2008).

22 A lectina *ArtimM* induz a atração de neutrófilos *in vivo* demonstrada pela
23 migração de dos mesmos no tecido conectivo da região perimuscular e na superfície
24 dos vasos (GANIKO, 1998). Ela ainda é dotada de importante propriedade
25 imunomoduladora, exercida pela indução da produção de interleucina-12 (IL-12) por

1 células apresentadoras de antígenos. A IL-12 é produzida por macrófagos e células
2 dendríticas e exerce papel central nas respostas imunes inata e adaptativa
3 (TRINCHIERI, 1995), ativando células NK e TCD8⁺ a produzirem IFN- γ , citocina que
4 age sinergicamente com TNF- α aumentando a atividade microbiciada de macrófagos.
5 Este padrão de resposta imune, com predominância de IFN- γ e ativação de células,
6 caracteriza-se como de tipo Th1, essencial na proteção contra patógenos
7 intracelulares (HSIEH *et al.*, 1993; SEDER *et al.*, 1993; MANETTI *et al.*, 1994;
8 MAGRAM *et al.*, 1996; MATTNER *et al.*, 1996).

9 A diferenciação das células Th0 em Th1 é capaz de conferir resistência à
10 infecção por patógenos intracelulares como *Leishmania major*, *Leishmania*
11 *amazonensis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001;
12 COLTRI *et al.*, 2008). A administração da lectina *ArtimM* em camundongos BALB/c
13 infectados com *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis* mudou o padrão de
14 secreção de citocinas de Th2 para Th1, conferindo proteção contra a infecção por
15 esse parasito, efeito este associado ao estímulo de diferenciação de células
16 dendríticas, favorecendo o desenvolvimento de resposta Th1 específica (PANUNTO-
17 CASTELO *et al.*, 2001; TEIXEIRA, *et al.*, 2006).

18 Alguns estudos têm mostrado que a utilização de drogas antiinflamatórias
19 contribui para a diminuição do infiltrado inflamatório e mesmo a diminuição
20 parasitária na fase aguda da DC (MICHELIN *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2010).
21 Foi demonstrado por SILVA, *et al.*, (2009) que existe um efeito modulatório referente
22 à expressão de citocinas inflamatórias aliado à redução dos níveis do infiltrado
23 inflamatório quando utilizado por via intra-peritoneal a lectina *ArtimM* na DC.

24 COLTRI *et al.* (2008), demonstraram que com a administração de lectina
25 *ArtinM* após 10 dias de infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*, houve uma

1 significativa queda na unidade de formação de colônias e poucos granulomas
2 formados quando comparado aos animais controle. Além disso, verificaram elevados
3 níveis de NO, IL-12, IFN- γ e TNF- α no homogenato do pulmão nos animais tratados
4 com *ArtinM*; já os animais não tratados apresentaram níveis aumentados de IL-10 e
5 IL-4.

6 Deste modo, tendo em vista o relevante papel imunomodulador exercido pela
7 lectina *ArtimM*, principalmente no direcionamento de respostas Th1 protetoras, e a
8 necessidade de novas intervenções terapêuticas para o tratamento da DC, este
9 trabalho visou estudar o papel de *ArtimM* no controle da DC experimental aguda.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

2.- HIPÓTESE

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12 A administração da lectina *ArtimM* em camundongos Balb/C leva à alterações na
13 parasitemia, hemograma, área do infiltrado inflamatório, ninhos de *T.cruzi* no
14 coração e citocinas durante a infecção experimental aguda por *T.cruzi*.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

3.- OBJETIVOS

26

1 **3.1.-Objetivo geral**

2

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

5

6 **3.2.-Objetivos específicos**

7

- 8 • Avaliar a parasitemia na fase aguda da infecção experimental por *T.cruzi* dos
9 animais tratados ou não pela lectina;
- 10 • Analisar o hemograma na fase aguda da infecção experimental por *T.cruzi*
11 dos animais tratados ou não pela lectina;
- 12 • Quantificar a porcentagem da área do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco
13 dos animais tratados ou não pela lectina;
- 14 • Quantificar o número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco dos animais
15 tratados ou não pela lectina;
- 16 • Quantificar as citocinas no plasma, homogeneizado do coração e baço dos
17 animais tratados ou não pela lectina.

18

19

20

21

22

23

24

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

4.- MATERIAL E MÉTODOS

1 **4.1.- Protocolo do CEUA**

2
3 O parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) está registrado
4 com o protocolo de número 157, aprovado no dia 01 de julho de 2010.

5 6 **4.2.- Animais**

7
8 Foram utilizados 20 camundongos machos, em duplicata, da linhagem BALB/c
9 com 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, mantidos no biotério da
10 Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em
11 Uberaba-MG. Os animais ficaram em sala especial, com renovação constante de ar,
12 à temperatura de 22 a 26°C e umidade entre 45 e 55%, expostos a um ciclo de luz
13 de 12 horas claro/escuro e alocados em gaiolas plásticas de 414mm x 344mm x
14 168mm. A alimentação foi com ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-
15 CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. – Curitiba – PR) e água
16 esterilizada oferecida *ad libitum*. A água e a maravalha passaram pelo processo de
17 esterilização antes de serem oferecidas aos animais. Todos os procedimentos
18 realizados estão em conformidade com as diretrizes da Sociedade Brasileira de
19 Ciências de Animais de Laboratório, antigo COBEA (MEZADRI, *et al.*, 2004;
20 ANDERSEN *et al.*, 2004; FRANCO, 2005).

21 22 **4.3.– Cepa de *Trypanosoma cruzi***

23
24 Para produzir a infecção nos animais pelo *Trypanosoma cruzi*, foi utilizada a cepa
25 “Colombiana”, MHOM/CO/00Colombiana (*T.cruzi* I) (ANDRADE; MAGALHÃES,

1 1997; ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000), que é mantida no biotério da Disciplina de
2 Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG.

4 4.4.- Lectina *ArtimM*

5
6 A lectina *ArtimM* foi purificada conforme descrito por SANTOS-DE-OLIVEIRA *et*
7 *al.* (1994) no Laboratório de Glicobiologia e Imunoquímica do Departamento de
8 Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de
9 Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. A amostra de lectina foi mantida em
10 freezer a -20°C, estando diluída a 0,5µg/100µl em solução fisiológica a 0,9%.

12 4.5.- Desenho experimental

13
14 Os 20 animais foram divididos em 4 grupos com número igual, conformando o
15 grupo controle com uso de solução salina a 0,9% (**Controle tratado com Salina**),
16 grupo controle com uso da lectina *ArtimM* (**Controle tratado com Lectina**), grupo
17 infectado com uso de solução salina a 0,9% (**Infectado tratado com Salina**) e grupo
18 infectado com uso da lectina *ArtimM* (**Infectado tratado com Lectina**). Foi utilizado
19 número igual de animais para repetir o experimento.

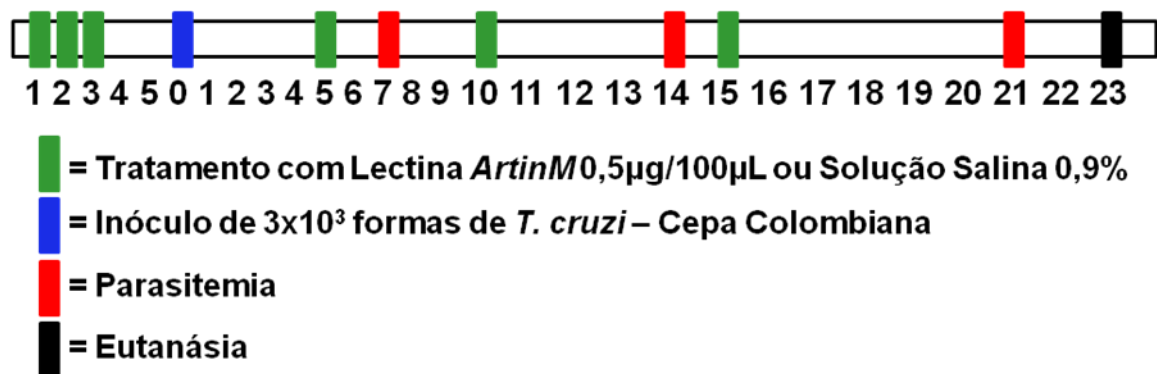
20 Para a infecção dos camundongos foi utilizada uma concentração de
21 parasitos de 3×10^3 tripomastigotas sanguíneos inoculados por via subcutânea. O
22 ajuste do inóculo foi realizado conforme o método de BRENER (1962).

23 Os animais dos grupos **Infectado tratado com Salina** e **Controle tratado**
24 **com Salina** receberam 100µl de solução salina a 0,9%. Nos grupos **Infectado**
25 **tratado com Lectina** e **Controle tratado com Lectina** foram administrados lectina

1 *ArtimM*, na concentração de 0,5µg/100µl de solução fisiológica a 0,9% para cada
 2 animal. Tanto a administração da solução salina a 0,9% quanto da lectina *ArtimM* foi
 3 por via intraperitoneal.

4 O esquema de tratamento, assim como a quantificação de parasitos no
 5 sangue foi realizado conforme descrito por SILVA, 2009 (Figura 1).

6



8 **Figura 1** Cronograma de atividades do experimento

9

10 4.6.- Exame parasitológico

11

12 A determinação do número de parasitos nos animais foi realizada no sétimo,
 13 décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção, conforme o protocolo abaixo:

- 14 a) Assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico a
 15 70%;
- 16 b) Massagem da cauda com gaze seca;
- 17 c) Corte da extremidade distal da cauda (2 mm) e coleta da terceira gota de
 18 sangue (5µl) sobre lâmina de vidro para microscopia;
- 19 d) A gota de sangue sobre a lâmina foi coberta com lamínula de 22x22mm;
- 20 e) Após a coleta do sangue, a extremidade da cauda foi pressionada para
 21 estancar o sangramento e em seguida os animais foram devolvidos às gaiolas;

- 1 f) O exame ao microscópio de luz comum foi feito com objetiva de 40X e
2 contados 50 campos. A área do campo microscópico foi calculada conforme descrito
3 por BRENER, 1962;
- 4 g) Foram confeccionadas 3 lâminas para análise parasitológica em cada animal,
5 considerando como resultado final a média destes resultados;
- 6 h) Os respectivos valores da parasitemia, expressos em número de parasitos/ml,
7 foram estruturados numa planilha e analisados estatisticamente.

8

9 **4.7.– Eutanásia**

10

11 Foram administrados por via intraperitoneal 400µL de heparina aos animais e
12 em seguida submetidos à eutanásia com o uso de gás carbônico. Após este
13 procedimento foi feita a sangria pelo plexo oftálmico para obter o sangue total que foi
14 utilizado para realização do Hemograma e contagem de Reticulócitos e,
15 posteriormente o plasma para a dosagem de citocinas conforme descrito nos itens
16 4.9 e 4.13 respectivamente. Por fim se procedeu à necropsia como descrito a seguir.

17

18 **4.8.– Necropsia**

19

20 Os animais foram submetidos à incisão mento-pubiana com subsequente
21 abertura das cavidades torácica e abdominal. Neste momento foram retirados o
22 coração para análise, processamento histológico e dosagem de citocinas como
23 descrito nos itens 4.10 e 4.13, o baço para dosagem de citocinas, intestino, pulmão,
24 rim, pâncreas e fígado para análises posteriores. Após a necropsia as carcaças

1 foram colocadas em formol a 10% por no mínimo 48 horas, para posteriormente ser
2 descartadas em lixo hospitalar (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2000).

3

4 **4.9.– Hemograma e Contagem de Reticulócitos**

5

6 Após coletado o sangue, aliquotou-se 100 µL de sangue total em um tubo
7 com 5µL de EDTA 10% e em seguida realizada a leitura em hemocitômetro (ABX
8 MICROS 60 – Horiba ABX Diagnostics – França). O aparelho realizou a leitura dos
9 seguintes parâmetros hematológicos: Hemácias, Hematócrito, Volume Corpuscular
10 Médio (VCM), Hemoglobina, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Amplitude de
11 Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW) e Leucócitos totais. O resultado
12 corresponde à média de duas leituras da mesma amostra e os dados coletados
13 foram transferidos a uma planilha eletrônica e analisados estatisticamente. Em
14 seguida foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para contagem
15 manual de Plaquetas e Diferencial de Leucócitos e coradas por Panótico (*NewProv -*
16 *Produtos para Laboratório LTDA – Brasil*). Posteriormente incubou-se 15µL do
17 sangue total com 15µL do corante Azul de Cresil Brilhante (*Laborclin – Produtos*
18 *para Laboratório LTDA – Brasil*) à 37°C por 20 minutos para realização da lâmina
19 para contagem de Reticulócitos. As lâminas assim coradas foram lidas em
20 microscópio de luz (*Leica Dia Star - 420*) com objetiva de 100X. Os resultados foram
21 expressos em número de Reticulócitos/mm³, conforme descrito por OLIVEIRA, *et al.*,
22 2007.

23

24

1 **4.10.- Preparo do coração para cortes histológicos**

2

3 Foi realizado um corte transversal ao eixo maior do ventrículo através de um
4 instrumento contendo divisões com largura de 1mm, o qual permitiu obter um corte
5 de 2mm de espessura que correspondeu ao primeiro terço, que foi conservado em
6 freezer a -70°C para análise das citocinas. Os dois terços restantes do tecido
7 cardíaco foi acondicionado em methacarn durante 30 minutos e depois armazenado
8 em álcool 70%. Posteriormente, o coração foi submetido aos processos de
9 desidratação em uma série crescente de álcool etílico, diafanização em xilol e
10 inclusão em parafina para microtomia. A inclusão de cada fragmento foi feita pelo
11 posicionamento do plano obtido pelo corte transversal ao eixo maior do ventrículo,
12 com o plano longitudinal de microtomia. Os blocos de parafina com os fragmentos de
13 coração foram cortados em micrótomo rotativo (Spencer “820” AO), obtendo-se
14 cortes com seis micrômetros (μm) de espessura, montados em lâminas de vidro
15 para microscopia, previamente tratadas com adesivo (Silano). Foram obtidos cortes
16 seriados de 6 μm de espessura depositando-se um corte a cada intervalo de 60 μm
17 na mesma lâmina, repetindo o ciclo até completar 16 lâminas (Figura 2). Os cortes
18 após secagem em estufa a 60°C, por um período de 24 horas, foram corados pelos
19 métodos de Hematoxilina / Eosina (STEVENS, 1982).

20

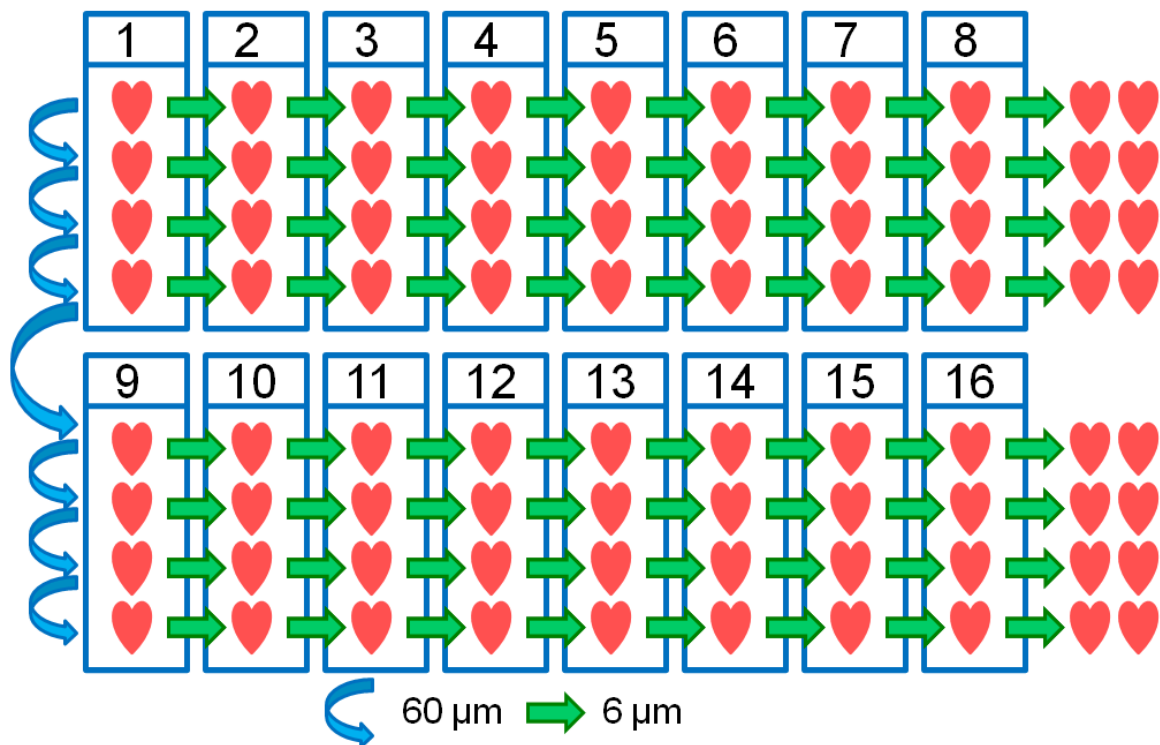
21

22

23

24

25



1

2 **Figura 2** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de
 3 microscopia. Os cortes de 6 μ m de espessura foram distribuídos em 16 lâminas, sendo quatro cortes
 4 em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60 μ m. Para análise da área do
 5 infiltrado inflamatório foram utilizados dois cortes com distância de 120 μ m. Para análise da área de
 6 ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados um corte de cada lâmina de animal
 7 infectado.

8

9 **4.11.- Análise Morfométrica**

10

11 **4.11.1.- Captura das imagens microscópicas**

12

13 Para análise morfométrica foram utilizadas as lâminas como indicado no item
 14 4.10. As imagens para análise do infiltrado infamatório e quantificação do número de
 15 ninhos de *T.cruzi* foram capturadas utilizando uma câmara de vídeo digital (Evolution
 16 MP 5.0 – color – Media Cibernetica) acoplada a um microscópio de luz (Nikon –
 17 Eclipse 50i) que envia as imagens para um computador. As imagens foram
 18 capturadas com o programa “Image – Pro Plus” (MediaCybernetics) e gravadas para
 19 posterior utilização do programa de análise de imagem “ImageJ”

1 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O tamanho das imagens capturadas foi de 2560 x 1920
2 pixels. Estas imagens foram calibradas através de uma lâmina (Leica) com régua
3 graduada em dois milímetros divididos em unidades de 0,01mm (dez micrômetros)
4 para a objetiva de dez, vinte e quarenta vezes.

5

6 **4.11.2.- Porcentagem da área do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco**

7

8 Para a quantificação do infiltrado inflamatório cardíaco foram utilizadas
9 lâminas coradas com Hematoxilina / Eosina e capturadas imagens microscópicas
10 com objetiva de 20X conforme o item 4.11.1. Foram utilizadas no total 18 imagens
11 distribuídas em igual número na região do ventrículo direito e esquerdo (Figura 4) de
12 cada animal. Cada imagem media 724,45 x 543,34 μm tendo uma área de
13 393.622,66 μm^2 . Cada imagem foi quadriculada com uma distância de 144,325 μm no
14 eixo X e 107,536 μm no eixo Y que corresponde a uma área de 15.520,133 μm^2 .
15 Foram escolhidos aleatoriamente, como demonstrado na figura 4, um total de 200
16 áreas nas 18 imagens. Cada área apresentava uma grade de 100 pontos e cada
17 ponto tinha uma área de 155,2 μm^2 , analisando-se no total 20.000 pontos. Para
18 calcular a porcentagem de área com infiltrado inflamatório no coração foi
19 contabilizado o ponto que atingisse a área que acometia miocélulas cardíacas. Não
20 foram contabilizados os pontos que atingiram áreas em branco. Ao final foi feita a
21 relação da somatória de todos os pontos que atingiram os infiltrados inflamatórios
22 para o total de pontos de tecidos multiplicado por 100 (Figura 5).

23 A quantidade de pontos que foram verificados foi determinada pela fórmula de
24 HALLY (1964), (Figura 3). Foram utilizados os critérios histopatológicos de "Dallas"
25 para definir a miocardite (ARETZ, 1987).

1

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

Pp= número de pontos que atingem o infiltrado inflamatório

Pt= número de pontos teste

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

2

3 **Figura 3** - Fórmula para determinar a quantidade de imagens e pontos a serem contados para
 4 possibilitar a quantificação do volume de infiltrado inflamatório nos ventrículos. O erro padrão relativo
 5 (EPR) deve ser menor ou igual a 5% (0,05). O Vv foi determinado pela relação entre o número de
 6 pontos pertencentes ao infiltrado inflamatório e o número de pontos teste. Com o valor de Vv obtém-
 7 se o n, sendo este utilizado para determinar o n (corrigido), o qual representa o número total de
 8 pontos a serem utilizados no coração.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

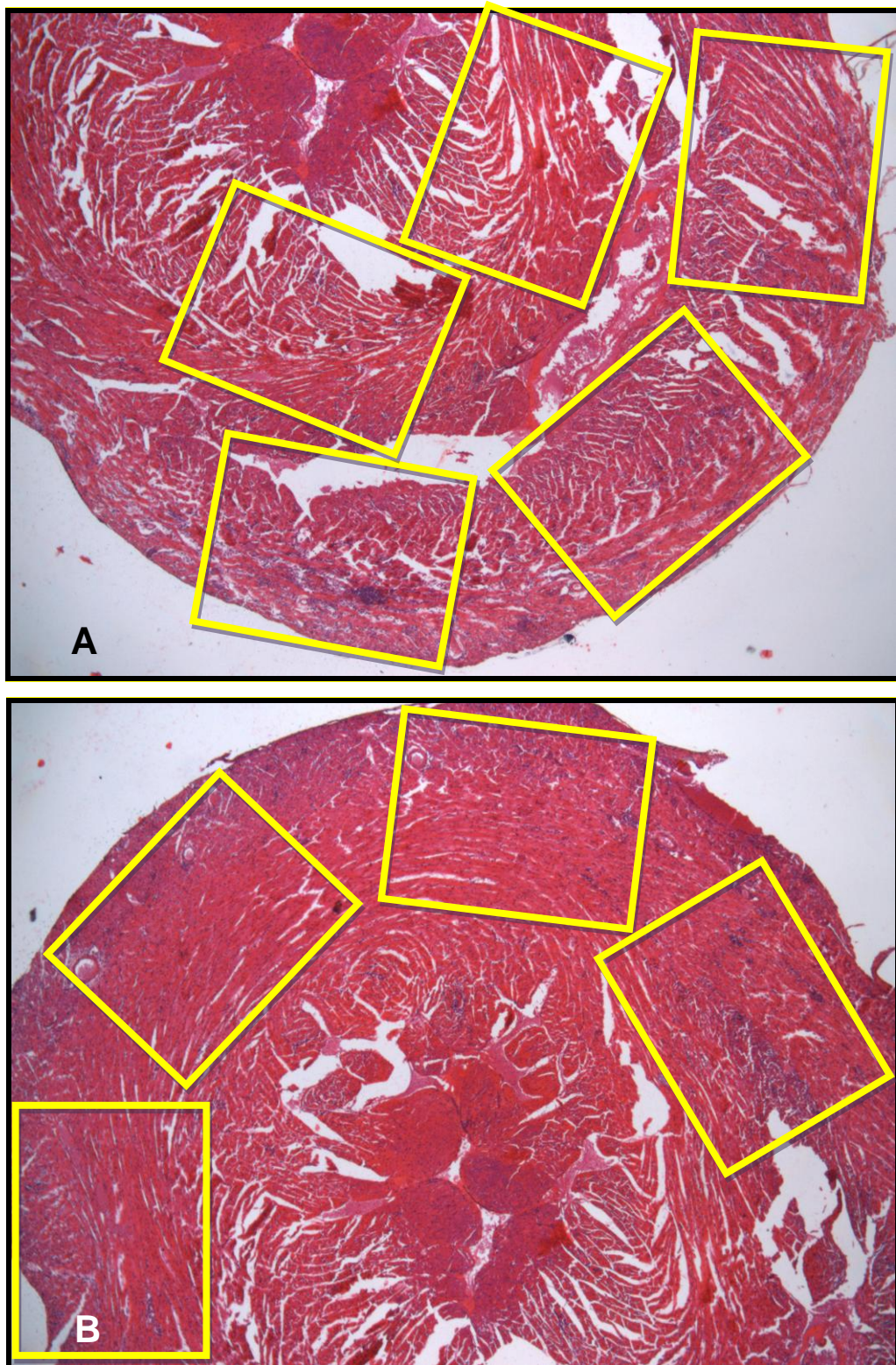


Figura 4 Região representativa da área utilizada, em objetiva de 4X, para fazer a captura das imagens com objetiva de 20X para posterior análise do volume de infiltrado inflamatório. No quadro A e B, a região demarcada em amarelo corresponde ao local que foram realizadas as capturas microscópicas no ventrículo esquerdo, direito e septo.

