

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FRENTE A  
DIFERENTES INÓCULOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM CAMUNDONGOS  
GENETICAMENTE MODIFICADOS.**

**UBERABA-MG  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
WELLINGTON FRANCISCO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FRENTE A  
DIFERENTES INÓCULOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EM CAMUNDONGOS  
GENETICAMENTE MODIFICADOS.**

Tese apresentada à pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Javier Emílio Lazo Chica**

**UBERABA  
2017**

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

R817a Rodrigues, Wellington Francisco  
Avaliação comportamental da resposta inflamatória frente a diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi* em camundongos geneticamente modificados / Wellington Francisco Rodrigues. – 2017.  
67 f. il. : fig., graf., tab.

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

1. Doença de chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Camundongos C57BL/6. 4. *iNOS*<sup>-/-</sup>. I. Lazo Chica, Javier Emílio. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

***“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”***

***Charles Chaplin***

## DEDICATÓRIA

A todos que acreditam que a vida pode ser e é algo mais além da busca da felicidade, a todos que acreditam que nas diversidades da vida há reais possibilidades de crescimento moral e/ou científico, a todos que de alguma forma contribuem na perpetuação de minhas crenças e buscas, pois vocês possibilitam a sublime e real menção de meu viver, em especial à minha Mãe, Manoelina Rodrigues, meus avós '*in memoriam*' Nair Alves Rodrigues e Joaquim Rodrigues, as minhas tias Beatriz Rodrigues e Maria Aparecida Rodrigues e minha companheira, amiga, namorada e futura Esposa Camila Botelho Miguel!

## **AGRADECIMENTOS**

À força singular que pluraliza sonhos... Ações... Emoções... e todo e qualquer movimento nesse espaço incompreensível mais fascinante de se viver!!

Aos gestores desta Instituição, por fazer parte de um sistema que possibilitou concretizar este trabalho, pelo profissionalismo e dedicação.

Ao meu orientador prof. Dr. Javier Emilio Lazo Chica pela confiança, apoio, dedicação, profissionalismo em todas as etapas do projeto, e principalmente por fazer parte fundamental na possibilidade da busca da concretização de um sonho.

Ao prof. Dr. João Santana da Silva, pela confiança na disponibilização dos animais de experimental associados à este estudo.

Ao prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira, pelo profissionalismo, dedicação e principalmente por acreditar, apoiar e fazer parte da possibilidade da concretização deste objetivo.

Aos Mestres, Professores e Doutores desta e de outras instituições que de alguma forma me auxiliaram e colaboraram para minha formação. Em especial ao prof. Dr. Marcelo Henrique Napimoga (São Leopoldo Mandic), e prof. Dr. Siomar de Castro Soares (UFTM), agradeço pela confiança, dedicação, profissionalismo e principalmente pela oportunidade de crescimento científico e moral, assim como a possibilidade da realização deste e outros trabalhos.

Aos colegas e amigos que fizeram de alguma forma parte deste projeto, em especial ao Me. Thiago Alvares da Costa, pela disponibilidade e competência de sempre.

Aos demais colaboradores, amigos e mestres que de alguma forma contribuíram para a execução desta obra e a realização de um sonho, os meus agradecimentos.