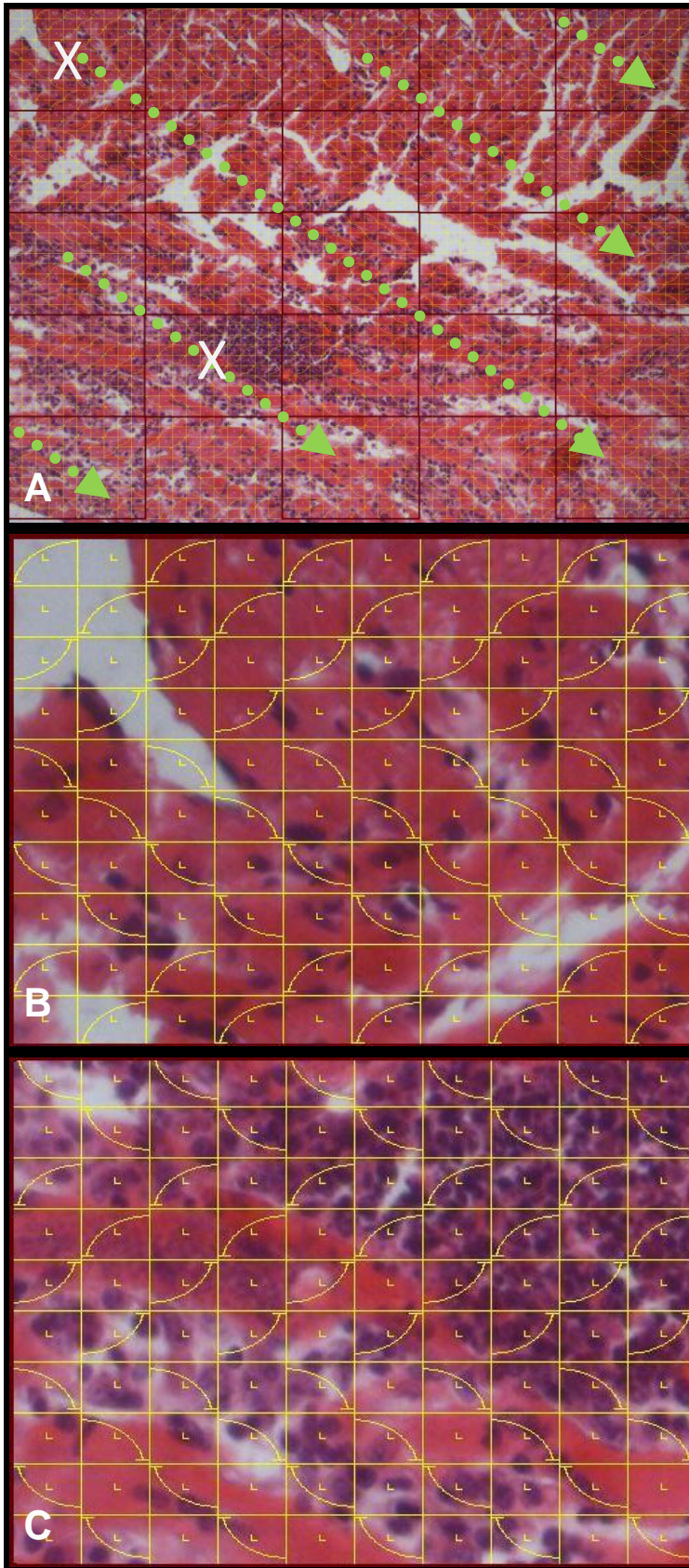


Figura 5 Quantificação do infiltrado inflamatório através da grade de pontos com área pré-determinada. Em **A**, observa-se a imagem capturada na objetiva de 20X e quadriculada em 25 áreas. A análise das áreas foi feita no sentido das linhas pontilhadas. Em **B**, mostra-se a primeira área marcada com a letra **X** em maior aumento, onde 11 pontos amarelos recaíram sobre área branca sendo considerado como tecido 89 pontos. Em **C** mostra a outra área marcada com a letra **X**, onde 86 pontos em amarelo recaem na área com infiltrados inflamatórios, considerando como tecido 14 pontos.

1 **4.12.- Imunohistoquímica**

2

3 A imunohistoquímica para a detecção de ninhos de *T.cruzi* foi realizada nos
4 cortes do coração dos camundongos infectados, obtidos conforme o item 4.10. Cada
5 lâmina passou por processos de desparafinização, hidratação e lavagem. Após o
6 bloqueio da peroxidase endógena, das ligações inespecíficas e a recuperação
7 antigênica, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi*
8 produzido em coelho (diluição 1:250), durante 2 horas à temperatura ambiente.
9 Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com a proteína A
10 conjugada com peroxidase (1:100) e reveladas com DAB-diaminobenzidina, em
11 tampão Tris-HCl pH 7,4. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina e as
12 lâminas montadas com *Entellan* para análise em microscópio de luz comum.

13

14 **4.12.1.- Quantificação do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco**

15

16 Para a quantificação do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco foram
17 utilizadas lâminas conforme descrito no item 4.12 e capturadas imagens no
18 microscópio com objetiva de 10X conforme o item 4.11.1. Foram utilizadas no total 6
19 imagens distribuídas em igual número na região do ventrículo direito e esquerdo de
20 cada animal. Cada imagem media 1438,0 x 1078,5µm tendo uma área de
21 1550883,0µm². Para calcular o número de ninhos de amastigotas de *T.cruzi* foi
22 utilizado o programa de análise de imagem “ImageJ” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e
23 cada imagem foi tratada com o comando “Color Threshold” na qual permite isolar a
24 cor marrom dos ninhos procedendo-se à contagem automática e em seguida
25 completou-se a área do tecido cardíaco realizando-se o cálculo da área em

1 micrômetros quadrados (Figura 6). O resultado foi expresso pela relação da
2 somatória do número de ninhos das 6 imagens pela somatória de tecido cardíaco. A
3 área do tecido cardíaco em micrômetros quadrados foi convertida a centímetros
4 quadrados (cm²).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

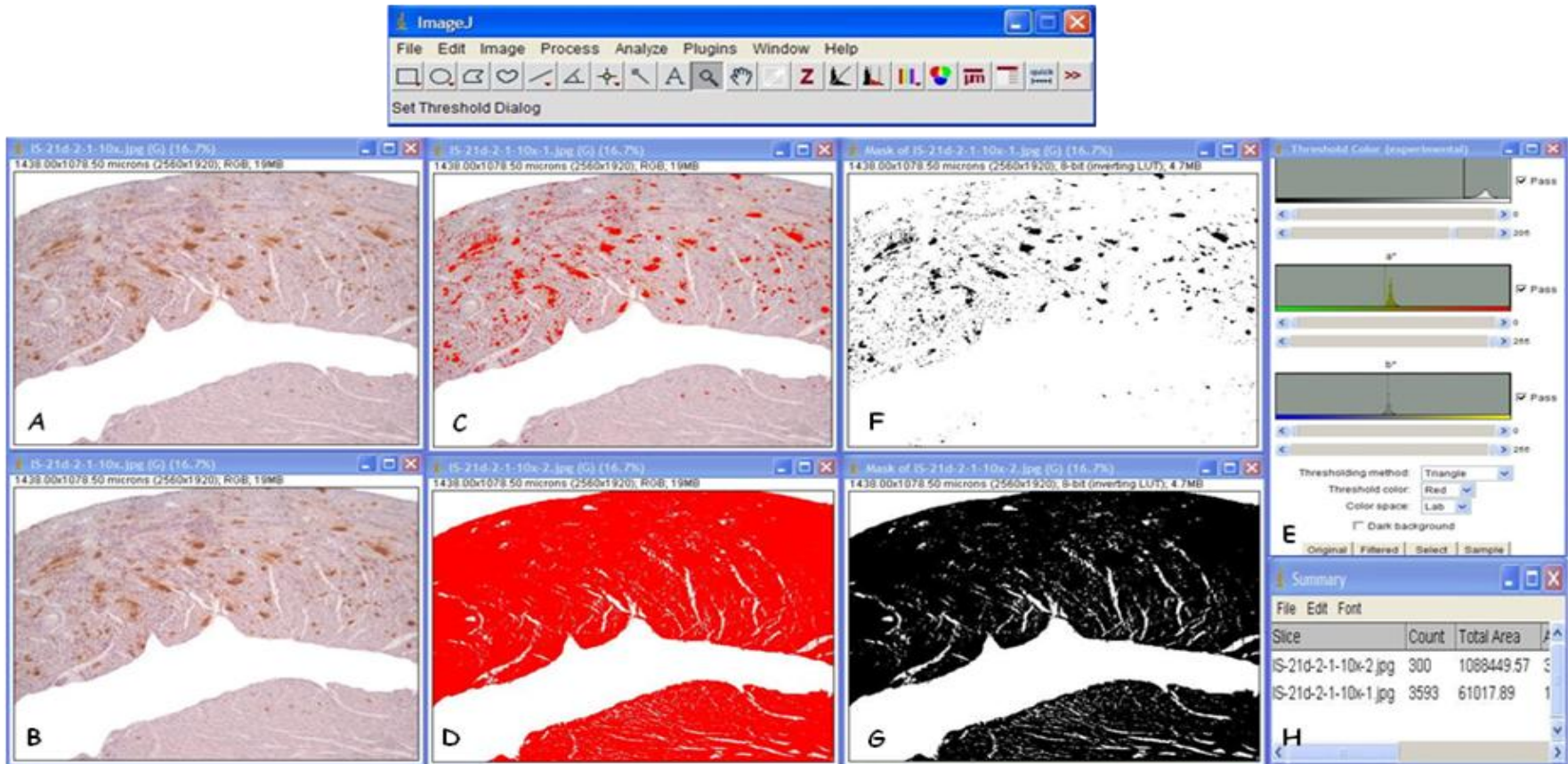
21

22

23

24

25



1
2
3
4
5
6
7
8

Figura 6 Demonstra a quantidade dos ninhos de amastigotas marcados por imunohistoquímica no tecido cardíaco dos camundongos BALB/c nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção pelo *T. cruzi*. Em A e B representa a imagem do ventrículo direito e parte do septo. Em C demonstra marcações exclusivas de amastigotas utilizando o comando "Color Threshold", em D demonstra a área do tecido cardíaco visualizado em E. Em F e G demonstra imagens binárias utilizadas para contagens e cálculo da área do tecido visualizado em H.

1 **4.13.- Dosagem das citocinas**

2
3 Foram quantificadas as citocinas IL-12 p40, IL-10, INF- γ e TNF. Todas foram
4 detectadas no plasma, baço e coração dos animais usando a captura por ELISA
5 citocina específica, de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences
6 Pharmingen – San Diego, CA, USA). A concentração de citocinas foi determinada
7 com referência à curva padrão das diluições seriadas das citocinas recombinantes.
8 Os valores das citocinas foram expressos em pg/mL quando plasma e pg/mL/g
9 quando baço e coração.

10 A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA)
11 utilizando o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme instruções
12 do fabricante. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe
13 Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de anticorpo
14 de captura específico para cada citocina testada, diluído em tampão carbonato-
15 bicarbonato 0,1 M e pH 9,6, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as
16 placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com solução de PBS acrescido com
17 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio) (Sigma) durante 1 hora à
18 temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionadas, em duplicata, as
19 quantidades conhecidas das citocinas recombinantes (curva-padrão) e a amostra a
20 ser analisada, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente durante 2 horas.
21 Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T e adicionados os anticorpos
22 secundários biotinizados (anticorpo de detecção) específicos para cada citocina,
23 diluídos, que foram pré-incubados por 15 minutos com avidina conjugada a
24 peroxidase. A solução foi adicionada às placas e seguiu-se a incubação à
25 temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o
26 revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) e o substrato H₂O₂. As reações foram

1 bloqueadas após 20 minutos com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm
2 em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

3

4 **4.14.- Análise estatística**

5

6 A análise estatística foi realizada por meio do programa “Instat e Prisma” da
7 Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a
8 distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov) e a variância homogênea (teste “F” ou
9 Teste de *Bartlett's*). Quando a distribuição foi considerada normal e com variância
10 homogênea utilizou-se testes paramétricos. Quando comparado dois grupos foi
11 utilizado o teste “t” não-pareado e mais de três grupos foi utilizado ANOVA com *post*
12 *test* de comparação múltipla de Tukey's. Os resultados foram expressos em média ±
13 EPM. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, utilizaram-se os testes
14 não paramétricos. Quando dois grupos foi utilizado o Teste "Mann Whitney" e mais
15 de 3 grupos utilizamos o teste "Kruskal-Wallis" com comparação múltipla de Dunn's.
16 Para correlação das variáveis foi utilizada a correlação de *Spearman*. Os resultados
17 foram expressos em mediana, valores máximos e mínimos. As diferenças
18 observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%) (MANDARIN DE-
19 LACERDA, 2003; ARANGO 2001).

20

21 **4.15 - Normas Adotadas**

22

23 Foram adotadas as normas da Associação Brasileira de Normas técnicas –
24 ABNT. NBR 14724, Agosto de 2002. Informação e documentação – trabalhos
25 acadêmicos – apresentação e as recomendações do Curso de Pós-graduação em
26 Patologia da UFTM.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

5.-RESULTADOS

1 5.1.-Parasitemia

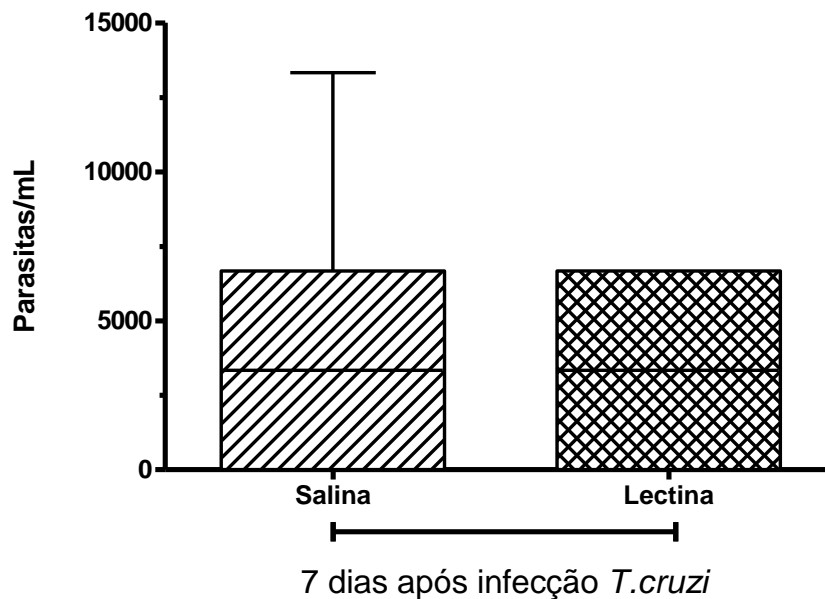
2

3 Na análise da parasitemia os valores foram expressos em mediana (máximo –
4 mínimo) quando usado teste não-paramétrico e média \pm EPM quando usado teste
5 paramétrico (Anexos 1, 2 e 3).

6 No sétimo dia de infecção foram usados valores expressos em mediana
7 (máximo – mínimo).

8 Para o grupo **Infectado tratado com Salina**, os valores foram de 3.333,0
9 (13.333,0 – 0,0). Para o grupo **Infectado tratado com Lectina**, os valores foram
10 3.333,0 (6.667,0 – 0,0), não verificando diferença estatisticamente significativa, com
11 $p>0,05$ (Figura 7).

12



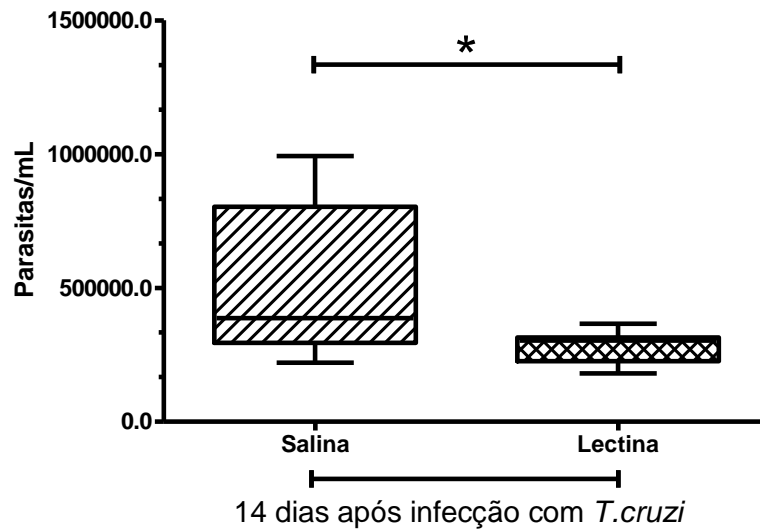
13
14

15 **Figura 7** Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado tratado com
16 Salina e Infectado tratado com Lectina, após 7 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a
17 mediana, valores, máximo e mínimo. Teste "Mann Whitney", com $p=0,8646$.

18

19

1 No décimo quarto dia de infecção para o grupo **Infectado tratado com Salina**
 2 os valores expressos foram de 386.667,0 (993.333,0 - 220.000,0). Para o grupo
 3 **Infectado tratado com Lectina**, 303.333,0 (366.667,0 - 180.000,0), verificando
 4 diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$. (Figura 8).



5
 6 **Figura 8** Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado tratado com
 7 Salina e Infectado tratado com Lectina, após 14 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a
 8 mediana, valores máximo e mínimo. Teste "Mann Whitney", com $p=0,0448$.
 9

10

11

12

13

14

15

16

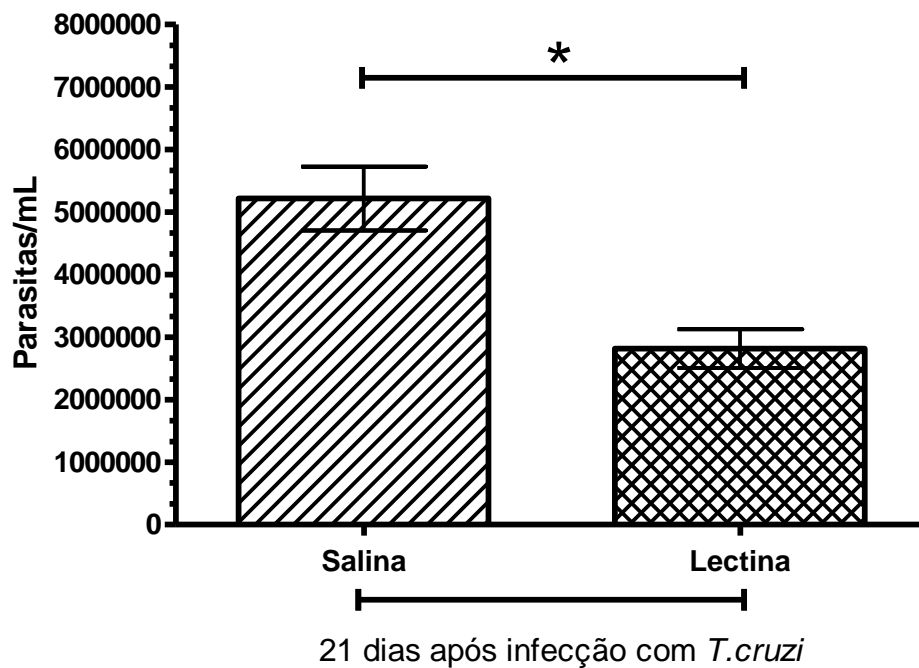
17

18

19

1 No vigésimo primeiro dia de infecção foram usados valores expressos em
2 média \pm EPM.

3 Para o grupo **Infectado tratado com Salina**, os valores foram $5.217.000,0 \pm$
4 $510.332,0$ e para o grupo **Infectado tratado com Lectina** $2.815.000,0 \pm 309.159,0$,
5 apresentando diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$ (Figura 9).



6

7 **Figura 9** Nível de Parasitemia, expresso em parasitos/ml segundo os grupos, Infectado e tratado com
8 Salina e Infectado tratado com Lectina, após 21 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a
9 média \pm EPM. Teste "t" não pareado, $p=0,0008$.

10

11

12

13

14

15

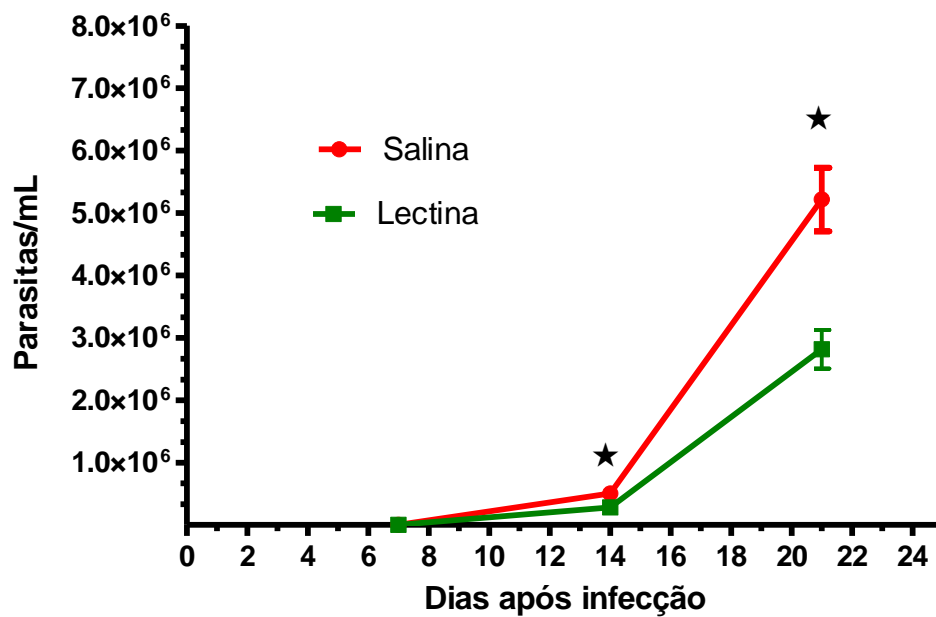
16

17

18

1 A curva de Parasitemia (Figura 10) demonstra o número de parasitos ao
2 longo do período analisado, com destaque para o décimo quarto e vigésimo primeiro
3 dias de infecção, onde houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos
4 analisados, com $p < 0,05$.

5



6

7 **Figura 10** Curva de Parasitemia no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção. O
8 gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores estão
9 expressos em média. *Diferença estatisticamente significativa no décimo quarto e vigésimo primeiro
10 dias de infecção, $p < 0,05$.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

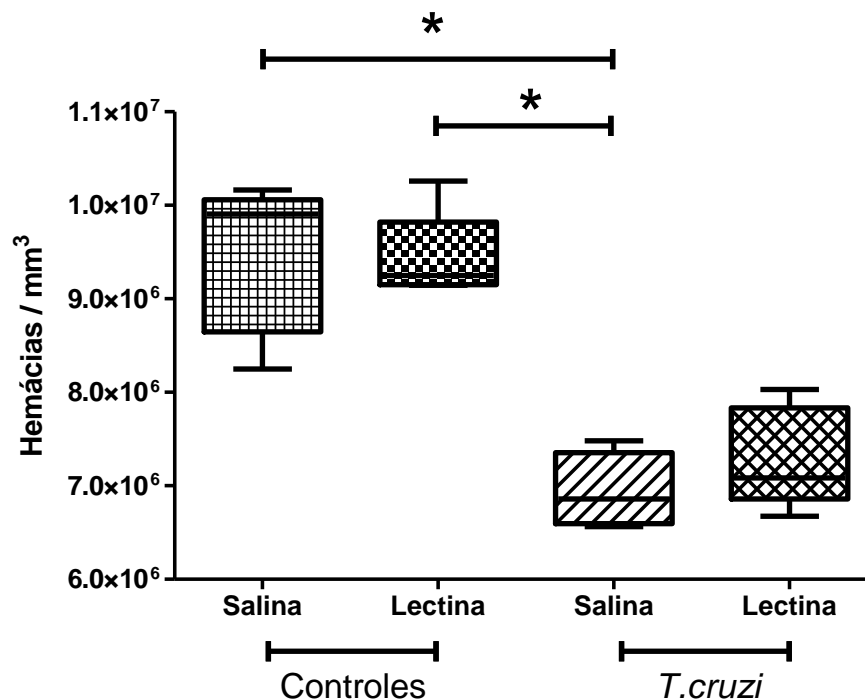
1 5.2.- Hemograma e contagem de Reticulócitos

2 5.2.1.- Hemácias

3

4 Os valores das Hemácias foram expressos em mediana (máximo – mínimo);
5 (Anexo 4).

6 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 9.905.000,0
7 (10.170.000,0 – 8.250.000,0); grupo **Controle tratado com Lectina** 9.250.000,0
8 (10.260.000,0 – 9.145.000,0); grupo **Infectado tratado com Salina** 6.860.000,0
9 (7.480.000,0 – 6.565.000,0) e grupo **Infectado tratado com Lectina** 7.085.000,0
10 (8.030.000,0 – 6.675.000,0). Houve diferenças estatisticamente significantes entre
11 os grupos **Controle tratado com Salina X Infectado tratado com Salina**, **Controle**
12 **tratado com Lectina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$ (Figura 11).



13

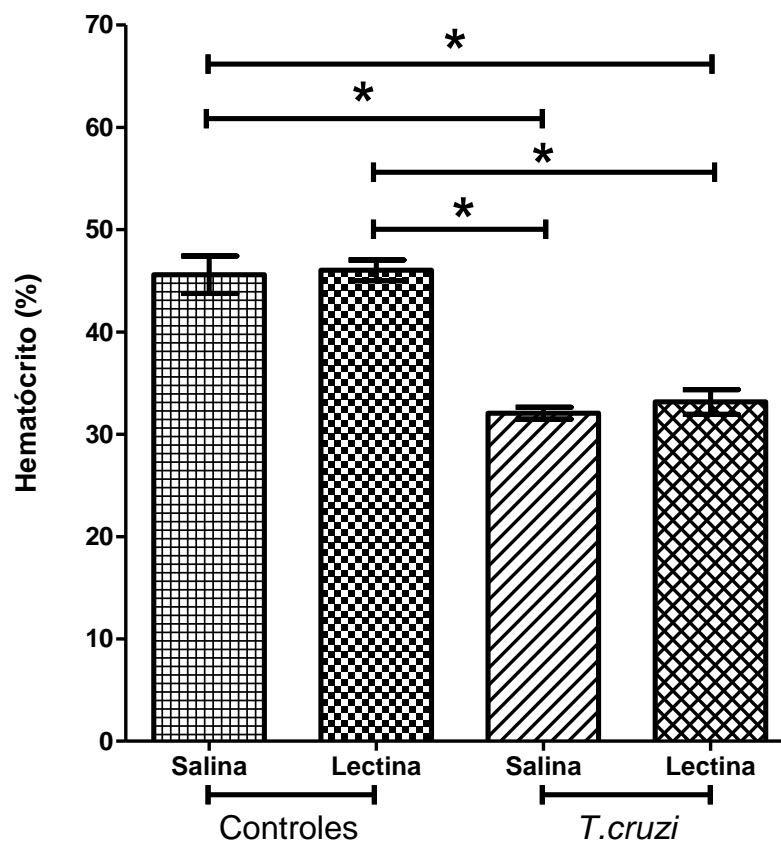
14 **Figura 11** Valores das Hemácias expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com
15 Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina
16 após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo
17 onde $* = p = 0,0022$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.

18

1 5.2.2.- Hematócrito

2 Os valores do Hematócrito foram expressos em média \pm EPM, (Anexo 5).

3 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $45,6 \pm 1,8$; grupo
 4 **Controle tratado com Lectina** $46,0 \pm 1,0$; grupo **Infectado tratado com Salina**
 5 $32,1 \pm 0,58$ e grupo **Infectado tratado com Lectina** $33,2 \pm 1,2$. Houve diferenças
 6 estatisticamente significantes entre os grupos **Controle tratado com Salina X**
 7 **Infectado tratado com Lectina**, **Controle tratado com Salina X Infectado tratado**
 8 **com Salina**, **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Lectina**,
 9 **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$
 10 (Figura 12).
 11



12 **Figura 12** Valores do Hematócrito expressos em % segundo os grupos: Controle tratado com Salina,
 13 Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23
 14 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm , EPM, onde * = $p < 0.0001$. ANOVA -
 15 teste "Tukey's Multiple Comparison".
 16

17

5.2.3.- Volume Corpuscular Médio (VCM)

Os valores do Volume Corpuscular Médio (VCM) foram expressos em mediana (máximo – mínimo); (Anexo 6).

O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 48,0 (48,5 - 48,0); grupo **Controle tratado com Lectina** 48,5 (50,0 - 48,0); grupo **Infectado tratado com Salina** 46,0 (48,0 - 45,0) e grupo **Infectado tratado com Lectina** 45,0 (46,0 - 45,0). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Lectina**, **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$ (Figura 13).

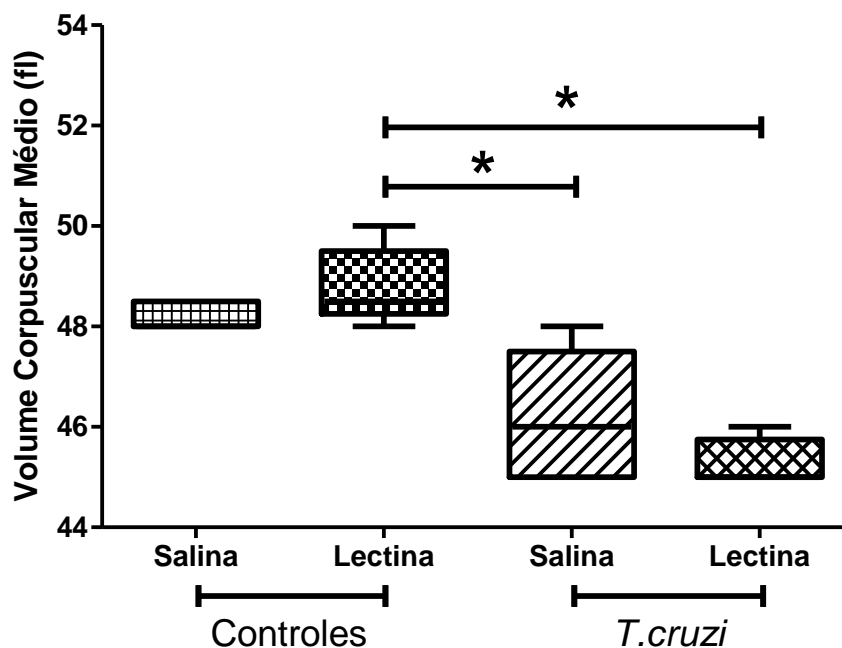


Figura 13 Valores do VCM expressos em fL segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo onde * = $p = 0,0020$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.

1 5.2.4.- Hemoglobina

2

3 Os valores da Hemoglobina foram expressos em média \pm EPM, (Anexo 7).

4 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $15,7 \pm 0,62$; grupo

5 **Controle tratado com Lectina** $15,9 \pm 0,33$; grupo **Infectado tratado com Salina**

6 $11,3 \pm 0,22$ e grupo **Infectado tratado com Lectina** $11,6 \pm 0,41$. Houve diferenças

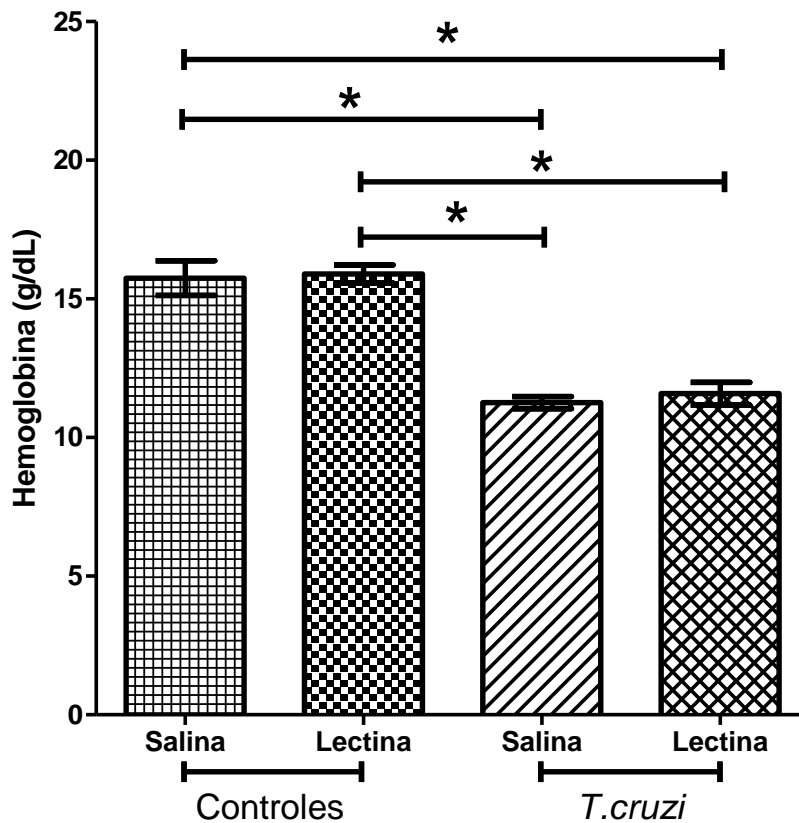
7 estatisticamente significantes entre os grupos **Controle tratado com Salina X**

8 **Infectado tratado com Lectina**, **Controle tratado com Salina X Infectado tratado**

9 **com Salina**, **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Lectina**,

10 **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$

11 (Figura 14).



12

13 **Figura 14** Valores da Hemoglobina expressos em g/dL segundo os grupos: Controle tratado com
 14 Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina
 15 após 23 dias de infecção com *T.cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p < 0,0001$.
 16 ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".

17

5.2.5.- Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

Os valores da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) foram expressos em média \pm EPM, (Anexo 8).

O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $16,7 \pm 0,14$; grupo **Controle tratado com Lectina** $16,9 \pm 0,16$; grupo **Infectado tratado com Salina** $16,2 \pm 0,17$ e grupo **Infectado tratado com Lectina** $15,9 \pm 0,12$. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos: **Controle tratado com Salina X Infectado tratado com Lectina**; **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Lectina**; **Controle tratado com Lectina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$ (Figura 15).

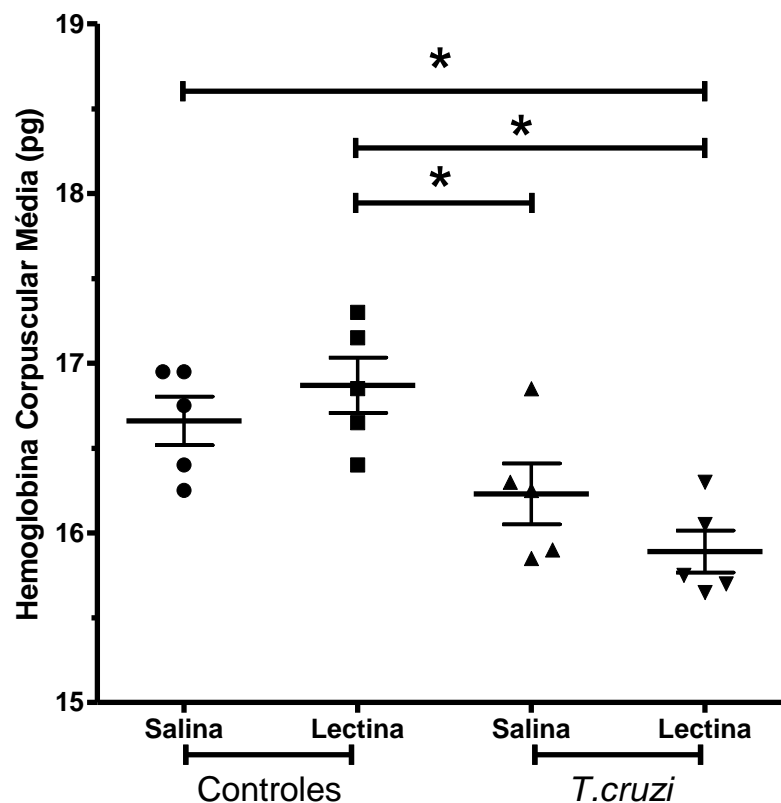


Figura 15 Valores de HCM expressos em pg segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a distribuição e a média \pm EPM, onde * = $p = 0,0016$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".

5.2.6.- Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW)

Os valores do RDW foram expressos em mediana (máximo – mínimo); (Anexo 9).

O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 13,6 (14,4 - 13,5); grupo **Controle tratado com Lectina** 14,0 (16,3 - 13,6); grupo **Infectado tratado com Salina** 15,4 (16,2 - 14,9) e grupo **Infectado tratado com Lectina** 15,1 (15,3 - 14,8). Houve diferença estatisticamente significantes entre os grupos **Controle tratado com Salina X Infectado tratado com Salina**, com $p < 0,05$ (Figura 16).

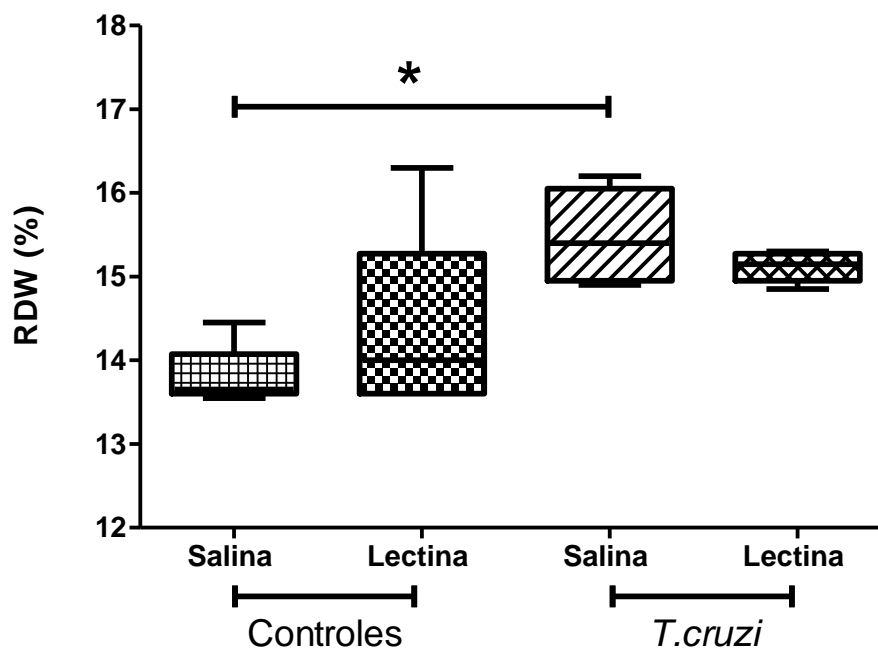


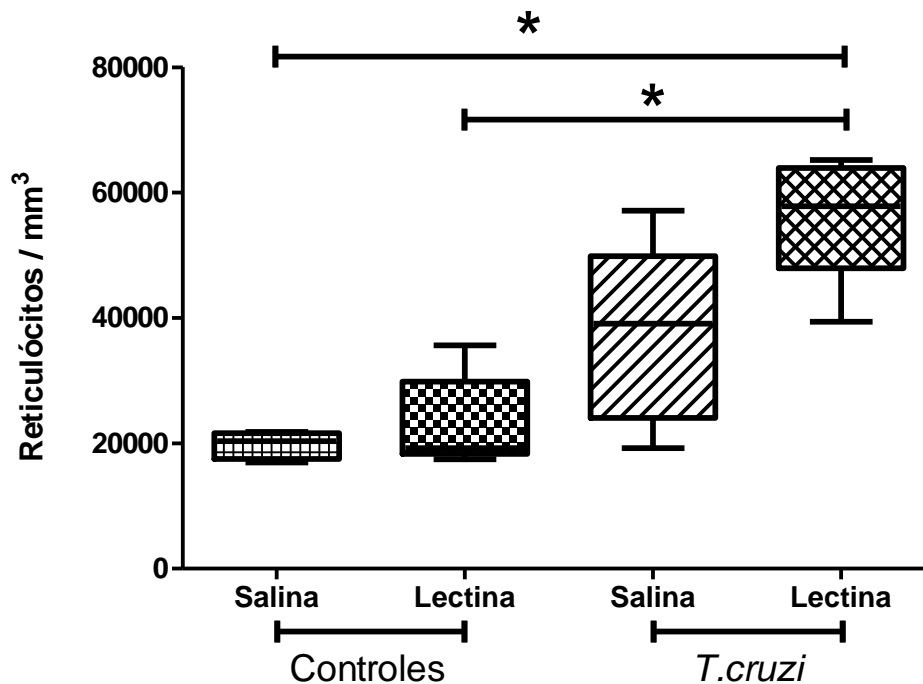
Figura 16 Valores do RDW expressos em % segundo os grupos: Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo, onde * = $p = 0,0183$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.

1 5.2.7.- Reticulócitos

2

3 Os valores dos Reticulócitos foram expressos em mediana (máximo –
4 mínimo); (Anexo 10).

5 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 20.330,0 (21.791,0 -
6 16.924,0); grupo **Controle tratado com Lectina** 19.226,0 (35.644,0 – 17.442,0);
7 grupo **Infectado tratado com Salina** 39.088,0 (57.116,0 – 19.208,0) e grupo
8 **Infectado tratado com Lectina** 57.816,0 (65.182,0 – 39.383,0). Houve diferenças
9 estatisticamente significantes entre os grupos **Controle tratado com Salina X**
10 **Infectado tratado com Lectina**, **Controle tratado com Lectina X Infectado**
11 **tratado com Lectina**, com $p < 0,05$ (Figura 17).



12

13 **Figura 17** Valores dos Reticulócitos expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com
14 Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina
15 após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo
16 onde * = $p = 0,0056$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.

17

18

19

1 5.2.8.- Plaquetas

2

3 Os valores das Plaquetas foram expressos em média \pm EPM, (Anexo 11).

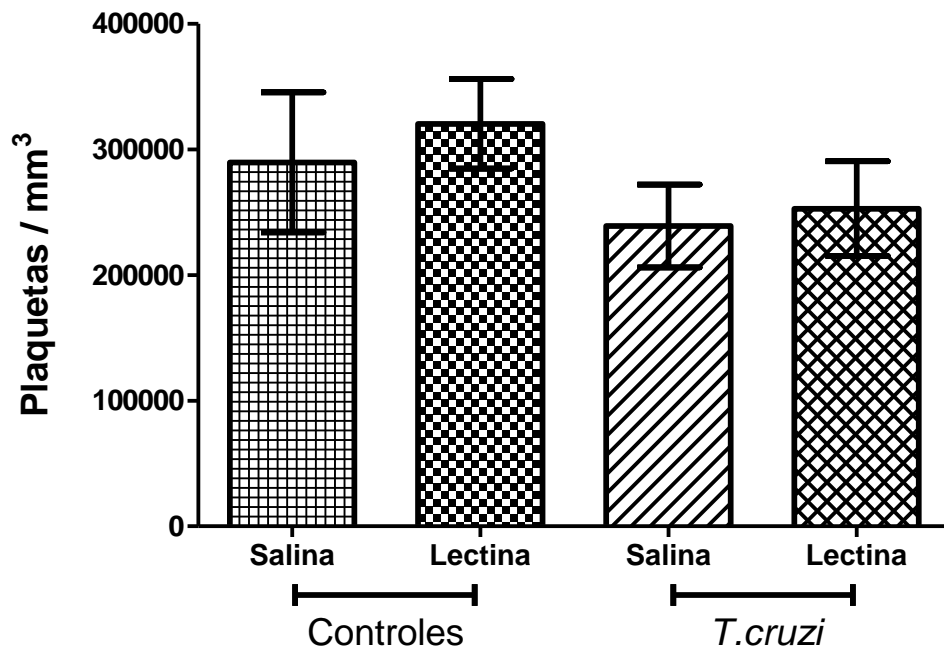
4 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $289.724,0 \pm 55.736$;

5 grupo **Controle tratado com Lectina** $320497,0 \pm 35.631,0$; grupo **Infectado tratado**

6 **com Salina** $239.044,0 \pm 33.034,0$ e grupo **Infectado tratado com Lectina**

7 $252.895,0 \pm 37.728,0$. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os

8 grupos analisados, com $p > 0,05$ (Figura 18).



9

10 **Figura 18** Valores de Plaquetas expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado com Salina,
 11 Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23
 12 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p=0,5186$. ANOVA - teste
 13 "Tukey's Multiple Comparison".

14

15

16

17

18

19

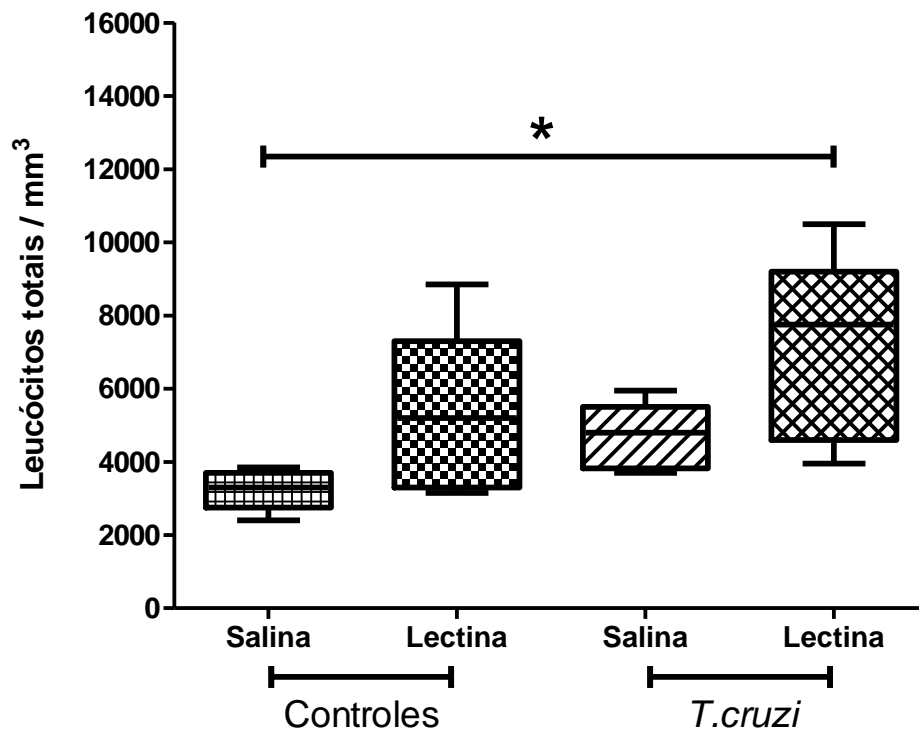
1 5.2.9.- Leucócitos Totais

2

3 Os valores dos Leucócitos Totais foram expressos em mediana (máximo –
4 mínimo); (Anexo 12).

5 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 3.300,0 (3.850,0 –
6 2.400,0); grupo **Controle tratado com Lectina** 5.200,0 (8.850,0 – 3.150,0); grupo
7 **Infectado tratado com Salina** 4.800,0 (5.950,0 – 3.700,0) e grupo **Infectado**
8 **tratado com Lectina** 7.750,0 (10.500,0 – 3.950,0). Houve diferença estatisticamente
9 significativa entre os grupos **Controle tratado com Salina X Infectado tratado com**
10 **Lectina**, com $p < 0,05$ (Figura 19).