## **APOIO FINANCEIRO**

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

## RESUMO

**Introdução:** Uma importante estratégia para contenção da disseminação do *T. cruzi* é ativação macrofágica, assim como a utilização do óxido nítrico como um potente agente tripanocida. Estudos indicam uma variação de respostas além de mudanças no comportamento parasitário afetando o funcionamento orgânico através da concentração do inoculo de *T. cruzi*. **Objetivos:** Desta forma avaliamos os parâmetros inflamatórios em camundongos geneticamente modificados infectados com diferentes inoculos de *T. cruzi*. **Material e métodos:** Foram utilizados 80 camundongos divididos em C57BL/6 selvagens e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>, com 10 semanas de idade conformando os grupos: Controle e Infectados com  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$  e  $3 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* para cada linhagem, inoculados por via subcutânea. A quantificação de parasitos no sangue foi determinada diariamente. Após 9 dias de infecção os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina 24 horas e no 10<sup>o</sup> dia após infecção foram submetidos à eutanásia e necropsia. Foram coletados o sangue para dosagens bioquímicas, coração para quantificação do número de células, ninhos de *T. cruzi* por imunohistoquímica e citocinas no homogenato do órgão. **Resultados:** Parasitos foram encontrados no 3<sup>o</sup> dia (alto inoculo), em ambas as linhagens. WT apresentaram um pico no 7<sup>o</sup> dia para o alto, 9<sup>o</sup> dia para o médio e 10<sup>o</sup> dia para o baixo inoculo, já iNOS<sup>-/-</sup> em todos os grupos no 10<sup>o</sup> dia após infecção. Na avaliação de íons, metabólitos e enzimas, evidenciamos um aumento de Uréia e Taxa de Filtração Glomerular em WT, com uma diminuição de Uréia, Proteína e Potássio urinários, Fosfatase Alcalina e Albumina plasmáticas, inoculo dependente ( $p < 0,05$ ). Já em iNOS<sup>-/-</sup> houve um aumento de Uréia, Potássio, TGO, TGP, Fosfatase Alcalina, CPK, Proteínas totais e Globulina plasmática. A diferença do número de células e ninhos de *T. cruzi*/cm<sup>2</sup> no tecido cardíaco mostrou aumento inoculo dependente para ambas as linhagens. O perfil de citocinas não mostrou diferenças significativas para iNOS<sup>-/-</sup> enquanto que a linhagem WT apresentou aumento de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-17 inoculo dependente e diminuição de IL-4. **Conclusão:** Existem variações na relação biológica parasito-hospedeiro na Doença de Chagas experimental entre Wild-Type e knockout iNOS<sup>-/-</sup> dependente da concentração do inoculo.

**Palavras-chave:** *T. cruzi*, Inóculos logarítmicos, C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>



## ABSTRACT

**Introduction:** An important strategy for containing the spread of the parasite is macrophage activation, as well as the use of nitric oxide as a potent trypanocidal agent. Studies indicate a range of responses as well as changes in parasitic behavior affecting the organic functioning through the concentration of inoculum of *T. cruzi*. **Objectives:** In this way we evaluate the inflammatory parameters in genetically modified mice infected with different inoculum of *T. cruzi*. **Methods:** 80 mice divided into C57BL/6 wild were used and C57BL/6 – iNOS<sup>-/-</sup> 10 weeks of age conforming groups: Control and infected with  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$  and  $3 \times 10^4$  trypomastigote bloodstream forms of *T. cruzi* for each strain inoculated subcutaneously. Quantification of parasites in the blood was measured daily. After 9 days of infection the animals were placed in individual metabolic cages to collect urine in 24 hours and 10 days after infection were euthanized and necropsy. We collected blood for biochemical, heart to quantify the number of cells, nests of *T. cruzi* by immunohistochemistry and cytokines in the homogenate of the organ. **Results:** Parasites were found on the 3rd day (high inoculum) in both strains. WT peaked on day 7 up, 9 days for the average and 10 day for low inoculum, since iNOS<sup>-/-</sup> in all groups on the 10th day after infection. In the evaluation of ions, metabolites and enzymes, we noted an increase of urea and Glomerular Filtration Rate in WT, with a decrease of Urea, Protein and potassium urinary, plasma alkaline phosphatase, and albumin, inoculum dependent ( $p < 0.05$ ). Already in iNOS<sup>-/-</sup> an increase of urea, potassium, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase, CPK, total protein and serum globulin. The difference in the number of cells and nesting *T. cruzi*/cm<sup>2</sup> cardiac tissue showed an increased inoculum dependent for both strains. The cytokines profile showed no significant differences for iNOS<sup>-/-</sup> while the WT strain had increased IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-17 dependent inoculum and IL-4 decreased. **Conclusion:** There are variations in the host-parasite relationship in biological experimental Chagas disease between Wild Type and knockout iNOS<sup>-/-</sup> dependent on the concentration of inoculum.