11



12

13 **Figura 19** Valores dos Leucócitos Totais expressos em mm^3 segundo os grupos: Controle tratado
14 com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com
15 Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e
16 mínimo onde * = $p = 0,0220$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas
17 comparações.

18

19

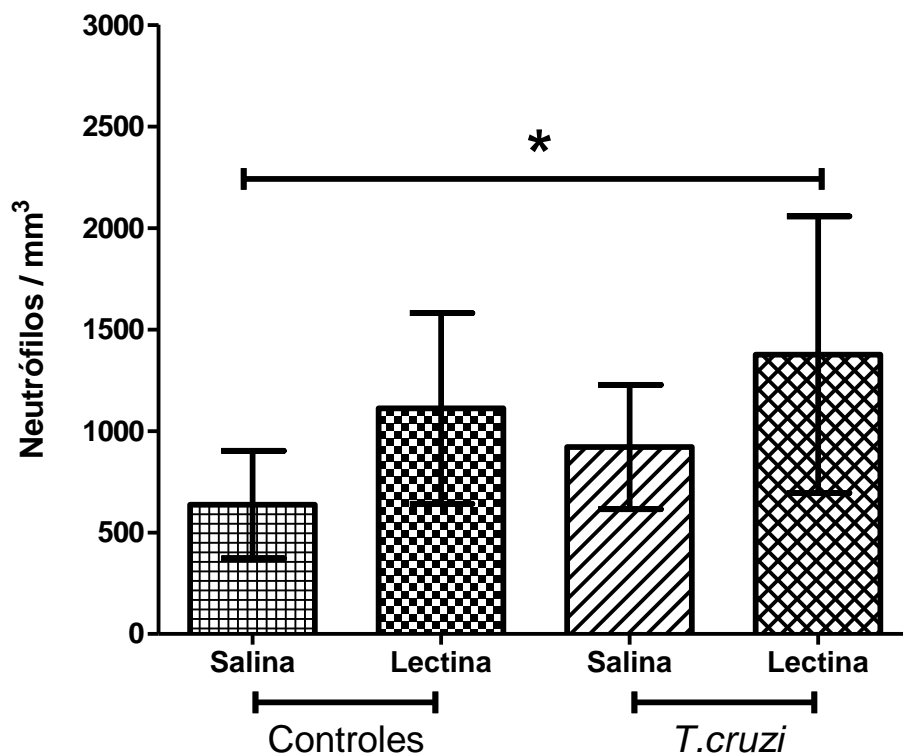
1 **5.2.10.- Neutr3filos/mm³**

2

3 Os valores absolutos de Neutr3filos foram expressos em m3dia \pm EPM;
4 (Anexo 13).

5 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $637,3 \pm 95,2$; grupo
6 **Controle tratado com Lectina** $1.111,0 \pm 169,3$; grupo **Infectado tratado com**
7 **Salina** $921,2 \pm 110,1$ e grupo **Infectado tratado com Lectina** $1.376,0 \pm 245,2$.
8 Houve diferen3a estatisticamente significativa entre os grupos **Controle tratado com**
9 **Salina X Infectado tratado com Lectina**, com $p < 0,05$ (Figura 20).

10



11

12 **Figura 20** Valores absolutos dos Neutr3filos expressos em mm³ segundo os grupos: Controle tratado
13 com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com
14 Lectina ap3s 23 dias de infec33o com *T. cruzi*. O gr3fico representa a m3dia \pm EPM, onde * =
15 $p = 0,0393$. ANOVA - teste "Tukey's Multiple Comparison".

16

17

18

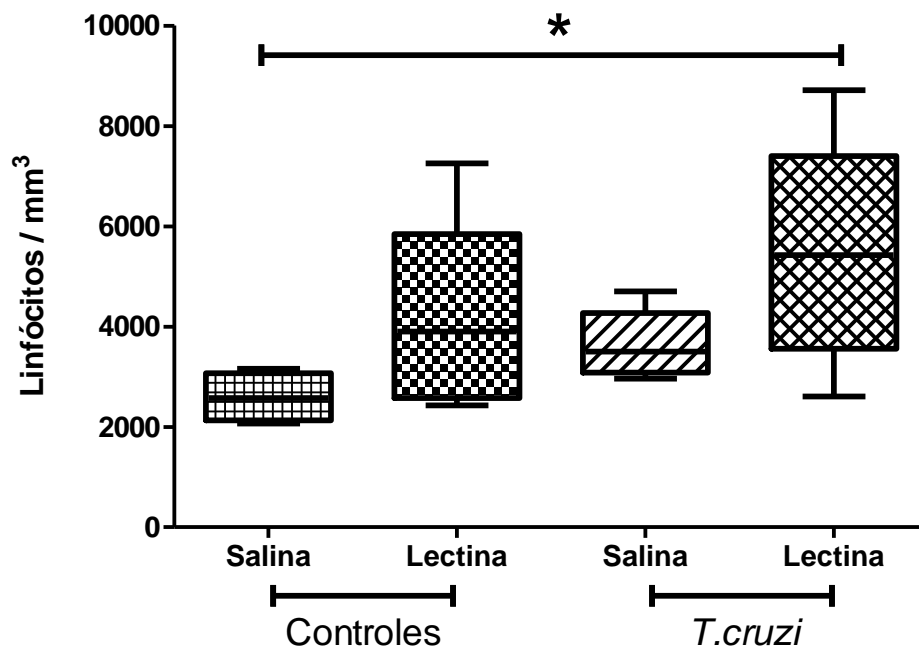
1 **5.2.11.- Linfócitos/mm³**

2

3 Os valores absolutos de Linfócitos foram expressos em mediana (máximo –
4 mínimo); (Anexo 14).

5 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 2.574,0 (3.157,0 –
6 2.064,0); grupo **Controle tratado com Lectina** 3.900,0 (7.257,0 – 2.426,0); grupo
7 **Infectado tratado com Salina** 3.504,0 (4.701,0 – 2.960,0) e grupo **Infectado**
8 **tratado com Lectina** 5.425,0 (8.715,0 - 2.607,0). Houve diferença estatisticamente
9 significativa entre os grupos **Controle tratado com Salina X Infectado tratado com**
10 **Lectina**, com $p < 0,05$ (Figura 21).

11



12

13 **Figura 21** Valores absolutos dos Linfócitos expressos em mm³ segundo os grupos: Controle tratado
14 com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com
15 Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e
16 mínimo, onde $p = 0,0541$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas
17 comparações.

18

19

20

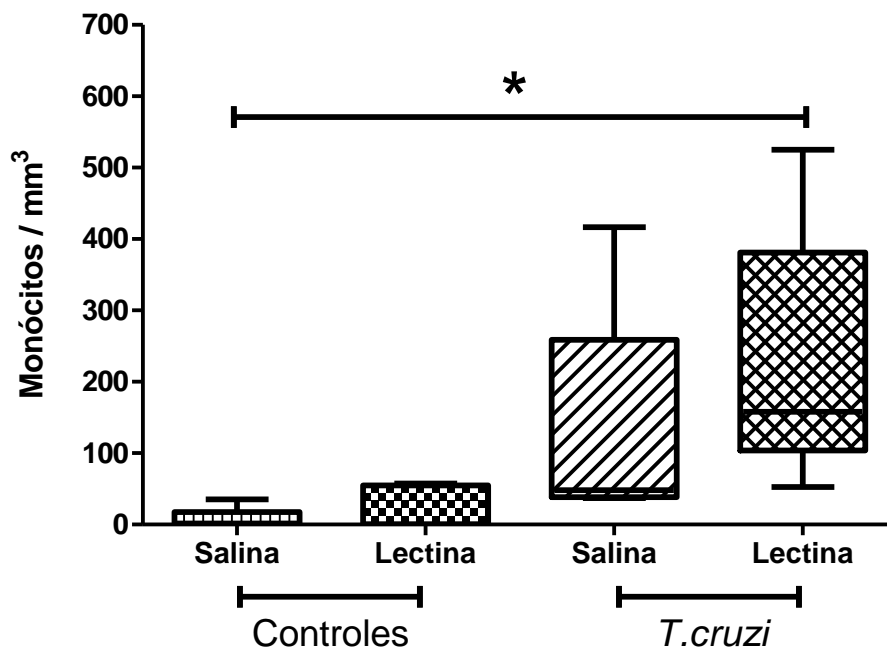
1 **5.2.12.- Monócitos/mm³**

2

3 Os valores absolutos dos Monócitos foram expressos em mediana (máximo –
4 mínimo), (Anexo 15).

5 O grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 0,0 (35,5 – 0,0);
6 grupo **Controle tratado com Lectina** 0,0 (57,5 – 0,0); grupo **Infectado tratado com**
7 **Salina** 48,0 (416,5 – 37,0) e grupo **Infectado tratado com Lectina** 158,0 (525,0 –
8 52,5). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **Controle**
9 **tratado com Salina X Infectado tratado com Lectina**, com $p < 0,05$ (Figura 22).

10



11

12 **Figura 22** Valores absolutos dos Monócitos expressos em mm³ segundo os grupos: Controle tratado
13 com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com
14 Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * =
15 $p = 0,0051$. ANOVA - teste "Kruskal-Wallis" com teste Dunn's para múltiplas comparações.

16

17

18

19

5.3.- Porcentagem da área de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco

A porcentagem da área de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco foi expressa em média \pm EPM, (Anexo 16).

O grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os valores de $10,5 \pm 0,90$ e o grupo **Infectado tratado com Lectina** $4,2 \pm 0,54$. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p < 0,05$ (Figura 23).

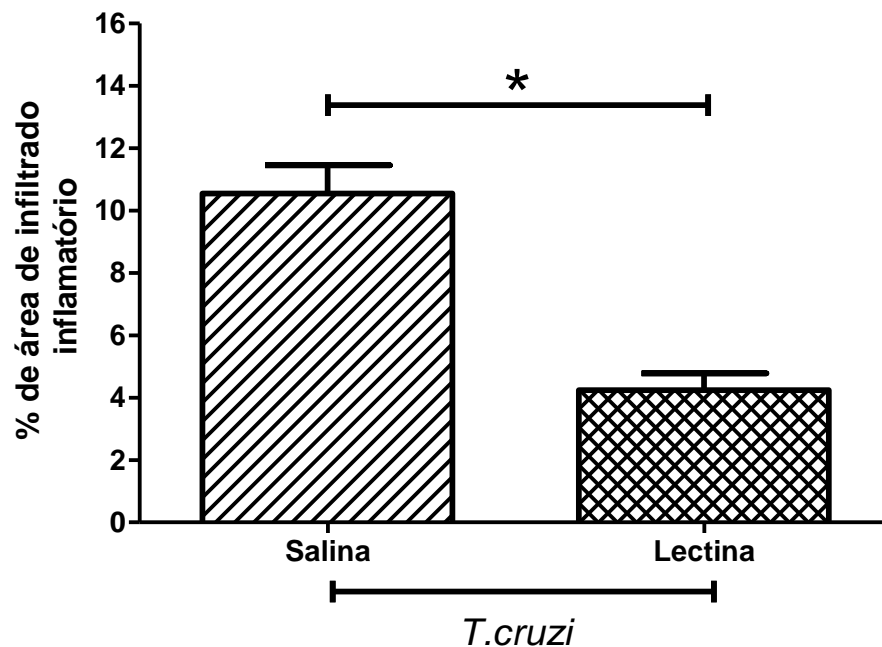


Figura 23 Porcentagem da área do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco expressa em μm^2 segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a média \pm EPM onde * = $p < 0,0001$. Teste "t" não pareado.

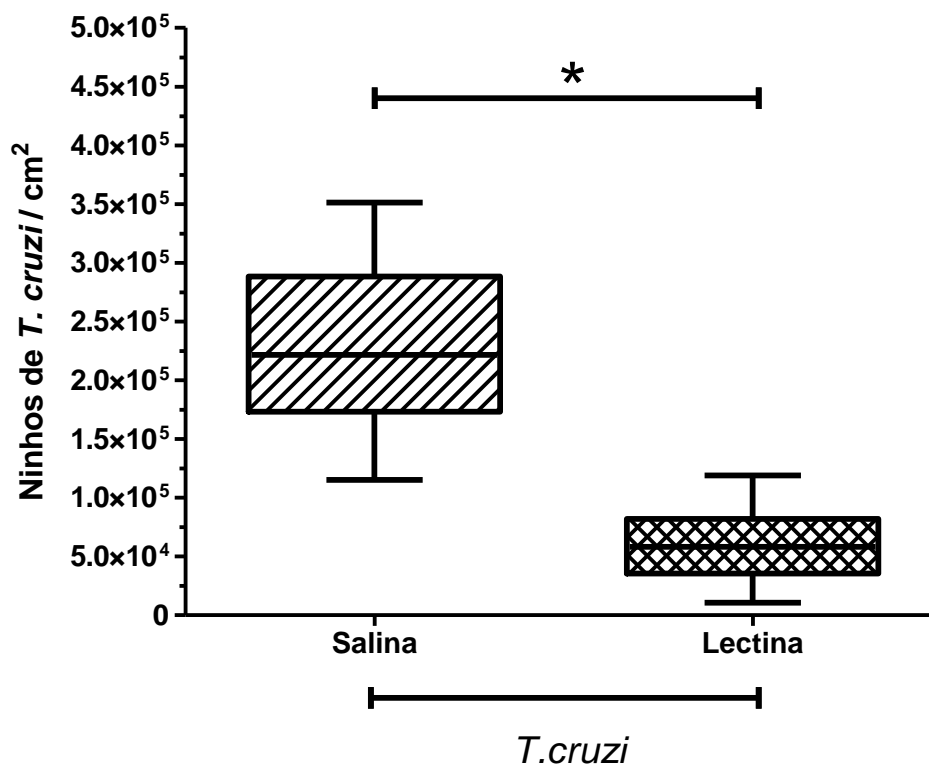
1 **5.4.- Quantificação dos ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco por**
 2 **imunohistoquímica**

3

4 A quantificação do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco foi
 5 expressa em mediana (máximo e mínimo); (Anexo 17).

6 O grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os valores 221.768,0
 7 (351.342,0 – 115.184,0) e o grupo **Infectado tratado com Lectina** 58.328,0
 8 (119.079,0 – 10.614,0). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre
 9 os grupos, com $p < 0,05$ (Figura 24).

10



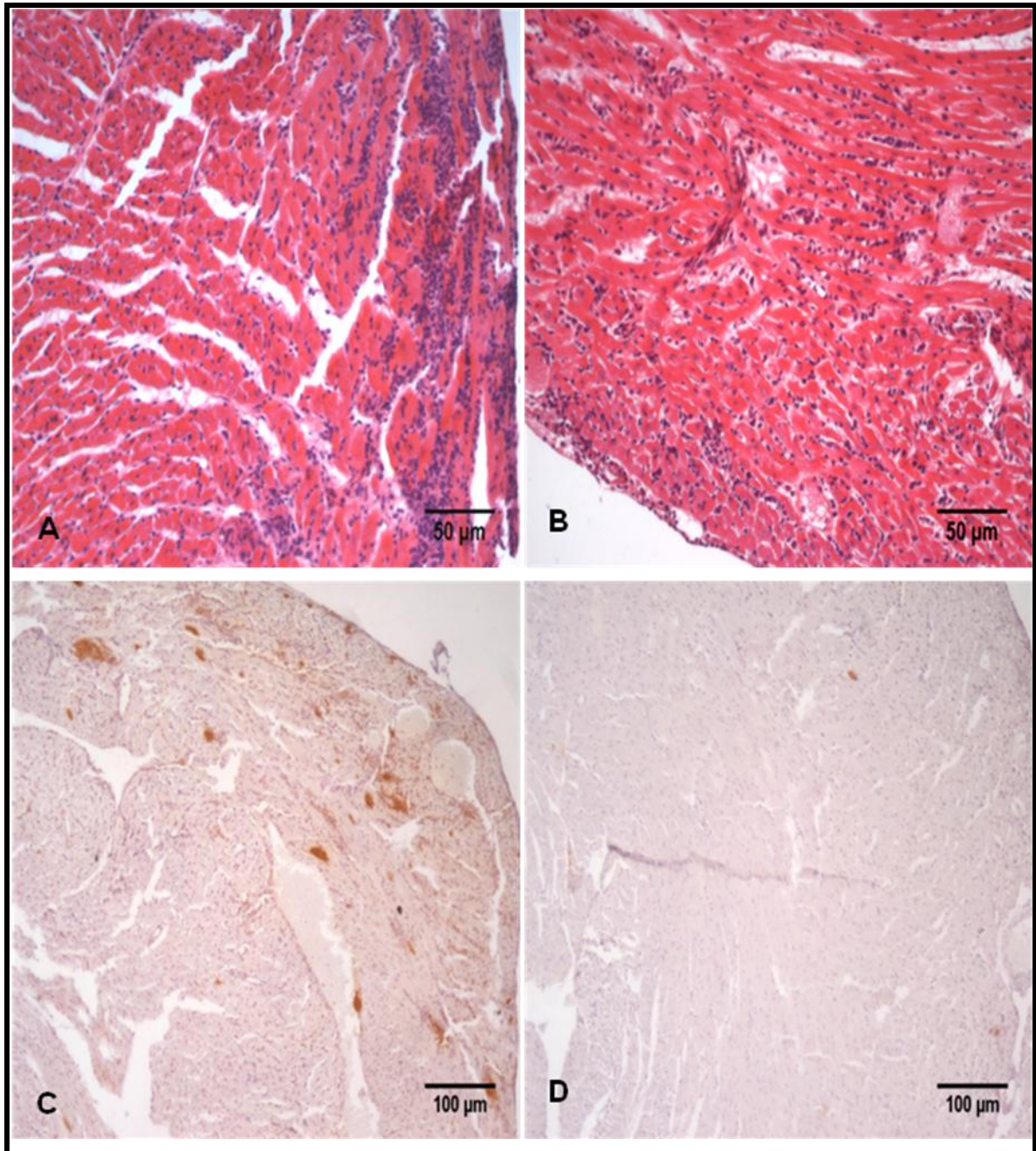
11

12 **Figura 24** Quantificação do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica
 13 expressos em cm² segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina
 14 após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo,
 15 onde * = $p < 0,0001$. Teste "Mann Whitney".

16

17

1



2

3 **Figura 25** Em A e B: foto representativa de uma área do tecido cardíaco na qual foi utilizada para
4 quantificação do Infiltrado Inflamatório através da grade de pontos nos grupos Infectado tratado com
5 Salina e Infectado tratado com Lectina *ArtinM* respectivamente. Imagem capturada com objetiva de
6 20x. Em C e D: foto representativa de uma área do tecido cardíaco que foi utilizada para contagem de
7 ninhos de *T.cruzi* por Imunohistoquímica nos grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado
8 com Lectina *ArtinM* respectivamente. Imagem capturada com objetiva de 10x.

9

10

11

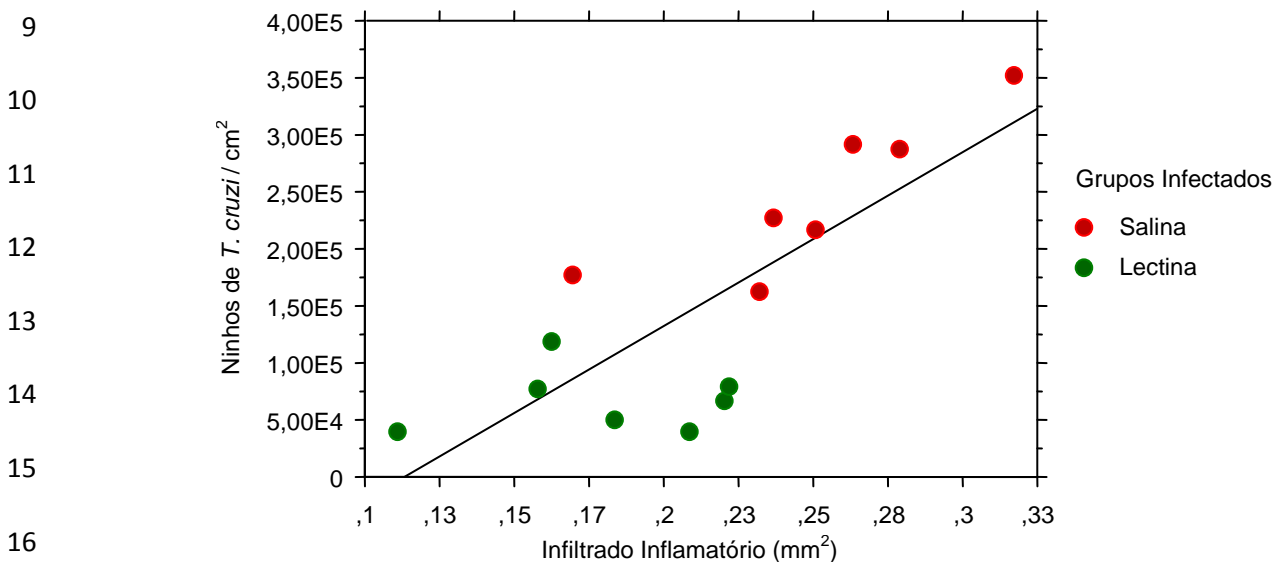
12

1 **5.5.- Correlação do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco com o**
 2 **infiltrado inflamatório.**

3

4 A correlação do Número de Ninhos de *T.cruzi* dos grupos **Infectado tratado**
 5 **com Salina** e **Infectado tratado com Lectina** foi testada contra o Infiltrado
 6 Inflamatório no tecido cardíaco dos respectivos grupos, mostrando uma correlação
 7 positiva (Rho 0,8) e estatisticamente significativa, com $p < 0,05$ (Figura 26).

8



17 **Figura 26** Correlação de *Spearman* do Número de Ninhos de *T.cruzi* por cm² com o Infiltrado
 18 Inflamatório no tecido cardíaco segundo os grupos: Infectado tratado com Salina e Infectado tratado
 19 com Lectina após 23 dias de infecção com *T. cruzi*. (Rho 0,8 $p < 0,0036$).

20

21

22

23

24

25

26

27

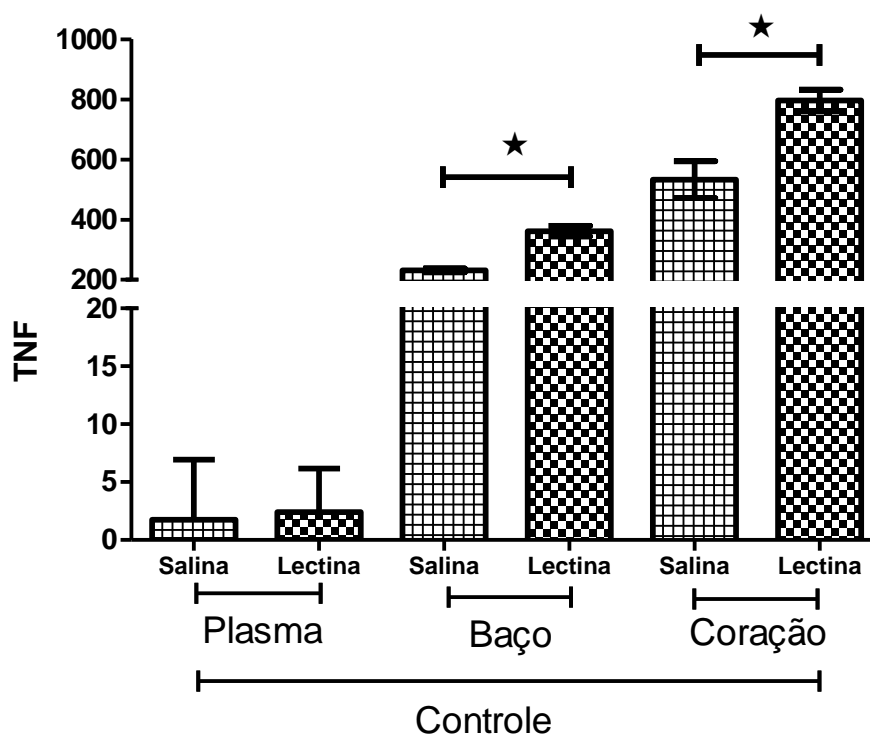
1 5.6.- Quantificação das citocinas

2 5.6.1.- Quantificação de TNF

3 5.6.1.1. – Quantificação de TNF dos grupos Controles

4 Os valores da citocina TNF nos grupos Controles foram expressos em média
5 \pm EPM; (Anexo 18).

7 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Controle tratado com**
8 **Salina**, $1,1 \pm 1,1$; grupo **Controle tratado com Lectina** $1,2 \pm 1,0$. Em relação ao
9 baço, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $230,8 \pm 6,3$; grupo
10 **Controle tratado com Lectina** $361,8 \pm 17,7$. No coração, o grupo **Controle tratado**
11 **com Salina** obteve os valores $533,0 \pm 61,4$; grupo **Controle tratado com Lectina**
12 $796,2 \pm 35,6$. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os
13 grupos referentes às dosagens no baço e coração, com $p < 0,05$ (Figura 27).



14

15 **Figura 27** Valores da citocina TNF expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
16 coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras
17 de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p=0,4933$; * = $p=0,0004$ e
18 $0,0060$ respectivamente. Teste "t" não pareado.

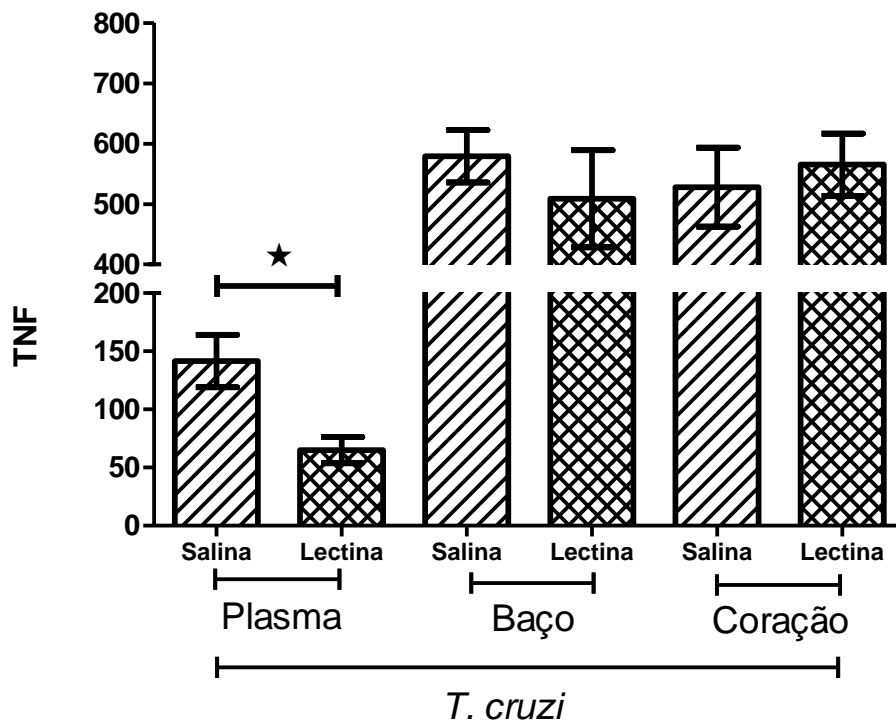
19

1 5.6.1.2. – Quantificação de TNF dos grupos Infectados

2

3 Os valores da citocina TNF nos grupos Infectados foram expressos em média
4 \pm EPM; (Anexo 19).

5 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Infectado tratado com**
6 **Salina**, $141,6 \pm 22,4$; grupo **Infectado tratado com Lectina** $65,0 \pm 11,4$. Em relação
7 ao baço, o grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os valores $578,9 \pm 43,38$;
8 grupo **Infectado tratado com Lectina** $508,8 \pm 80,5$. No coração, o grupo **Infectado**
9 **tratado com Salina** obteve os valores $527,9 \pm 65,4$; grupo **Infectado tratado com**
10 **Lectina** $565,1 \pm 51,5$. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes
11 entre os grupos referentes às dosagens no plasma, com $p < 0,05$ (Figura 28).



12

13 **Figura 28** Valores da citocina TNF expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
14 coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas
15 amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p=0,0102$;
16 $p=0,4652$ e $0,6671$ respectivamente. Teste "t" não pareado.

17

18

1 5.6.2.- Quantificação de IL-12 p40

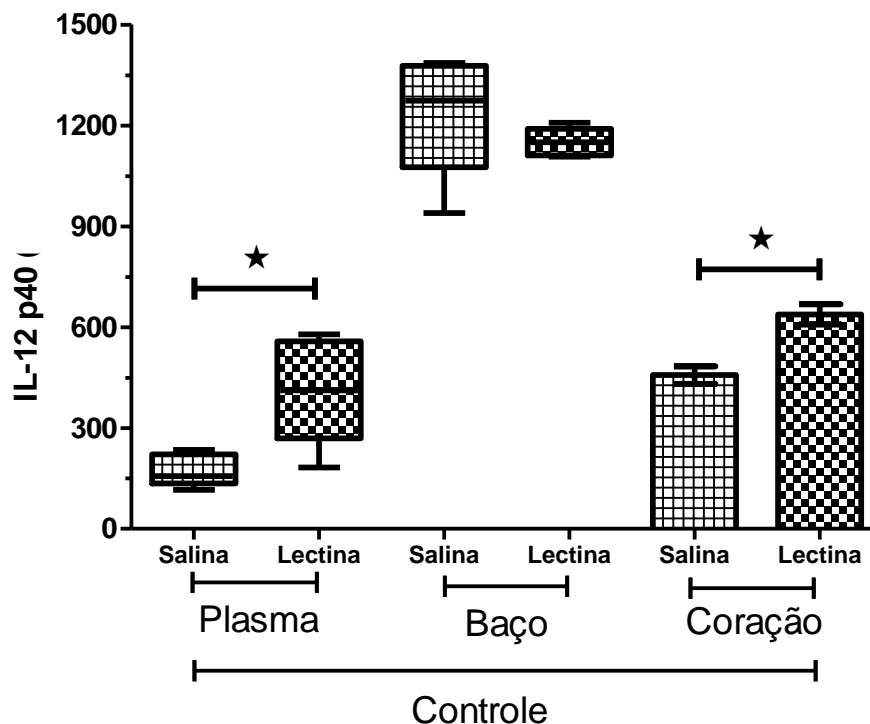
2 5.6.2.1. – Quantificação de IL-12 p40 dos grupos Controles

3

4 Os valores da citocina IL-12 p40 nos grupos Controles foram expressos em
5 mediana (máximo – mínimo) e média \pm EPM; (Anexo 20).

6

7 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Controle tratado com**
8 **Salina**, 156,3 (234,9 - 116,1); grupo **Controle tratado com Lectina** 412,3 (578,3 -
9 182,8). Em relação ao baço, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os
10 valores 1274 (1.386,0 - 939,8); grupo **Controle tratado com Lectina** 1.150,0
11 (1.208,0 – 1.107,0). No coração, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os
12 valores 457,3 \pm 26,2; grupo **Controle tratado com Lectina** 637,7 \pm 29,9. Foram
13 observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos referentes às
dosagens no plasma e coração, com $p < 0,05$ (Figura 29).



14

15 **Figura 29** Valores da citocina IL-12 p40 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
16 coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras
17 de plasma, baço e coração. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo; média \pm
18 EPM, onde * = $p=0,0101$; $p=0,1508$; * = $p=0,0019$, respectivamente. Teste "Mann Whitney" e Teste "t"
19 não pareado.

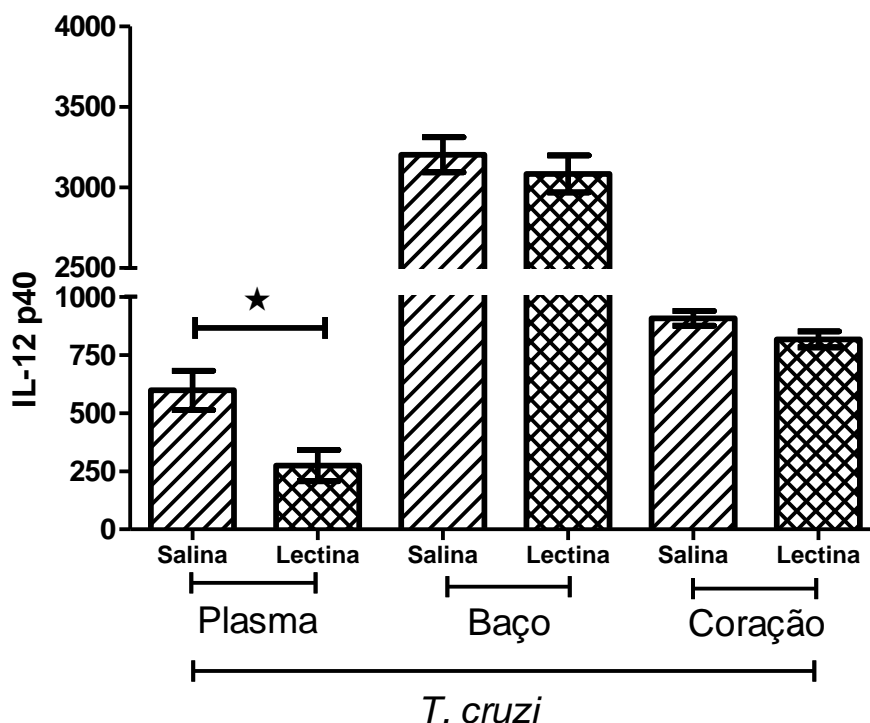
20

1 5.6.2.2. – Quantificação de IL-12 p40 dos grupos Infectados

2

3 Os valores da citocina IL-12 p40 nos grupos Infectados foram expressos em
4 média \pm EPM; (Anexo 21).

5 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Infectado tratado com**
6 **Salina** $597,6 \pm 84,0$; grupo **Infectado tratado com Lectina** $273,7 \pm 67,0$. Em
7 relação ao baço, o grupo, **Infectado tratado com Salina** obteve os valores $3.203,0$
8 $\pm 108,9$; grupo **Infectado tratado com Lectina** $3.084,0 \pm 115,5$. No coração, o grupo
9 **Infectado tratado com Salina** obteve os valores $907,8 \pm 31,7$; grupo **Infectado**
10 **tratado com Lectina** $816,7 \pm 34,6$. Foram observadas diferenças estatisticamente
11 significantes entre os grupos referentes às dosagens no plasma, com $p < 0,05$ (Figura
12 30).



13

14 **Figura 30** Valores da citocina IL-12 p40 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
15 coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas
16 amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p = 0,0101$;
17 $p = 0,1508$ e $0,0884$, respectivamente. Teste "t" não pareado.

18

1 5.6.3.- Quantificação de IL-10

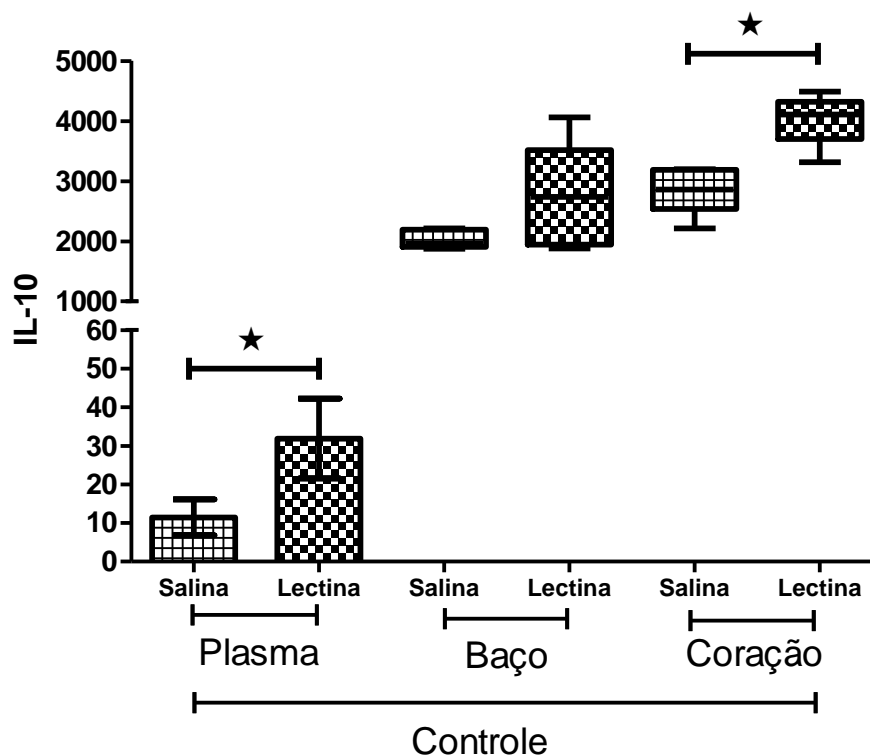
2 5.6.3.1. – Quantificação de IL-10 dos grupos Controles

3

4 Os valores da citocina IL-10 nos grupos Controles foram expressos em média
5 \pm EPM e mediana (máximo – mínimo); (Anexo 22).

6

7 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Controle tratado com**
8 **Salina** $11,4 \pm 4,7$; grupo **Controle tratado com Lectina** $31,9 \pm 10,3$. Em relação ao
9 baço, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $1.959,0$ ($2.212,0 -$
10 $1.875,0$); grupo **Controle tratado com Lectina** $2.739,0$ ($4.063,0 - 1.883,0$). No
11 coração, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores 2862 ($3.196,0 -$
12 $2.213,0$); grupo **Controle tratado com Lectina** $4.110,0$ ($4.488,0 - 3.316,0$). Foram
13 observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos referentes às



14

15 **Figura 31** Valores da citocina IL-10 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
16 coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras
17 de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM; mediana, valores máximo e
18 mínimo, onde $p = 0,0970$; $0,2222$; $*$ = $p = 0,0079$, respectivamente. Teste "t" não pareado e Teste
19 "Mann Whitney"

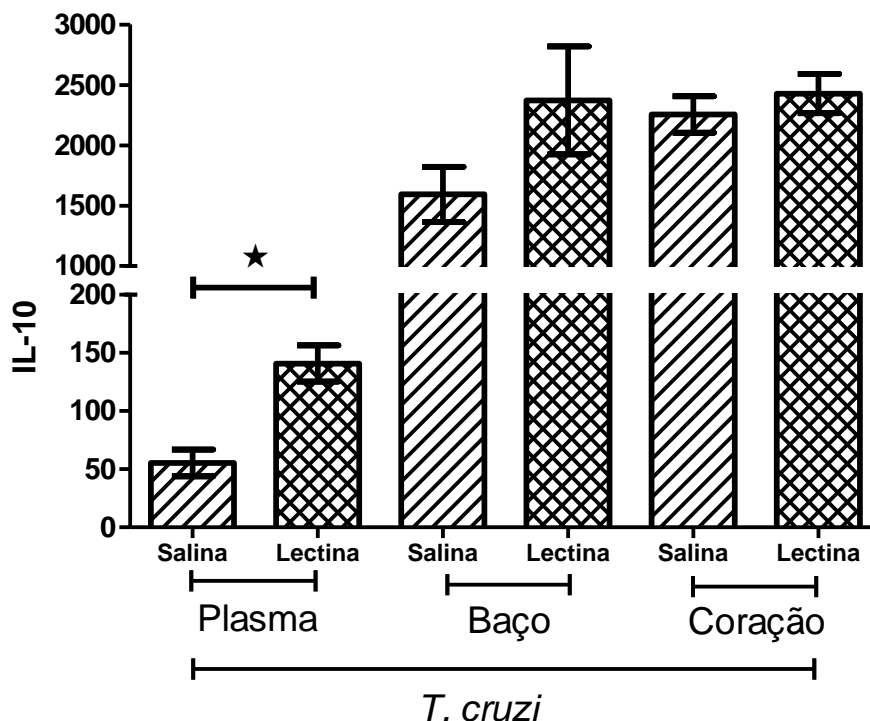
20

1 5.6.3.2. – Quantificação de IL-10 dos grupos Infectados

2

3 Os valores da citocina IL-10 nos grupos Infectados foram expressos em média
4 \pm EPM; (Anexo 23).

5 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Infectado tratado com**
6 **Salina** $55,4 \pm 11,5$; grupo **Infectado tratado com Lectina** $140,9 \pm 15,5$. Em relação
7 ao baço, o grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os valores $1.593,0 \pm 228,1$;
8 grupo **Infectado tratado com Lectina** $2.372,0 \pm 448,2$. No coração, o grupo
9 **Infectado tratado com Salina** obteve os valores $2.255,0 \pm 150,7$; grupo **Infectado**
10 **tratado com Lectina** $2.428,0 \pm 163,1$. Foram observadas diferenças
11 estatisticamente significantes entre os grupos referentes às dosagens no plasma,
12 com $p < 0,05$ (Figura 32).



13

14 **Figura 32** Valores da citocina IL-10 expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
15 coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas
16 amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde * = $p = 0,0006$; $p =$
17 $0,1601$ e $0,4581$, respectivamente. Teste "t" não pareado.

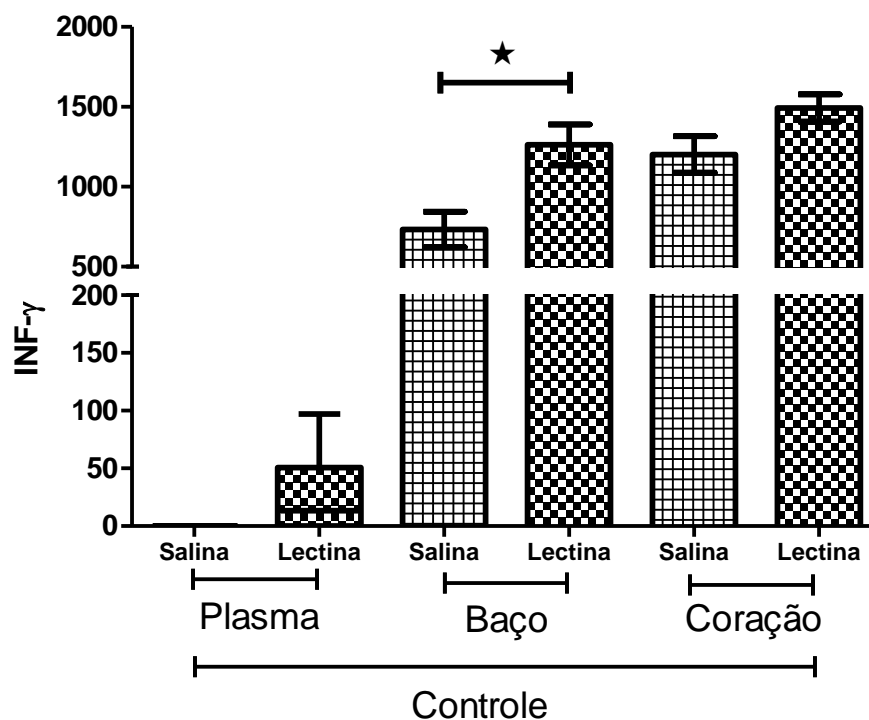
18

1 5.6.4.- Quantificação de IFN- γ

2 5.6.4.1. – Quantificação de IFN- γ dos grupos Controles

3
4 Os valores da citocina IFN- γ nos grupos Controles foram expressos em média
5 \pm EPM; (Anexo 24).

6 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Controle tratado com**
7 **Salina** $0,0004 \pm 0,00017$; grupo **Controle tratado com Lectina** $26,5 \pm 15,1$. Em
8 relação ao baço, o grupo **Controle tratado com Salina** obteve os valores $733,2 \pm$
9 $110,9$; grupo **Controle tratado com Lectina** $1.262,0 \pm 128,2$. No coração, o grupo
10 **Controle tratado com Salina** obteve os valores $1.202,0 \pm 114,0$; grupo **Controle**
11 **tratado com Lectina** $1.494,0 \pm 85,6$. Foram observadas diferenças estatisticamente
12 significantes entre os grupos referentes às dosagens no baço, com $p < 0,05$ (Figura
13 33).



14

15 **Figura 33** Valores da citocina IFN- γ expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
16 coração segundo os grupos Controle tratado com Salina e Controle tratado com Lectina nas amostras
17 de plasma, baço e coração. O gráfico representa a média \pm EPM, onde $p = 0,3768$; * = $p = 0,0142$ e $p =$
18 $0,0751$, respectivamente. Teste "t" não pareado.

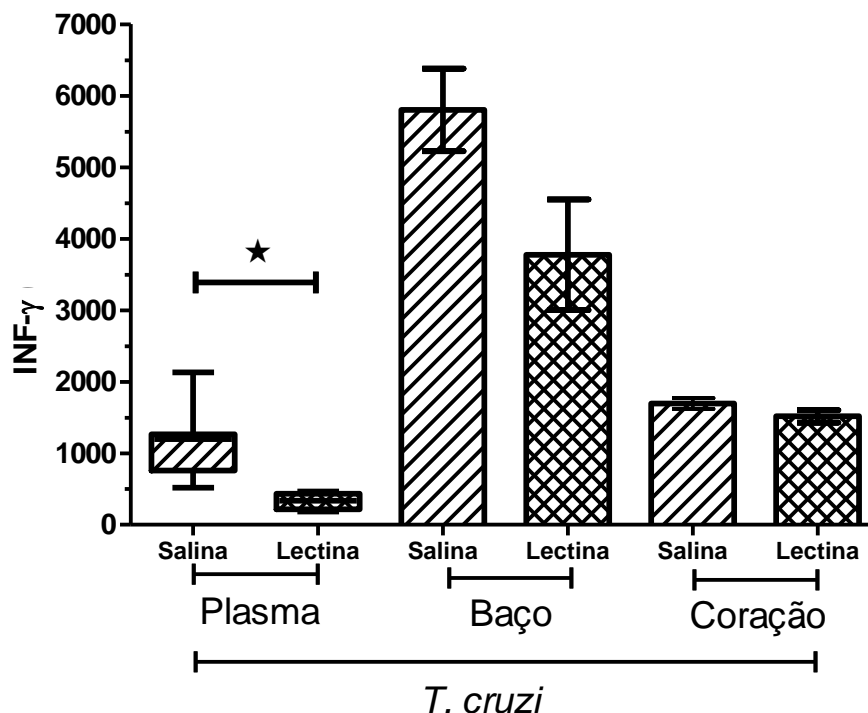
19

1 5.6.4.2. – Quantificação de IFN- γ dos grupos Infectados

2

3 Os valores da citocina IFN- γ nos grupos Infectados foram expressos em
4 mediana (máximo – mínimo) e média \pm EPM; (Anexo 25).