**Keywords:** *T. cruzi*, Inocula logarithmic, C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Cronograma de atividades do experimento.....23
- Figura 2.** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de microscopia. Os cortes de 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram distribuídos em 10 lâminas, sendo quatro cortes em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60  $\mu\text{m}$ . Para a contagem do número de células foram utilizados dois cortes com distância de 120  $\mu\text{m}$  (lâminas destacadas em vermelho). Para análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados 1 lâmina com quatro cortes de animal infectado. ....25
- Figura 3.** Curva de Parasitemia realizada diariamente para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. O gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo), usando teste não-paramétrico “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”.  $\pi = p < 0,05$  Baixo vs Médio;  $\theta = p < 0,05$  Baixo vs Alto;  $\Omega = p < 0,05$  Médio vs Alto.....31
- Figura 4.** Curva de Sobrevida. O gráfico representa a porcentagem de sobrevida dos animais para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Houve diferenças estatisticamente significantes.....32
- Figura 5.** Número de células no tecido cardíaco expresso em  $\text{mm}^2$  para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM para WT, Teste ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) para INOS “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados,  $p > 0,05$ . ....33
- Figura 6.** Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica, expressos em  $\text{cm}^2$  para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) para WT, “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison” e média  $\pm$  EPM para INOS Teste ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison". Houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados,  $\beta = p < 0,05$  vs Alto. ....34
- Figura 7.** Quantificação de Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito no sangue dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-paramétrico “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison” e média  $\pm$  EPM quando usado teste paramétrico ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison". Houve diferenças estatisticamente significantes, onde  $*$  =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo. ....36
- Figura 8.** Análise do VCM, HCM e contagem de Reticulócitos no sangue periférico dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM, ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison". Diferenças estatisticamente significantes,  $*$  =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo. ....38
- Figura 9.** Contagem de Plaquetas no sangue periférico dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos ao

longo do período analisado. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo), “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle;  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo”.....39

**Figura 10.** Análise do Leucograma no sangue dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle;  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo".....41

**Figura 11.** Quantificação dos metabólitos para avaliação dos parâmetros plasmáticos renal dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison” para as análises dos grupos dos animais C57BL/6 selvagens (WT) e média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" para análises dos grupos de animais C57BL/6 - iNOS-/. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle;  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo". .....43

**Figura 12.** Quantificação dos metabólitos para avaliação dos parâmetros urinários renal dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle. ....45

**Figura 13.** Quantificação dos metabólitos Creatinina, Proteinúria e Clearance de creatinina na urina de 24 horas para avaliação dos parâmetros urinários renal dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle,  $\beta = p < 0,05$  vs Alto. ....47

**Figura 14.** Quantificação dos parâmetros TGO, TGP e Fosfatase Alcalina para avaliação bioquímica hepática dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle,  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo e  $\beta = p < 0,05$  vs Alto. ....49

**Figura 15.** Quantificação dos parâmetros Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação A/G para avaliação bioquímica hepática dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle,  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo e  $\beta = p < 0,05$  vs Alto.....51

**Figura 16.** Quantificação dos parâmetros CPK e CKMB para avaliação bioquímica cardíaca dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.....53

**Figura 17.** Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12p40 e IL-17 no homogenato do coração dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle. ....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores da mediana (máximo – mínimo) referentes à curva de parasitemia realizada nos diferentes dias com os inóculos Baixo, Médio e Alto com ambas as linhagens de camundongos.....	30
<b>Tabela 2.</b> Valores da mediana (máximo – mínimo) e média $\pm$ EPM referentes à quantificação do número de Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito realizada com os grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto com ambas as linhagens de camundongos.....	35
<b>Tabela 3.</b> Valores da média $\pm$ EPM referentes à quantificação do VCM, HCM e número de Reticulócitos dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto com ambas as linhagens de camundongos.....	37
<b>Tabela 4.</b> Valores da média $\pm$ EPM referentes à análise do Leucograma dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	40
<b>Tabela 5.</b> Valores da mediana (máximo – mínimo) e média $\pm$ EPM referentes à quantificação dos metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro no plasma dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	42
<b>Tabela 6.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro na urina dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos metabólitos Creatinina urinária, Proteinúria e Clearance de creatinina dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.....	46
<b>Tabela 8.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos parâmetros TGO, TGP e Fosfatase Alcalina dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	48
<b>Tabela 9.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos parâmetros Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação A/G dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.....	50
<b>Tabela 10.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos parâmetros CPK e CKMB dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	52
<b>Tabela 11.</b> Valores da média $\pm$ EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação das citocinas no homogenato do coração dos grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos. ....	54