5 No plasma evidenciamos os valores para o grupo **Infectado tratado com**
6 **Salina** 1.199,0 (2.129,0 - 516,9); grupo **Infectado tratado com Lectina** 333,6 (463,9
7 - 185,6). Em relação ao baço, o grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os
8 valores 5.802,0 \pm 579,6; grupo **Infectado tratado com Lectina** 3.776,0 \pm 773,0. No
9 coração, o grupo **Infectado tratado com Salina** obteve os valores 1.695,0 \pm 76,7;
10 grupo **Infectado tratado com Lectina** 1.516,0 \pm 88,1. Foram observadas diferenças
11 estatisticamente significantes entre os grupos referentes às dosagens no plasma,
12 com $p < 0,05$ (Figura 34).



13

14 **Figura 34** Valores da citocina IFN- γ expressos em pg/mL para o plasma e pg/mL/g para o baço e
15 coração segundo os grupos Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina nas
16 amostras de plasma, baço e coração. O gráfico representa a mediana, valores máximo e mínimo;
17 média \pm EPM, onde * = $p = 0,0009$; $p = 0,0692$; $0,1649$ respectivamente. Teste "Mann Whitney" e Teste
18 "t" não pareado.

19

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

6.-DISCUSSÃO

1 Este trabalho objetivou analisar o efeito do extrato da semente de *Artocarpus*
2 *integrifolia*, denominada lectina *ArtinM*, durante a fase aguda da infecção
3 experimental pelo *T.cruzi*. Pelo fato de ser um produto natural e mostrar alguns
4 benefícios na resposta imune a outros parasitas intracelulares, a lectina *ArtinM*
5 passou a ser um importante instrumento de estudo. Neste trabalho utilizamos as
6 ferramentas de análise da parasitemia, hemograma, porcentagem da área do
7 infiltrado inflamatório nos ventrículos cardíacos, quantificação dos ninhos de *T.cruzi*
8 no tecido cardíaco e dosagem de algumas citocinas para avaliar seu efeito biológico.

9 Existem algumas distinções que são verificadas entre as cepas de *T. cruzi*,
10 dentre elas a virulência, patogenicidade e o tropismo. A cepa alvo do estudo
11 (Colombiana) é classificada como tipo I e caracterizada por tropismo tecidual para
12 musculatura esquelética e miocárdica, elevada patogenicidade e ainda apresenta
13 extensas lesões necróticas-inflamatórias do vigésimo ao trigésimo dias de infecção
14 (ANDRADE *et al.*, 1995; 1999; DE SOUZA *et al.*, 2003; BRENNER, CHIARI, 1963;
15 ROSSI, 1995). Na fase aguda da infecção pelo *T.cruzi* o tipo de cepa testada leva a
16 diferenças estatisticamente significantes em diversas análises, principalmente na
17 curva de parasitemia, onde a cepa “Colombiana” apresenta pico entre o vigésimo e
18 trigésimo dias de infecção (CAMANDARROBA *et al.*, 2001).

19 Outro fator analisado e também de extrema importância é o inóculo. Neste
20 trabalho realizamos um inóculo com 3×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa
21 “Colombiana” de *T. cruzi*. A curva de parasitemia apresentou o pico do número de
22 parasitos/mL no vigésimo primeiro dia, estando de acordo com a característica da
23 cepa já descrita anteriormente. No nosso trabalho os resultados da parasitemia
24 mostraram que ao sétimo dia de infecção, tanto o grupo **Infectado tratado com**
25 **Salina** quanto o grupo **Infectado tratado com Lectina** não apresentaram diferenças

1 estatisticamente significantes, uma vez que se tratava do início da curva, onde as
2 formas tripomastigotas no sangue se apresentavam em baixo número, apesar de já
3 nesta data se observar uma tendência à diminuição no último grupo. Ao analisar a
4 parasitemia no décimo quarto e vigésimo primeiro dias de infecção e comparar os
5 grupos infectados, o grupo que havia recebido tratamento com lectina *ArtinM*
6 apresentou números menores de parasitos/mL do que o grupo que recebeu
7 tratamento com Solução Salina a 0,9%, demonstrando que a lectina *ArtinM* tem a
8 capacidade em diminuir a parasitemia. O controle da proliferação de microrganismos
9 pela lectina *ArtinM* também foi descrito em outras infecções como, por exemplo, na
10 leishmaniose, onde a lectina *ArtinM* induz um papel protetor conduzido por
11 macrófagos, resultando em resistência à infecção em camundongos Balb/c. Na
12 paracoccidiodomicose a partir de um tratamento terapêutico com a lectina após 10
13 dias de infecção com o *Paracoccidioides brasiliensis*, observou-se redução da
14 formação de unidades de colônias bem como a diminuição da formação de
15 granulomas pulmonares. Já na neosporose canina, a imunização com lectina *ArtinM*
16 associada ao antígeno lisado de *Neospora* conferiu uma alta proteção à infecção
17 parasitária pela indução de uma resposta imune protetora vacinal em camundongos
18 C57BL/6 (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001; COLTRI *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*,
19 2011).

20 O controle do número de parasitos durante a fase aguda da DC poderá ter
21 influência no grau da lesão dos tecidos que irão determinar as diversas formas
22 anatomoclínicas (MARINHO, 1999; PEREIRA, 1992). No entanto para que haja este
23 controle na fase aguda experimental, tanto na parasitemia como na presença de
24 Infiltrado Inflamatório e parasitos nos tecidos, incluindo coração e musculatura
25 esquelética assim como as vísceras do trato digestivo (TEXEIRA *et al.*, 2006) é

1 evidente a participação de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e TNF afim de
2 potencializar o papel microbicida dos macrófagos (MUNOZ-FERNANDEZ *et*
3 *al.*,1992; SHER, COFFMAN, 1992; SILVA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1995), além do
4 papel essencial do NO, que contribui para o controle do parasitismo (HOLSCHER *et*
5 *al.*, 1998). Foi sugerido por BORGES *et al.*, (2009) que o NO tem um papel na
6 proteção tecidual, controlando a inflamação e potencialmente diminuindo lesões
7 cardíacas durante a fase aguda da doença.

8 Porém a participação do NO, TNF- α e Prostaglandinas tem sido relacionado
9 com estresse oxidativo, reportando um aumento de lesões pré hemolíticas
10 (MALVEZI, *et al.*, 2004; TATAKIHARA, *et al.*, 2008). Nossos dados corroboram com
11 os achados na literatura em relação ao aumento do processo hemolítico, presente
12 na infecção aguda pelo *T. cruzi*, onde encontramos uma diminuição dos valores
13 provindos do Eritrograma nos grupos infectados, dentre eles o número de Eritrócitos,
14 Hemoglobina, Hematócrito e Índices Hematimétricos (VCM e HCM). No entanto o
15 processo pelo qual se desencadeia a vulnerabilidade eritrocítica associada à DC
16 aguda ainda não está clara. LUJÁN, BRONIA (1994) demonstraram a participação
17 do *T.cruzi* na desestabilização da membrana eritrocitária *in vitro*. TATAKIHARA, *et*
18 *al.* (2008) concluíram que a infecção pelo *T.cruzi* induz lesões pré-hemolíticas na
19 membrana dos eritrócitos através do estresse oxidativo e que este mecanismo é
20 cepa-dependente. Para camundongos com elevada produção de NO, a lesão
21 oxidativa depende da reação do NO com o oxigênio; já para camundongos com
22 baixa produção o dano oxidativo é resultante quase que exclusivamente devido à
23 produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e não depende da ativação da via
24 ciclooxigenase. Outro dado demonstrado por BORGES, *et al.* (2009) é a contribuição
25 da 5-lipoxigenase para o controle do parasitismo no tecido cardíaco e a sua

1 participação no estresse oxidativo de eritrócitos dependente da produção de NO
2 endógeno. MALVEZI, *et al.* (2004) que abordam o envolvimento do NO e do TNF- α
3 na associação entre o estresse oxidativo e anemia na infecção pelo *T.cruzi* afirmam
4 que, embora o NO não contribua diretamente para o desenvolvimento da anemia,
5 pode favorecer outras alterações hematológicas durante a infecção, tais como a
6 elevação de Reticulócitos e a redução de Leucócitos circulantes no sangue
7 periférico.

8 Nossos dados demonstraram que o uso da lectina *ArtinM* pode melhorar a
9 resposta medular no processo anêmico desencadeado pelo *T.cruzi*, pois
10 observamos um decréscimo do número de parasitos no sangue com uma menor
11 perda de eritrócitos em relação ao grupo **Infectado tratado com Salina**, assim
12 como, os níveis de Hemoglobina e as porcentagens do Hematócrito. Embora o
13 Volume Corpuscular Médio não apresente diferença entre os grupos Infectados e
14 com a quantidade de Hemoglobina Corpuscular Média diminuída em relação aos
15 demais grupos sem infecção podemos relacionar com a presença de um maior
16 número de células jovens (com uma menor concentração de hemoglobina)
17 circulantes no grupo **Infectado tratado com Lectina**. Encontramos também uma
18 variação de tamanho dos elementos eritrocitários circulantes no sangue periférico
19 dos animais infectados que se reflete em alterações na Amplitude de Distribuição do
20 Volume dos Eritrócitos (RDW), sendo maior no grupo **Infectado tratado com**
21 **Salina**. Embora não ocorra o aumento significativo em relação ao grupo **Infectado**
22 **tratado com Salina** é evidente a elevação de Reticulócitos circulantes ($p < 0,05$ vs
23 **Controles tratados com Salina e Lectina**), fato este que favorece para a
24 diminuição dos efeitos do processo anêmico. O aumento de Reticulócitos em
25 animais infectados com *T.cruzi* foi notado por TATAKIHARA *et al.*, (2008) em

1 camundongos BALB/c e C57BL/6. Desta forma o uso da lectina *ArtinM* sugere que
2 além da diminuição do processo hemolítico exista uma melhor resposta na
3 proliferação de células precursoras eritrocíticas pela medula óssea. MARCONDES,
4 *et al.* (2000) demonstram uma forte associação entre a diminuição da carga
5 parasitária e diminuição dos efeitos deletérios encontrados no hemograma de
6 camundongos C3H infectados com a cepa CL de *T.cruzi* após tratamento
7 antiparasitário pós-infecção. No grupo que não recebeu tratamento observaram um
8 aumento exponencial da carga parasitária, anemia, trombocitopenia, leucopenia, e
9 hipoplasia da medula óssea.

10 Em relação ao número de Plaquetas nossos dados mostraram que no grupo
11 **Infectado tratado com Lectina** os valores foram maiores em relação ao grupo
12 **Infectado tratado com Salina** (na análise da mediana e valor máximo); no entanto
13 as diferenças não foram significativas. O estímulo dos megacariócitos a uma
14 fragmentação citoplasmática para geração de novas plaquetas parece ser
15 importante na DC, uma vez que se mostrou a participação plaquetária no controle “in
16 vivo” da infecção pelo *T.cruzi* (UMEKITA, MOTA, 1990). Entretanto as alterações
17 plaquetárias, seja uma plaquetopenia ou plaquetose na DC é dependente da cepa e
18 do hospedeiro (MARCONDES *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2009; ARANTES, 2011).

19 Além disso, a lectina *ArtinM* demonstrou ter um importante papel na
20 estimulação direta ou indireta de células Leucocitárias (Neutrófilos, Linfócitos e
21 Monócitos) no sangue periférico, acarretando em aumento dos níveis de Leucócitos
22 Totais. Embora não se detecte aumento estatisticamente significante entre os grupos
23 **Controle tratado com Salina** e **Controle tratado com Lectina**, é notória a
24 estimulação celular nos grupos **Infectado tratado com Salina** e **Infectado tratado**
25 **com Lectina** ($p < 0,05$). A relação de manifestações celulares na corrente sanguínea

1 de infecções por parasitas tissulares são bastante freqüentes, embora algumas
2 vezes apresentem uma grande variedade nos dados analisados para o Leucograma,
3 como descrito na Leishmaniose em cães. Neste caso dependendo da relação
4 parasita hospedeiro, pode ser encontrado tanto leucocitose como leucopenia
5 (SCHULTZE *et al.*, 2000; REIS *et al.*, 2006; SLAPPENDEL *et al.*, 1988). Em relação
6 às tripanossomíases, BATISTA, *et al.* (2006) relataram em ovinos com infecção pelo
7 *Trypanosoma vivax* alterações do hemograma encontrando anemia com linfocitose.
8 Já na DC aguda em humanos PINTO, *et al.*, (2008) estudaram 233 casos da doença
9 na Amazônia brasileira, incluindo Pará, Amapá e Maranhão, relatando uma
10 predominância de anemia e leucocitose com presença de linfócitos atípicos. RASSI,
11 *et al.*, (2000) também descreveram principalmente anemia e leucocitose, além de
12 eventualmente leucopenia em uma série de pacientes estudados. Enfatizando a
13 interação da lectina *ArtinM* a nível celular GANIKO, *et al.*, (1998) demonstraram que
14 a aplicação tópica da lectina *ArtinM* induziu a atração de neutrófilos “*in vivo*” através
15 da migração no tecido conectivo da região perimuscular e na superfície dos vasos.
16 Diante desta capacidade CHAHUD, *et al.*, (2009) promoveram a recuperação do
17 epitélio da córnea de 13 coelhos devido ao aumento do influxo de neutrófilos dentro
18 da área ferida, fato este induzido pela lectina *ArtinM*.

19 Em uma área endêmica na Argentina, LUGONES (2001) descreveu
20 linfomonocitoses elevadas. Esta proliferação celular se faz necessária para o
21 controle do parasitismo em uma fase inicial (TAFURI, 1987; MUÑOZ *et al.*, 1992),
22 induzida pela síntese de quimiocinas onde algumas, como as RANTES (*Regulated*
23 *upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*), MCP-1 (Proteína
24 quimiotática de macrófagos-1) e MIP-1 α (Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa)
25 podem ser importantes moduladores da resposta inflamatória e do controle da DC.

1 Muitas quimiocinas aparentam engatilhar a síntese de citocinas pró-inflamatórias,
2 induzindo a produção de NO por macrófagos durante a infecção por *T.cruzi in vitro*
3 (ALIBERTI *et al.*, 1999; 2001). Devido a seu papel de atração de células para o sítio
4 da lesão, são consideradas muito importantes no processo de defesa do hospedeiro
5 (DENG *et al.*, 2003). Esta produção de elementos quimiotáticos culmina em
6 Infiltrados Inflamatórios, que de acordo com MARINHO *et al.*, (1999), o maior
7 número de parasitos durante a fase aguda da infecção irá refletir em um nível
8 elevado de Infiltrado Inflamatório no músculo cardíaco e esquelético durante a fase
9 aguda. Nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura, pois o
10 grupo **Infectado tratado com lectina** além de apresentar um menor número de
11 parasitos na musculatura cardíaca pela análise dos ninhos presentes no ventrículo
12 observou-se também menor porcentagem da área de Infiltrado Inflamatório em
13 relação ao grupo **Infectado tratado com salina**. Além disso, CAMANDAROBA *et*
14 *al.*, (2001) demonstram que a cepa “Colombiana” acarreta a maior extensão
15 inflamatória entre o vigésimo e trigésimo dias de infecção, período este que
16 realizamos a quantificação do Infiltrado Inflamatório.

17 O controle da disseminação parasitária e a redução das manifestações do
18 hospedeiro atribuídas à presença do parasito estão associados com respostas
19 imune inata e adaptativa direcionadas e eficientes. Vários são os esforços para
20 modular uma resposta eficiente para eliminação e/ou controle de diversos parasitas.
21 Em relação à atividade da lectina *ArtinM* trabalhos anteriores demonstraram que a
22 sua administração favorece um perfil do tipo Th1, principalmente estimulando a
23 síntese de IL-12. Como demonstrado por PANUTO-CASTELO *et al.* (2001) a lectina
24 *ArtinM* favoreceu o controle da infecção por *Leishmania amazonensis* em
25 camundongos Balb/c pela indução ao perfil Th1, com uma maior expressão de IL-12,

1 INF- γ e NO. Também como administração vacinal elevou os níveis de IL-12 e a
2 expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II,
3 CD80 e CD86 (TEXEIRA *et al.*, 2006). Da mesma forma o seu uso contribuiu para o
4 controle da Paracoccidiodomicose experimental, onde encontraram altos níveis de
5 NO, IL-12, INF- γ e TNF- α em animais que receberam a lectina, verificando um perfil
6 oposto nos grupos controles com uma alta expressão de IL-4 e IL-10 (COLTRI *et al.*,
7 2008). Em nossos experimentos a administração da lectina *ArtinM* demonstrou
8 possuir uma atividade biológica semelhante do que se tem descrito em relação à
9 atividade imunoestimulatória. No que se refere aos animais infectados, encontramos
10 uma diminuição a nível sistêmico das citocinas pró-inflamatórias no grupo **Infectado**
11 **tratado com lectina**. Nossos dados mostraram um perfil esperado para a proteção
12 contra o *T.cruzi* em se tratando do comportamento dos níveis de citocinas pró-
13 inflamatórias na musculatura cardíaca e baço; isto favorece o perfil Th1, com
14 aumento de IL-12, IFN- γ e TNF- α (GOLDEN *et al.*, 1991; MUÑOZ *et al.*, 1992;
15 MONCADA, HIGGS, 1993).

16 Curiosamente as citocinas pró-inflamatórias analisadas, embora não
17 mostraram diferenças estatisticamente significantes estavam diminuídas em relação
18 ao grupo **Infectado tratado com salina** e ao mesmo tempo em níveis maiores do
19 que os grupos **Controle tratado com salina e lectina**. Certamente tal quadro
20 acompanha a diminuição parasitária e o aumento de uma citocina antiinflamatória, a
21 IL-10, nos grupos que receberam a lectina *ArtinM*. *In vivo* COLTRI *et al.* (2008),
22 encontraram similaridade nos níveis de IL-10 entre dois grupos de camundongos
23 infectados com *Paracoccidoides brasiliensis*, sendo um deles tratado com *ArtinM* e
24 outro não. O grupo que não recebeu tratamento apresentou elevada concentração

1 de IL-10 e IL-4 enquanto que o grupo que recebeu tratamento observou-se elevados
2 níveis de IL-12, INF- γ e TNF.

3 Além disso, recentemente foi demonstrado que através da possível ligação da
4 lectina com o receptor da Imunoglobulina E (IgE) - Fc ϵ RI - e/ou a IgE ligada a Fc ϵ RI
5 resulta na liberação de mediadores inflamatórios (LTB₄) por células mastócitas, bem
6 como na ativação de fatores transcricionais como o NF κ B e NFAT (BARBOSA-
7 LORENZI *et al.*, 2011). MEUSER-BATISTA *et al.* (2011) ressaltam a importância dos
8 mastócitos como imunomoduladores na infecção pelo *T.cruzi*, assim como, a sua
9 complexidade de interações moleculares para o controle de diferentes vias
10 inflamatórias em diferentes tecidos e compartimentos. Estes pesquisadores após
11 utilizarem um estabilizador de mastócitos em um modelo de DC aguda, puderam
12 observar o aumento da parasitemia, bem como uma mortalidade mais elevada, além
13 de danos cardíacos em comparação com os animais que tinham uma ativação
14 normal dos mastócitos.

15 De acordo com COLTRI *et al.* (2008) a lectina produziu um efeito protetor
16 contra Paracoccidiodomicose pelo estímulo da síntese de IL-12 dependente de *Toll-*
17 *like 2*. BELLOCCHIO *et al.*, (2004) e CHARMOY *et al.* (2007) ressaltaram a
18 contribuição do receptor *Toll-like* na imunidade inata e adaptativa no processo de
19 resistência ao *Aspergillus fumigatus* e na análise de diferentes fenótipos de
20 neutrófilos de camundongos resistentes e susceptíveis à *Leishmania major*. A lectina
21 foi capaz de ativar intensamente os neutrófilos melhorando a capacidade efetora
22 destas células a partir da liberação de mediadores inflamatórios. Desta forma é
23 reportado à resistência contra infecções pela terapia com a lectina *ArtinM* à
24 potencialização dos neutrófilos (TOLEDO, *et al.*, 2009).

1 Contudo nossos dados demonstram uma atividade imunomoduladora
2 atribuída à administração da lectina *ArtinM* em um modelo experimental para DC
3 aguda. Sugerimos que o controle da carga parasitária realizada pela administração
4 da Lectina *ArtinM* está ligada à uma participação e/ou estimulação na imunidade
5 inata e adaptativa, colaborando para a atividade deletéria inicial do hospedeiro
6 contra o parasito, assim como favorecendo o controle do processo inflamatório
7 desencadeado na doença.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

7.-CONCLUSÃO

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12 Concluímos que a lectina *ArtinM* apresenta um efeito biológico em
13 camundongos Balb/C durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T.cruzi*,
14 através dos parâmetros:

- 15 • Diminuição significativa da parasitemia;
- 16 • Melhora parcial do quadro anêmico;
- 17 • Diminuição significativa da porcentagem da área do infiltrado inflamatório no
18 tecido cardíaco;
- 19 • Diminuição significativa do número de ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco;
- 20 • Atividade biológica imunorreguladora com perfil Th1.

21

22

23

24

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

8.-REFERÊNCIAS

- 1 ALIBERTI, J.C.S.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; TEIXEIRA,
2 M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. α -chemokines enhance parasite uptake and
3 promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory
4 macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, v.67, p.4819–4826,
5 1999.
- 6
- 7 ALIBERTI, J.C.S.; SOUTO, J.T.; MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA,
8 M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Modulation of Chemokine
9 Production and Inflammatory Responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-
10 R1- Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am. J. Pathol.*, v.158, n.4,
11 2001.
- 12
- 13 ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the
14 immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* v.155, p.3955-3963,
15 1995.
- 16
- 17 ALBUQUERQUE, D. A.; MARTINS, G. A.; CAMPOS-NETO, A.; SILVA, J. S. The
18 adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl
19 and *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters*, v.68, p.375-381, 1999.
- 20
- 21 ANDERSEN, M.L; *et al.* Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de
22 Experimentação. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo, p.167, 2004.
- 23
- 24 ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma*
25 *cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc.*
26 *Bras. Med Trop.*, Uberaba, v.30, n.1, p.27-35, 1997.
- 27
- 28 ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*
29 v.94, p.71-80, 1999.
- 30
- 31 ANDRADE, Z.A.; ROCHA SILVA, H.R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma*
32 *cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.90, p.521-522, 1995.
- 33
- 34 ANTÚNEZ M.I, CARDONI R.L. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell
35 activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol*
36 *Lett.* v.71, n.2, p.103-109, 2000.
- 37
- 38 ARANGO HG. Bioestatística. Teórica e computacional. *Editores Guanabara Koogan*
39 S.A. 2001.
- 40

- 1 ARANTES, J.M.; FRANCISCO, A.F.; VIEIRA, P.M.; SILVA, M.; ARAÚJO, M.S.S.;
2 CARVALHO, A.T.; PEDROSA, M.L.; CARNEIRO, C.M.; TAFURI, W.L.; MARTINS-
3 FILHO, O.A.; ELÓI-SANTOS, S.M. Trypanosoma cruzi: Desferrioxamine decreases
4 mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect.
5 *Experimental Parasitology*, v.128, p.401–408, 2011
- 6
- 7 ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DC: Manual para experimentação animal.
8 Rio de Janeiro: *Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz*, p.366, 2000.
- 9
- 10 ARETZ, H.T. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human Pathology*, v.18, n.6, p.619-624,
11 1987.
- 12
- 13 BARBOSA-LORENZI, V.C.; BURANELLO, P.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; JAMUR,
14 M.C.; OLIVER, C.; PEREIRA-DA-SILVA, G. The lectin ArtinM binds to mast cells
15 inducing cell activation and mediator release. *Biochem Biophys Res Commun*. v.416,
16 n.3-4, p.318-324, 2011.
- 17
- 18 BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends*
19 *Biochem Sci.*, v.13, n.12, p.480-482. Review, 1988.
- 20
- 21 BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R..Vaccination with epimastigotes of different
22 strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection.
23 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.103, n.4, p.370-374, 2008.
- 24
- 25 BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.E.; GUERRA, J.L. Infecção
26 experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. *Pesq. Vet. Bras*. v.26, n.1, p.31-37,
27 2006.
- 28
- 29 BELKAID Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev*
30 *Immunol*. v.7, n.11, p.875-888, 2007.
- 31
- 32 BELLOCCHIO, S.; MORETTI, S.; PERRUCCIO, K.; FALLARINO, F.; BOZZA, S.;
33 MONTAGNOLI, C.; MOSCI, P.; LIPFORD, G.B.; PITZURRA, L.; ROMANI, L. TLRs
34 Govern Neutrophil Activity in Aspergillosis. *The Journal of Immunology*. v.173,
35 p.7406–7415, 2004.
- 36
- 37 BILATE, A.M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts
38 of na old disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.50, n.2, p.67-74, 2008.
- 39
- 40 BORGES, B.C.R.; REIS, M.A.; CHICA, J.E.L.; PEREIRA, S.A.L.; RODRIGUES, J.V.;
41 CASTELLANO, L.R.C.; RODRIGUES, D.B.R. Papel do óxido nítrico no

- 1 desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo
2 *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, p.1-
3 5, 2009.
- 4
- 5 BORGES, C.L; CECCHINIA, R.; TATAKIHARA, V.L.H; MALVEZI, A.D, YAMADA-
6 OGATTA, S.F.; RIZZO, L.V.; PINGE-FILHO, P. 5-Lipoxygenase plays a role in the
7 control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in
8 murine Chagas' disease. *Immunology Letters* v.123, p.38-45, 2009.
- 9
- 10 BRENER Z. Terapêutica experimental na DC. In Z BRENER, Z ANDRADE, M
11 BARRAL-NETTO (eds), *Trypanosoma cruzi e DC*, 2^a ed., Guanabara Koogan, Rio de
12 Janeiro, p.379-388, 2000.
- 13
- 14 BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally
15 infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, p.389-896,
16 1962.
- 17
- 18 BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes
19 amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Ver Inst Med Trop São Paulo*. v.5, p.220-224, 1963.
- 20
- 21 BRUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extrated fom seeds of
22 *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human
23 T and B cell function. *J. Immunology*. v.127, n.2, p.427-429, 1981.
- 24
- 25 CAMANDAROBA, E.L.P.; CAMPOS, R.F.; MAGALHÃES, J.B.M.; ANDRADE, S.G.
26 Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodemeType III): biological,
27 isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Revista da*
28 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.2, p.151-157, 2001.
- 29
- 30 CARDILLO, F., J. C.; VOLTARELLI, S. G.; REED, and SILVA, J. S. Regulation of
31 *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of
32 NK cells. *Infection and Immunity*. v.64, p.128–134, 1996.
- 33
- 34 CARDOSO, M.R.D.; MOTA, C.M.; RIBEIRO, D.P.; SANTIAGO, F.M.; CARVALHO,
35 J.V.; ARAUJO, E.C.B.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.; ROQUE-BARREIRA, M.C.;
36 MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O. *ArtinM*, a d-mannose-binding lectin from *Artocarpus*
37 *integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization
38 against *Neospora caninum*. *Vaccine*. v.29, p.9183– 9193, 2011.
- 39
- 40 CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo
41 evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do
42 homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.1, p.159-218, 1909.

- 1 CHAHUD, F.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F.S.; HADDAD, A.; ROQUE
2 BARREIRA, M.C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits.
3 *Int. Journal. Exp. Pathology*, v.90, p.166-173, 2009.
- 4
- 5 CHARMOY, M.; MEGNEKOUm R.; ALLENBACH, C.; ZWEIFEL, C.; PEREZ, C.;
6 MONNAT, K.; BRETON, M.; RONET, C.; LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.
7 *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or
8 susceptible to infection. *Journal of Leukocyte Biology*. v.82, p.288–299, 2007.
- 9
- 10 COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.;
11 MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA,
12 M. C. Therapeutic Administration of KM⁺ Lectin Protects Mice Against
13 *Paracoccidioides brasiliensis* Infection via Interleukin-12 Production in a Toll-Like
14 Receptor 2-Dependent Mechanism. *American Journal of Pathology*. v.173, p.423-
15 432, 2008.
- 16
- 17 COURA, J.R. & CASTRO, S.L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy.
18 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n.1, p.3-24, 2002.
- 19
- 20 COUTINHO, M; DIAS, JCP. A descoberta da DC. *Cadernos de Ciência &*
21 *Tecnologia, Brasília*, v.16, n.2, p.11-51, 1999.
- 22
- 23 CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. Estudo da DC:
24 abordagem molecular. *Revista Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*,
25 *São Paulo*. v.5, n.2, p.217-229, 1995.
- 26
- 27 CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; BARBOSA DE OLIVEIRA, L. C.; LIMA, G. C.;
28 ABRAHAMSOHN, I.. *Trypanosoma cruzi*: maintenance of parasite-specific T cell
29 responses in lymph nodes during the acute phase of the infection. *Exp. Parasitol.*
30 v.70, n.41, p.164–174, 1990.
- 31
- 32 DAVILA, D.F.; ANGEL, F.; BELLABARBA, G.A.; DONIS, J.H. Effects of metoprolol in
33 chagasic patients with severe congestive heart failure. *Int J Cardiol* v.85, p.255-260,
34 2002.
- 35
- 36 DE SOUSA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic
37 approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, v.3,
38 n.1, 2002.
- 39
- 40 DE SOUZA, E.; ARAUJO, J.T.C.; BAILLY, C.; LANSIAUX, A.; BATISTA, M.M.;
41 OLIVEIRA, G.M.; SOEIRO, M.N. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma*

- 1 *cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res.* v.314, p.223–235,
2 2003.
- 3
- 4 DENG, C.; RADU, C.; DIAB A.; TSEN M. F.; COWDERY, R. J. S.; RACKE M. K.;
5 THOMAS, J. A. IL-1 receptor-associated kinase-1 regulates susceptibility to organ-
6 specific autoimmunity. *J Immunol.* v.170, n.6, p.2833-2842, 2003.
- 7
- 8 DIAS J.C.P. Chagas disease: successes and challenges. *Cadernos de Saúde*
9 *Pública.* v.22, p.2020-2021, 2006.
- 10
- 11 DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C. *et al.* O Controle da DC no Brasil. In: O Controle da
12 DC nos Países do Cone Sul da América. *FMTM, Uberaba*, p.146-250, 2002.
- 13
- 14 DIAZ, P.H.; GONZÁLEZ, O.M.; VÉLEZ, Y.R.P.; BÁEZ, F.A.G. Aplicaciones de lãs
15 lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, v.15, p.91-95, 1999.
- 16
- 17 DOYLE, P.S.; ZHOU, Y.M.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A cysteine protease
18 inhibitor cures Chagas' Disease in an immunodeficient-mouse model of infection.
19 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v.51, p.3932-3939, 2007.
- 20
- 21 DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol*, v.9,
22 p.237-264, 1993.
- 23
- 24 FRANCO, M. G. Centro de desenvolvimento de modelos experimentais:
25 Cedeme/cobea da Universidade de São (UNIFESP-EPM). Disponível em: <www.cobea.org.br/animais.htm>. Acesso em 15 de junho de 2005.
- 26
- 27
- 28 GANIKO, L.; MARTINS, A.R.; ESPREAFICO, E.N.; ROQUE-BARREIRA, M.C.
29 Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconjugate J.* v.15, p.527-530,
30 1998.
- 31
- 32 GOLDEN, J.M.; TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on
33 macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol.* v.72, p.391–402, 1991.
- 34
- 35 GOLDSTEIN, I. J.; COLIN HUGHES, R.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N.
36 What should be called a lectin?. *Nature*, v.285, p.66, 1980.
- 37
- 38 GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.;
39 GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe

- 1 cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune
2 response. *Infection and Immunity*. v.71, p.1185-1193, 2003.
- 3
- 4 HALLY, A. A counting method for measuring the volumes of tissue components in
5 microscopical sections. *Quarterly J Microsc Sci*. v.105, p.503, 1964.
- 6
- 7 HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.;
8 BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme
9 susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon
10 receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*. v.66, p.1208-
11 1215, 1998.
- 12
- 13 HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.;
14 MURPHY, K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by
15 *Listeria*-induced macrophages. *Science*, v.260, p.547-549, 1993.
- 16
- 17 KIRCHHOFF LV, WEISS LM, WITTNER M, TANOWITZ HB. Parasitic diseases of
18 the heart. *Front Biosci*. n.9, p.706-723, 2004.
- 19
- 20 KIRCHHOFF, L. V.. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin*
21 *North Am*, Sep, v. 25, n.3, p.517-533, 1996.
- 22
- 23 KIRCHHOFF, L. V.; PAREDES, P.; LOMELÍ-GUERRERO, A.. Transfusion-
24 associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for
25 transfusion medicine in the United States. *Transfusion*, Feb, v.46, n.2, p.298-304,
26 2006.
- 27
- 28 KIRCHHOFF, L. V.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Parasitic diseases of the heart.
29 *Front Biosci*, v. 9, p.706-723, 2004.
- 30
- 31 LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e DC. In: NEVES, D.P. *Parasitologia*
32 *Humana* 10ª ed. São Paulo: Atheneu, cap.11, p.73-96, 2003.
- 33
- 34 LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L.; PRATA, A.R. DC. In: BRASILEIRO
35 FILHO, G. *Bogliolo Patologia*, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.33,
36 p.1165-1185, 2000.
- 37
- 38 LUGONES, H.S. Enfermedad de Chagas Diagnóstico de su faz aguda. Ediciones
39 Universidad Católica de Santiago Del Estero, República Argentina. *Secretaria de*
40 *Ciência e Técnica Instituto de Biomedicina*, 2001.
- 41

- 1 LUJÁN, H.D.; BRONIA, D.H. Intermembrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi*-
2 induced erythrocyte membrane destabilization. *Parasitology*. v.108, p.323-334, 1994.
3
- 4 MAGRAM, J.; CONNAUGHTON, S. E.; WARRIER, R. R.; CARVAJAL, D. M.;
5 WARRIER, R. R.; CARVAJAL, D. M.; WU, C-Y.; FERRANTE, J.; STEWART, C.;
6 SARMIENTO, U.; FAHERTY, D. A.; GATELY, M. K. IL-12-Deficient Mice Are
7 Defective in IFN γ Production and Type 1 Cytokine Responses. *Immunity*, v.4, p.471-
8 481, 1996.
9
- 10 MALVEZI, A.D.; CECCHINI, R.; SOUZA, F.; TADOKORO, C.E.; RIZZO, L.V.;
11 PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress
12 associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol*
13 *Med Microbiol*. v.41, p.69-77, 2004.
14
- 15 MANDARIN-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
- 18 MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.;
19 PICCINNI, M.P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; TRINCHIERI,
20 G. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma)
21 production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-
22 gamma production in established Th2 cell clones. *Journal of Experimental Medicine*,
23 v.179, p.1273-1283, 1994.
24
- 25 MARCONDES, M.C.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma*
26 *cruzi* infection is associated with anaemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone
27 marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* v.4, p.347-352,
28 2000.
29
- 30 MARIANO F.S.; GUTIERREZ F.R.; PAVANELLI W.R.; MILANEZI C.M.; CAVASSANI
31 K.A.; MOREIRA A.P.; FERREIRA B.R.; CUNHA F.Q.; CARDOSO C.R.; SILVA J.S.;
32 The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi*
33 infection. *Microbes and Infection*, v.10, p.825-833, 2008.
34
- 35 MARINHO, C.R.F.; LIMA, M.R.D.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J. M. Influence of
36 acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune
37 system at the late chronic phase of chagas disease. *Infection and Immunity*, v.67,
38 n.1, p.308-318, 1999.
39
- 40 MATTNER, F.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; LAUNOIS, P.; DI PADOVA, K.; BEHIN,
41 R.; GATELY, M. K.; LOUIS, J.A.; ALBER, G. Genetically resistant mice lacking
42 interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a
43 polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol*, v.7, p.1553-1559, 1996.

- 1 MEUSER-BATISTA, M; CORRÊA, J.R.; CARVALHO, V.F.; DE CARVALHO BRITTO,
2 C.F.; DA CRUZ MOREIRA, O.; BATISTA, M.M.; SOARES, M.J.; FILHO, F.A.; SILVA,
3 P.M.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, R.C.; HENRIQUES-PONS, A. Mast cell function
4 and death in *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* v.179, n.4, p.1894-1904,
5 2011.
- 6
- 7 MEZADRI, T. J; THOMÁZ, V. A; AMARAL, V. L. L. Animais de laboratório: cuidados
8 na iniciação experimental. *Florianópolis, UFSC*, p.154, 2004.
- 9
- 10 MICHELIN, M. A., SILVA, J. S., CUNHA, F. Q. Inducible ciclooxigenase released
11 prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental
12 *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* v.111, p.71-79, 2005.
- 13
- 14 MIRANDA-SANTOS, J. K.; MENGEL, J. O. JUNIOR; BUNN-MORENO, M. M.;
15 CAMPOS –NETO, A. Activation of T and B cell by a crude extract of *Artocarpus*
16 *integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. *J.Immunology methods.* v.140,
17 n.2, p.197-203, 1991.
- 18
- 19 MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* v.329,
20 p.2002–2012, 1993.
- 21
- 22 MOREIRA, R. A.; AINOUIZ, I.L. Isolectin from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds.
23 *Plant. Physiol.*, v.61, n.118, p.650, 1978.
- 24
- 25 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.; FRESNO, M. Synergism between
26 tumour necrosis factor a and interferon g on macrophage activation against
27 intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Eur J*
28 *Immunol.* v.22, p.301-307, 1992.
- 29
- 30 MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Activation of human
31 macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-
32 gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology Letters.* v.33,
33 p.35-40, 1992.
- 34
- 35 OFEK, I.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human
36 mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*, v.265, p.623 – 625, 1977.
- 37
- 38 OLIVEIRA, RAG; MURINO, BB; PEREIRA, J; OSHIRO, M. Hemograma – Como
39 fazer e interpretar. *Livraria Médica Paulista Editora*, São Paulo, 2007.
- 40

- 1 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD (PAHO). Estimación cuantitativa de
2 la enfermedad de Chagas en las Américas. Geneva, *Ref Type: Pamphlet*.
3 *Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)*, 2006.
- 4
- 5 PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S.
6 KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by
7 macrophages and switches from type 2 to type 1 cellmediated immunity against
8 *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection.
9 *Glycobiology*. v.11, p.1035-1042, 2001.
- 10
- 11 PARADA, H.; CARRASCO, H. A.; ANEZ, N.. Cardiac involvement is a constant
12 finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological
13 study. *Int J Cardiol*, Jun, v. 60, p.49-54, 1997.
- 14
- 15 PEREIRA, J.B.; WILCOX, H.P.; COURA, J.R. The evolution of chronic chagasic
16 cardiopathy: I: the influence of parasitemia. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.25, p.101-108,
17 1992.
- 18
- 19 PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAMME, E. J. *ArtinM*: a
20 rational substitution for the names artocarpin and KM+. *Elsevier Editorial System(tm)*
21 *for Immunology Letters*, 2008.
- 22
- 23 PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; JUNIOR-FERREIRA, A.G.;
24 COURA, J.R. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study
25 of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005.
26 *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.41, n.6, p.602-614, 2008.
- 27
- 28 PRATA, A. Classificação da infecção chagásica no homem. *Revista da Sociedade*
29 *Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.3, n.2, p.109-113, 1990.
- 30
- 31 RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broadspectrum activity.
32 *Parasitol. Res*, n.90, p.S19–S39, 2003.
- 33
- 34 RASSI, A.; RASSI, Jr.A, RASSI, G.G. Fase aguda. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-
35 Netto M (orgs) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas 2a. edição. *Editora*
36 *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, p.431, 2000.
- 37
- 38 REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.;
39 MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-
40 OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are
41 associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*,
42 v.81, p.68-75, 2006.

- 1 REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Manifestações digestivas na DC. In: DANI, R.;
2 CASTRO, L. P. *Gastroenterologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2,
3 p.1160-1168, 1981.
- 4
- 5 RODRIGUES W.F; MIGUEL, C.B; CHICA J.E; NAPIMOGA M.H. 15d-PGJ₂
6 modulates acute immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst*
7 *Oswaldo Cruz*. v.105, p.137-143, 2010.
- 8
- 9 ROQUE-BARREIRA, M. C. Efeitos biológicos e aplicações farmacêuticas de lectinas.
10 Projeto Temático da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto enviado a FAPESP,
11 Ribeirão Preto, 2006.
- 12
- 13 ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: An IgA binding lectin. *J.*
14 *Immunology*, v.134, n.3, p.1740-1743, 1985.
- 15
- 16 ROQUE-BARREIRA, M. C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.
17 J.; CAMPOSNETO, A. IgA affinity purification and characterization of lectin jacalin.
18 *Braz J. Med. Biol. Res*, v.19, n.2, p.149-57, 1986.
- 19
- 20 ROSSI, M.A. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. *São Paulo Med J*. v.113,
21 p.750-756, 1995.
- 22
- 23 SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M. O.; BELTRAMINI,
24 L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration inducing lectin from
25 *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol*. v.153, p.1798-1807, 1994.
- 26
- 27 SCHULTZE, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B.F;
28 ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's veterinary hematology. 5th. Ed.
29 *Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins*, p.366-381, 2000.
- 30
- 31 SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly
32 on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ production and diminishes
33 interleukin 4 inhibition of such priming. *Proceedings of the National Academy of*
34 *Sciences of the United States of America*, v.90, n.21, p.9744-9807, 1993.
- 35
- 36 SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Science American*, Jan,
37 v.268, n.1, p.82-89,1993.
- 38
- 39 SHARON, N.; LIS, H. Lectins. *London: Chapinan &Hall*, p.127, 1989.
- 40

- 1 SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-
2 derived cytokines. *Annual Review of Immunology*. v.10, p.385-409, 1992.
- 3
- 4 SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON,
5 D.; REED, S.G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental
6 *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. v.175, p.169-
7 174, 1992.
- 8
- 9 SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor
10 necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by
11 inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages.
12 *Infection and Immunity*. v.63, p.4862-4867, 1995.
- 13
- 14 SILVA, T.A. Efeito biológico da Lectina *ArtimM* em camundongos Balb/C durante a
15 fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Universidade Federal Do Triângulo*
16 *Mineiro*, Uberaba, 2009.
- 17
- 18 SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The
19 Netherlands. *Vet Q*, v.10, n.1, p.1-16, 1988.
- 20
- 21 STEVENS, A. The haematoxylin. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. Theory and
22 practice of histological techniques. *New York: Churchill Livingstone*, cap.7, p.109-
23 144, 1982.
- 24
- 25 STILLMARK H. Über rizin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L,
26 und einigen anderen euphorbiaceen. Inaugural dissertation, *Dorpat (Tartu)*, 1888.
- 27
- 28 TAFURI W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*
29 v.29, n.4, p194-199, 1987.
- 30
- 31 TATAKIHARA, V.L.; CECCHINI, R.; BORGES, C.L.; MALVEZI, A.D.; GRAC; A-DE
32 SOUZA, V.K.; YAMADA-OGATTA, S.F. Effects of cyclooxygenase inhibitors on
33 parasite burden, anaemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi*
34 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. v.52, p.47-58, 2008.
- 35
- 36 TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in
37 Chagas disease - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.101, p.463-491, 2006.
- 38
- 39 TEIXEIRA, C.R.; CAVASSANI, K.A.; GOMES, R.B.; TEIXEIRA, M.J.; ROQUE-
40 BARREIRA, M.C.; CAVADA, B.S.; SILVA, J.S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.

- 1 Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection.
2 *Vaccine*. v.24, n.15, p.3001-3008, 2006.
3
- 4 TOLEDO, K.A.; SCWARTZ, C.; OLIVEIRA, A.F.; CONRADO, M.C.A.V.;
5 BERNARDES, E.S.; FERNANDES, L.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; PEREIRA-DA-
6 SILVA, G.; MORENOA, A.N. Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of
7 inflammatory mediators and enhancement of effector functions. *Immunology Letters*.
8 v.123, p.14-20, 2009.
9
- 10 TRINCHIERI, G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory
11 Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity.
12 *Annual Review of Immunology*, v.13, p. 251-276, 1995.
13
- 14 UMEKITA, L.F.; MOTA, I. Role of platelets in the in vivo removal of T.cruzi from
15 circulation. *Braz J Med Biol Res*. v.23, n.6-7, p.593-596, 1990.
- 16 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease.Tropical disease research In:
17 Eighteenth programme report of UDNPD/World bank/ WHO Special Programme for
18 Research and training in tropical disease research: progress 1995-1996. Geneva:
19 WHO, p.112-123, 2002.
20
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas'disease, Brazil. *Wkly Epidemiol Rec*.
22 v.75, p.153-155, 2000.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

8.-ANEXOS

1 **Anexo 1** Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos **Infectado tratado**
 2 **com Salina e Infectado tratado com Lectina** em relação ao sétimo dia de infecção.
 3

| Animal | Parasitos/mL | |
|---------|---------------------------|-------------------|
| | 7º dia de infecção | |
| | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 0,0 | 0,0 |
| 3 | 13.333,3 | 6.666,6 |
| 4 | 0,0 | 6.666,6 |
| 5 | 6.666,6 | 0,0 |
| 6 | 6.666,6 | 6.666,6 |
| 7 | 0,00 | 6.666,6 |
| 8 | 0,00 | 0,0 |
| 9 | 6.666,6 | 6.666,6 |
| 10 | 6.666,6 | 0,0 |
| Mediana | 3.333,0 | 3.333,0 |
| Máx | 13.333,0 | 6.667,0 |
| Mín | 0,0 | 0,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

4
5
6
7
8
9

Anexo 2 Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos **Infectado tratado**
com Salina e Infectado tratado com Lectina em relação ao décimo quarto dia de infecção.

| Animal | Parasitos/mL | |
|---------|----------------------------|-------------------|
| | 14º dia de infecção | |
| | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 493.333,3 | 233.333,3 |
| 2 | 780.000,0 | 306.666,6 |
| 3 | 993.333,3 | 300.000,0 |
| 4 | 420.000,0 | 306.666,6 |
| 5 | 873.333,3 | 366.666,6 |
| 6 | 220.000,0 | 206.666,6 |
| 7 | 340.000,0 | 180.000,0 |
| 8 | 280.000,0 | 320.000,0 |
| 9 | 353.333,3 | 313.333,3 |
| 10 | 300.000,0 | 300.000,0 |
| Mediana | 386.667,0 | 303.333,0 |
| Máx | 993.333,0 | 366.667,0 |
| Mín | 220.000,0 | 180.000,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

10
11
12
13
14
15
16

1 **Anexo 3** Valores referentes à Parasitemia (número de parasitos/ml) nos grupos **Infectado tratado**
 2 **com Salina e Infectado tratado com Lectina** em relação ao vigésimo primeiro dia de infecção.
 3

| Animal | Parasitos/mL | |
|--------|---------------------|-------------------|
| | 21º dia de infecção | |
| | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 4.133.333,3 | 2.533.333,3 |
| 2 | 6.960.000,0 | 2.346.666,6 |
| 3 | 5.986.666,6 | 5.166.666,6 |
| 4 | 4.953.333,3 | 3.166.666,6 |
| 5 | 7.580.000,0 | 3.246.666,6 |
| 6 | 2.960.000,0 | 2.813.333,3 |
| 7 | 6.500.000,0 | 2.240.000,0 |
| 8 | 3.933.333,3 | 2.326.666,6 |
| 9 | 3.206.666,6 | 1.440.000,0 |
| 10 | 5.960.000,0 | 2.873.333,3 |
| Média | 5.217.000,0 | 2.815.000,0 |
| EPM | 510.332,0 | 309.159,0 |
| DP | 1.614.000,0 | 977.647,0 |

EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

4

5

6 **Anexo 4** Valores das Hemácias/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 7 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

8

| Animal | Hemácias/mm ³ | | | |
|---------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 8.250.000,0 | 9.380.000,0 | 6.860.000,0 | 7.635.000,0 |
| 2 | 9.955.000,0 | 9.145.000,0 | 6.565.000,0 | 7.045.000,0 |
| 3 | 9.905.000,0 | 9.155.000,0 | 7.230.000,0 | 6.675.000,0 |
| 4 | 9.040.000,0 | 10.260.000,0 | 7.480.000,0 | 7.085.000,0 |
| 5 | 10.165.000,0 | 9.250.000,0 | 6.625.000,0 | 8.030.000,0 |
| Mediana | 9.905.000,0 | 9.250.000,0 | 6.860.000,0 | 7.085.000,0 |
| Máx | 10.170.000,0 | 10.260.000,0 | 7.480.000,0 | 8.030.000,0 |
| Mín | 8.250.000,0 | 9.145.000,0 | 6.565.000,0 | 6.675.000,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

9

10

11 **Anexo 5** Valores do Hematócrito (%) nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 12 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

13

| Animal | Hematócrito (%) | | | |
|--------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 39,4 | 46,1 | 32,7 | 35,2 |
| 2 | 47,8 | 45,3 | 30,2 | 31,8 |
| 3 | 48,1 | 44,3 | 32,4 | 30,1 |
| 4 | 43,3 | 49,8 | 33,5 | 31,9 |
| 5 | 49,2 | 44,5 | 31,3 | 36,6 |
| Média | 45,6 | 46,0 | 32,0 | 33,2 |
| EPM | 1,8 | 1,0 | 0,58 | 1,2 |
| DV | 4,1 | 2,2 | 1,3 | 2,7 |

EPM = Erro Padrão da Média; DV = Desvio Padrão

14

1 **Anexo 6** Valores do Volume Corpuscular Médio (fL) nos grupos **Controle tratado com Salina,**
 2 **Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 3

| Volume Corpuscular Médio (fL) | | | | |
|-------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 48,0 | 49,0 | 48,0 | 46,0 |
| 2 | 48,0 | 50,0 | 46,0 | 45,0 |
| 3 | 48,5 | 48,5 | 45,0 | 45,0 |
| 4 | 48,0 | 48,5 | 45,0 | 45,0 |
| 5 | 48,5 | 48,0 | 47,0 | 45,5 |
| Mediana | 48,0 | 48,5 | 46,0 | 45,0 |
| Máx | 48,5 | 50,0 | 48,0 | 46,0 |
| Mín | 48,0 | 48,0 | 45,0 | 45,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

4

5

6 **Anexo 7** Valores da Hemoglobina (g/dL) nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 7 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

8

| Hemoglobina (g/dL) | | | | |
|--------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 13,5 | 16,1 | 11,5 | 12,4 |
| 2 | 16,1 | 15,8 | 10,7 | 11,0 |
| 3 | 16,7 | 15,0 | 11,4 | 10,5 |
| 4 | 15,3 | 17,0 | 11,8 | 11,3 |
| 5 | 17,0 | 15,6 | 10,8 | 12,6 |
| Média | 15,7 | 15,9 | 11,3 | 11,6 |
| EPM | 0,6 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |
| DV | 1,4 | 0,7 | 0,5 | 0,9 |

EPM = Erro Padrão da Média; DV = Desvio Padrão

9

10

11 **Anexo 8** Valores da Hemoglobina Corpuscular Média (pg) nos grupos **Controle tratado com Salina,**
 12 **Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

13

| Hemoglobina Corpuscular Média (pg) | | | | |
|------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 16,4 | 17,1 | 16,8 | 16,3 |
| 2 | 16,2 | 17,3 | 16,2 | 15,6 |
| 3 | 16,9 | 16,4 | 15,9 | 15,7 |
| 4 | 16,9 | 16,6 | 15,8 | 16,0 |
| 5 | 16,7 | 16,8 | 16,3 | 15,7 |
| Média | 16,7 | 16,9 | 16,2 | 15,9 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| DP | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 |

EPM = Erro Padrão da Média; DV = Desvio Padrão

14

15

16

17

1 **Anexo 9** Valores da Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW) em % nos grupos
 2 **Controle tratado com Salina, Controle tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e**
 3 **Infectado tratado com Lectina.**
 4

| Animal | RDW (%) | | | |
|---------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 13,5 | 13,6 | 16,2 | 14,8 |
| 2 | 13,6 | 16,3 | 15,4 | 15,0 |
| 3 | 14,4 | 14,0 | 15,0 | 15,1 |
| 4 | 13,6 | 14,2 | 14,9 | 15,3 |
| 5 | 13,7 | 13,6 | 15,9 | 15,2 |
| Mediana | 13,6 | 14,0 | 15,4 | 15,1 |
| Máx | 14,4 | 16,3 | 16,2 | 15,3 |
| Mín | 13,5 | 13,6 | 14,9 | 14,8 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

5
6
7

Anexo 10 Valores dos Reticulócitos/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle**
 8 **tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 9

| Animal | Reticulócitos/mm ³ | | | |
|---------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 21.450,0 | 35.644,0 | 19.208,0 | 56.499,0 |
| 2 | 16.923,5 | 19.204,5 | 57.115,5 | 62.700,5 |
| 3 | 21.791,0 | 19.225,5 | 28.920,0 | 39.382,5 |
| 4 | 18.080,0 | 17.442,0 | 42.636,0 | 65.182,0 |
| 5 | 20.330,0 | 24.050,0 | 39.087,5 | 57.816,0 |
| Mediana | 20.330,0 | 19.226,0 | 39.088,0 | 57.816,0 |
| Máx | 21.791,0 | 35.644,0 | 57.116,0 | 65.182,0 |
| Mín | 16.924,0 | 17.442,0 | 19.208,0 | 39.383,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

10
11
12

Anexo 11 Valores das Plaquetas/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 13 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 14

| Animal | Plaquetas/mm ³ | | | |
|--------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 334.555,0 | 264.800,0 | 201.630,0 | 384.035,0 |
| 2 | 462.590,0 | 284.600,0 | 225.740,0 | 156.800,0 |
| 3 | 238.060,0 | 435.685,0 | 360.450,0 | 254.300,0 |
| 4 | 123.690,0 | 369.750,0 | 242.500,0 | 208.500,0 |
| 5 | 289.724,0 | 247.650,0 | 164.900,0 | 260.840,0 |
| Média | 289.724,0 | 320.497,0 | 239.044,0 | 252.895,0 |
| EPM | 55736,0 | 35631,0 | 33034,0 | 37728,0 |
| DP | 124628,0 | 79674,0 | 73867,0 | 84362,0 |

EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

15
16
17
18

1 **Anexo 12** Valores dos Leucócitos Totais/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle**
 2 **tratado com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

3

| Leucócitos Totais/mm ³ | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 3.300,0 | 3.450,0 | 5.050,0 | 10.500,0 |
| 2 | 3.550,0 | 3.150,0 | 5.950,0 | 3.950,0 |
| 3 | 3.100,0 | 5.200,0 | 3.950,0 | 5.250,0 |
| 4 | 3.850,0 | 5.750,0 | 4.800,0 | 7.900,0 |
| 5 | 2.400,0 | 8.850,0 | 3.700,0 | 7.750,0 |
| Mediana | 3.300,0 | 5.200,0 | 4.800,0 | 7.750,0 |
| Máx | 3.850,0 | 8.850,0 | 5.950,0 | 10.500,0 |
| Mín | 2.400,0 | 3.150,0 | 3.700,0 | 3.950,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

4

5

6 **Anexo 13** Valores dos Neutrófilos/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 7 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

8

| Neutrófilos/mm ³ | | | | |
|-----------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 726,0 | 724,5 | 1.111,0 | 1.260,0 |
| 2 | 532,5 | 724,5 | 833,0 | 1.185,0 |
| 3 | 899,0 | 1.248,0 | 711,0 | 682,5 |
| 4 | 693,0 | 1.265,0 | 1.248,0 | 1.580,0 |
| 5 | 336,0 | 1.593,0 | 703,0 | 2.170,0 |
| Média | 637,3 | 1111,0 | 921,2 | 1376,0 |
| EPM | 95,2 | 169,3 | 110,1 | 245,2 |
| DP | 212,9 | 378,7 | 246,2 | 548,4 |

EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

9

10

11 **Anexo 14** Valores dos Linfócitos/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 12 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**

13

| Linfócitos/mm ³ | | | | |
|----------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| Animal | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 2.574,0 | 2.725,5 | 3.838,0 | 8.715,0 |
| 2 | 2.982,0 | 2.425,5 | 4.700,5 | 2.607,0 |
| 3 | 2.201,0 | 3.900,0 | 3.199,5 | 4.515,0 |
| 4 | 3.157,0 | 4.427,5 | 3.504,0 | 6.083,0 |
| 5 | 2.064,0 | 7.257,0 | 2.960,0 | 5.425,0 |
| Mediana | 2.574,0 | 3.900,0 | 3.504,0 | 5.425,0 |
| Máx | 3.157,0 | 7.257,0 | 4.701,0 | 8.715,0 |
| Mín | 2.064,0 | 2.426,0 | 2.960,0 | 2.607,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

14

15

16

17

1 **Anexo 15** Valores dos Monócitos/mm³ nos grupos **Controle tratado com Salina, Controle tratado**
 2 **com Lectina, Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 3

| Animal | Monócitos/mm ³ | | | |
|---------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| | Controle Salina | Controle Lectina | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 0,0 | 0,0 | 101,0 | 525,0 |
| 2 | 35,5 | 0,0 | 416,5 | 158,0 |
| 3 | 0,0 | 52,0 | 39,5 | 52,5,0 |
| 4 | 0,0 | 57,5 | 48,0 | 237,0 |
| 5 | 0,0 | 0,0 | 37,0 | 155,0 |
| Mediana | 0,0 | 0,0 | 48,0 | 158,0 |
| Máx | 35,5 | 57,5 | 416,5 | 525,0 |
| Mín | 0,0 | 0,0 | 37,0 | 52,5 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

4

5 **Anexo 16** Valores da porcentagem da área de Infiltrado Inflamatório no coração nos grupos
 6 **Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 7

| Animal | % da área do Infiltrado Inflamatório no coração | |
|--------|---|-------------------|
| | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 14,6 | 2,7 |
| 2 | 14,0 | 5,2 |
| 3 | 9,5 | 6,9 |
| 4 | 9,6 | 5,1 |
| 5 | 7,9 | 4,1 |
| 6 | 9,1 | 6,5 |
| 7 | 7,1 | 2,4 |
| 8 | 14,5 | 3,9 |
| 9 | 8,0 | 2,6 |
| 10 | 10,7 | 2,5 |
| Média | 10,5 | 4,2 |
| EPM | 0,9 | 0,5 |
| DV | 2,9 | 1,7 |

EPM = Erro Padrão da Média; DV = Desvio Padrão

8

9 **Anexo 17** Valores da quantificação dos Ninhos de *T.cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica
 10 (cm²) nos grupos **Infectado tratado com Salina e Infectado tratado com Lectina.**
 11

| Animal | Quantificação dos ninhos de <i>T.cruzi</i> no tecido cardíaco | |
|---------|---|-------------------|
| | Infectado Salina | Infectado Lectina |
| 1 | 226.045,0 | 38.762,4 |
| 2 | 286.995,9 | 119.079,3 |
| 3 | 162.601,2 | 66.420,2 |
| 4 | 292.184,7 | 76.928,7 |
| 5 | 351.341,6 | 50.235,1 |
| 6 | 176.683,0 | 40.450,4 |
| 7 | 217.491,8 | 79.567,2 |
| 8 | 244.238,3 | 89.174,5 |
| 9 | 204.304,7 | 10.614,1 |
| 10 | 115.183,9 | 25.506,1 |
| Mediana | 221.768,0 | 58.328,0 |
| Máx | 351.342,0 | 119.079,0 |
| Mín | 115.184,0 | 10.614,0 |

Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

1 **Anexo 18** Valores da citocina TNF em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Controle tratado com Salina** e
 2 **Controle tratado com Lectina**

3

| TNF - Controles | | | | | | |
|-----------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 0,0 | A/I | 227,0 | 592,9 | 345,0 | 800,9 |
| 2 | 0,0 | 0,0 | 223,1 | 352,9 | 500,1 | 873,2 |
| 3 | 0,0 | 0,0 | 249,7 | 331,2 | 728,8 | 664,6 |
| 4 | A/I | A/I | 333,9 | 412,9 | 557,6 | 799,6 |
| 5 | A/I | 0,0 | 223,3 | 350,1 | 533,5 | 842,4 |
| 6 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 7 | 6,9 | A/I | - | - | - | - |
| 8 | 0,0 | 0,0 | - | - | - | - |
| 9 | A/I | 1,1 | - | - | - | - |
| 10 | 0,0 | 6,2 | - | - | - | - |
| Média | 1,1 | 1,2 | 230,8 | 361,8 | 533,0 | 796,2 |
| EPM | 1,1 | 1,0 | 6,3 | 17,7 | 61,4 | 35,6 |
| DP | 2,8 | 2,4 | 12,7 | 35,4 | 137,3 | 79,7 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

4

5

6

7 **Anexo 19** Valores da citocina TNF em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Infectado tratado com Salina** e
 8 **Infectado tratado com Lectina**.

9

| TNF - Infectados | | | | | | |
|------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 94,4 | 109,8 | 627,2 | 679,5 | 747,5 | 707,4 |
| 2 | 203,8 | 69,3 | 690,2 | 726,2 | 405,2 | 570,9 |
| 3 | A/I | A/I | 446,6 | 421,7 | 608,4 | 474,7 |
| 4 | A/I | A/I | 515,1 | 369,5 | 430,6 | 643,2 |
| 5 | 151,0 | 60,1 | 615,5 | 347,3 | 447,9 | 429,2 |
| 6 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 7 | 239,6 | 45,0 | - | - | - | - |
| 8 | 102,8 | 45,0 | - | - | - | - |
| 9 | 113,2 | 98,6 | - | - | - | - |
| 10 | 86,3 | 26,9 | - | - | - | - |
| Média | 141,6 | 65,0 | 578,9 | 508,8 | 527,9 | 565,1 |
| EPM | 22,4 | 11,4 | 43,4 | 80,4 | 65,4 | 51,5 |
| DP | 59,4 | 30,2 | 97,0 | 179,9 | 146,3 | 115,1 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

10

11

12

13

14

15

1 **Anexo 20** Valores da citocina IL-12 p40 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Controle tratado com**
 2 **Salina e Controle tratado com Lectina**
 3

| IL-12 p40 – Controles | | | | | | |
|-----------------------|----------------|--------------|----------------|----------------|-------------------|--------------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 207,5 | 578,3 | 1.273,7 | 1.208,0 | 360,4 | 746,9 |
| 2 | 116,1 | 457,6 | 1.369,3 | 1.171,1 | 517,5 | 642,9 |
| 3 | 234,9 | 557,4 | 1.210,9 | 1.114,6 | 457,3 | 568,7 |
| 4 | 156,3 | 412,3 | 1.386,5 | 1.150,2 | 482,5 | 607,9 |
| 5 | 152,9 | 268,5 | 939,8 | 1.107,2 | 468,9 | 622,6 |
| 6 | A/I | 182,7 | - | - | - | - |
| 7 | A/I | 323,0 | - | - | - | - |
| 8 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 9 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 10 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| Mediana/Média | 156,3 | 412,3 | 1.274,0 | 1.150,0 | 457,3 | 637,7 |
| Máx/EPM | 234,9 | 578,3 | 1.386,0 | 1.208,0 | 26,2 | 29,9 |
| Min/DP | 116,1 | 182,8 | 939,8 | 1.107,0 | 58,7 | 66,8 |

A/I = amostra insuficiente; Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

4
5
6
7
8
9

7 **Anexo 21** Valores da citocina IL-12 p40 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Infectado tratado com**
 8 **Salina e Infectado tratado com Lectina.**

| IL-12 p40 - Infectados | | | | | | |
|------------------------|----------------|--------------|----------------|----------------|-------------------|--------------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 779,2 | 422,1 | 2.849,8 | 3.295,0 | 984,2 | 729,9 |
| 2 | 795,3 | 470,9 | 3.438,9 | 3.281,9 | 800,0 | 752,5 |
| 3 | A/I | 433,2 | 3.083,2 | 2.810,6 | 953,7 | 854,2 |
| 4 | 719,9 | A/I | 3.406,3 | 3.239,4 | 885,9 | 920,9 |
| 5 | 749,9 | A/I | 3.235,9 | 2.794,2 | 915,2 | 825,9 |
| 6 | 466,7 | 293,0 | - | - | - | - |
| 7 | A/I | 171,6 | - | - | - | - |
| 8 | 209,3 | 94,9 | - | - | - | - |
| 9 | 462,5 | 29,9 | - | - | - | - |
| 10 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| Média | 597,6 | 273,7 | 3.203,0 | 3.084,0 | 907,8 | 816,7 |
| EPM | 84,0 | 67,0 | 108,9 | 115,5 | 31,7 | 34,6 |
| DP | 222,3 | 177,3 | 243,5 | 258,2 | 70,9 | 77,4 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

10
11
12
13
14
15
16

1 **Anexo 22** Valores da citocina IL-10 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Controle tratado com Salina** e
 2 **Controle tratado com Lectina**

3

| IL-10 - Controles | | | | | | |
|-------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 15,4 | 27,7 | 2.178,7 | 4.062,6 | 2.212,7 | 4.148,0 |
| 2 | 23,0 | 16,9 | 1.958,6 | 2.739,2 | 2.862,0 | 4.110,2 |
| 3 | 0,1 | 41,5 | 1.874,8 | 1.883,0 | 2.862,0 | 3.315,9 |
| 4 | 10,7 | 6,1 | 2.211,6 | 2.973,1 | 3.196,1 | 4.488,5 |
| 5 | 30,8 | 30,7 | 1.943,7 | 2.007,4 | 3.177,2 | 4.085,0 |
| 6 | 0,1 | 12,3 | - | - | - | - |
| 7 | 0,1 | 87,7 | - | - | - | - |
| 8 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 9 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 10 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| Média/Mediana | 11,4 | 31,9 | 1.959,0 | 2.739,0 | 2.862,0 | 4.110,0 |
| EPM/Máx | 4,7 | 10,3 | 2.212,0 | 4.063,0 | 3.196,0 | 4.488,0 |
| DP/Min | 12,4 | 27,4 | 1.875,0 | 1.883,0 | 2.213,0 | 3.316,0 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão; Máx = Valor Máximo; Mín = Valor Mínimo

4

5

6

7 **Anexo 23** Valores da citocina IL-10 em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Infectado tratado com Salina** e
 8 **Infectado tratado com Lectina**.

9

| IL-10 - Infectados | | | | | | |
|--------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 41,5 | 100,1 | 2.154,8 | 4.003,9 | 2.255,0 | 2.717,0 |
| 2 | 110,8 | 124,7 | 1.946,5 | 2.654,9 | 1.746,2 | 2.313,6 |
| 3 | 60,0 | 132,4 | 952,6 | 1.751,2 | 2.653,9 | 2.023,6 |
| 4 | 23,0 | 141,6 | 1.180,0 | 1.880,2 | 2.187,5 | 2.893,5 |
| 5 | 58,5 | 76,9 | 1.730,4 | 1.567,7 | 2.433,3 | 2.193,8 |
| 6 | 47,7 | 147,8 | - | - | - | - |
| 7 | 12,3 | 200,1 | - | - | - | - |
| 8 | 89,3 | 203,2 | - | - | - | - |
| 9 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 10 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| Média | 55,4 | 140,9 | 1.593,0 | 2.372 | 2.255,0 | 2.428,0 |
| EPM | 11,5 | 15,5 | 228,1 | 448,2 | 150,7 | 163,1 |
| DP | 32,5 | 43,9 | 509,9 | 1.002,0 | 337,1 | 364,6 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

10

11

12

13

14

15

16

1 **Anexo 24** Valores da citocina IFN- γ em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Controle tratado com Salina** e
 2 **Controle tratado com Lectina**

3

| IFN- γ - Controles | | | | | | |
|---------------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 0,0 | A/I | 333,9 | 1.650,1 | 890,1 | 1.744,2 |
| 2 | 0,0 | 13,2 | 815,4 | 1.261,5 | 1.205,3 | 1.650,4 |
| 3 | A/I | A/I | 761,3 | 1.066,5 | 1.599,9 | 1.340,0 |
| 4 | 0,0 | 0,0 | 1.014,4 | 1.413,2 | 1.140,3 | 1.407,4 |
| 5 | A/I | 13,2 | 741,1 | 920,2 | 1.174,0 | 1.325,6 |
| 6 | A/I | A/I | - | - | - | - |
| 7 | 0,0 | A/I | - | - | - | - |
| 8 | 0,0 | 35,3 | - | - | - | - |
| 9 | 0,0 | 0,0 | - | - | - | - |
| 10 | A/I | 97,2 | - | - | - | - |
| Média | 0,0 | 26,51 | 733,2 | 1.262,0 | 1.202,0 | 1.494,0 |
| EPM | 0,0 | 15,1 | 110,9 | 128,2 | 114,0 | 85,6 |
| DP | 0,0 | 36,9 | 248,1 | 286,6 | 255,0 | 191,5 |

A/I = amostra insuficiente; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

4

5

6

7 **Anexo 25** Valores da citocina IFN- γ em pg/mL e pg/mL/g dos grupos **Infectado tratado com Salina** e
 8 **Infectado tratado com Lectina**.

9

| IFN- γ - Infectados | | | | | | |
|----------------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------------|---------|
| Animal | Plasma (pg/mL) | | Baço (pg/mL/g) | | Coração (pg/mL/g) | |
| | Salina | Lectina | Salina | Lectina | Salina | Lectina |
| 1 | 751,0 | 278,3 | 7.160,8 | 6.704,3 | 1.864,5 | 1.332,8 |
| 2 | 1272,3 | 410,9 | 6.496,2 | 3.984,8 | 1.607,1 | 1.592,6 |
| 3 | 1232,6 | 388,8 | 5.959,8 | 2.787,4 | 1.845,2 | 1.647,9 |
| 4 | A/I | 441,8 | 5.677,2 | 2.556,7 | 1.703,3 | 1.724,9 |
| 5 | 1166,3 | A/I | 3.716,5 | 2.844,4 | 1.453,1 | 1.282,3 |
| 6 | 2129,4 | 185,5 | - | - | - | - |
| 7 | 773,1 | 220,9 | - | - | - | - |
| 8 | A/I | 463,9 | - | - | - | - |
| 9 | 516,9 | 212,0 | - | - | - | - |
| 10 | 1232,6 | A/I | - | - | - | - |
| Mediana/Média | 1199 | 333,6 | 5.802,0 | 3.776,0 | 1.695,0 | 1.516,0 |
| Máx/EPM | 2129 | 463,9 | 579,6 | 773,0 | 76,7 | 88,1 |
| Min/DP | 516,9 | 185,6 | 1.296,0 | 1.728,0 | 171,5 | 196,9 |

A/I = amostra insuficiente; Máx = Valor Máximo; Min = Valor Mínimo; EPM = Erro Padrão da Média; DP = Desvio Padrão

10

11

12

13

14

15

16