## SUMÁRIO

<b>APOIO FINANCEIRO</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
1.2 Evolução e Resposta Imune da Doença de Chagas.....	17
1.3 Óxido Nítrico .....	18
<b>2.- HIPÓTESE</b> .....	20
<b>3.- OBJETIVOS</b> .....	21
3.1.-Objetivo geral.....	21
3.2.-Objetivos específicos .....	21
<b>4.- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. Protocolo do CEUA .....	22
4.2. Animais .....	22
4.3. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
4.4. Desenho experimental .....	23
4.5.Exame parasitológico.....	23
4.6. Eutanásia .....	24
4.7. Necropsia.....	24
4.8. Preparo do coração para cortes histológicos .....	24
4.9. Análise Morfométrica .....	25
4.9.1. Captura das imagens microscópicas .....	25
4.9.2. Número de células no tecido cardíaco.....	26
4.10. Imunohistoquímica .....	26
4.10.1. Quantificação do número de ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco .....	27
4.11. Hemograma e Contagem de Reticulócitos.....	27
4.12. Dosagem das citocinas .....	28
4.13. Análise estatística .....	28
<b>5.-RESULTADOS</b> .....	30
5.1. Curva de Parasitemia.....	30
5.2. Curva de Sobrevida .....	32
5.3. Número de células no tecido cardíaco .....	33
5.4. Quantificação dos ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco por Imunohistoquímica .....	34
5.5. Quantificação do Hemograma e Reticulócitos .....	35
5.5.1. Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito.....	35
5.5.2. VCM, HCM e Reticulócitos .....	37
5.5.3. Plaquetas.....	39
5.5.4. Leucograma.....	40
5.6. Análise Bioquímica.....	42
5.6.1. Avaliação dos parâmetros plasmáticos renal.....	42
5.6.2. Avaliação dos parâmetros urinários renal.....	44
5.6.3. Avaliação dos parâmetros renal – Creatinina urinária, Proteinúria e Clearance de creatinina .....	46
5.6.4. Avaliação dos parâmetros hepáticos - TGO, TGP e Fosfatase Alcalina...	48

5.6.5 Avaliação dos parâmetros hepáticos - Proteínas totais, Albumina, Globulina, Relação A/G .....	50
5.6.6. Avaliação dos parâmetros bioquímicos CPK e CKMB.....	52
5.7. Avaliação das citocinas no homogenato do coração .....	54
<b>6.-DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>7.-CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>8.-REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é um antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909). É uma doença endêmica na América Central e do Sul, onde há uma estimativa de 1,9 milhões para 4,6 milhões de pessoas atualmente infectadas (Bern *et al.*, 2011; Hotez e Fujiwara, 2014; Dias *et al.*, 2016). A doença é o resultado de um processo multifatorial, tendo em vista a diversidade da relação parasito-hospedeiro (Macedo *et al.*, 2004).

Após a infecção pela DC se inicia a fase aguda que tem duração de aproximadamente 60 dias, pode se apresentar assintomática ou com uma sintomatologia própria, caracterizada por sinal de porta de entrada (sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação), febre, sinais de insuficiência cardíaca, edema de face e de membros inferiores, enfartamento ganglionar e hepatoesplenomegalia, além da elevada parasitemia circulante (De Rezende *et al.*, 1980). Estes sintomas tendem a melhorar espontaneamente no período de 3 a 8 semanas após a infecção.

Posteriormente a doença evolui para a fase crônica, onde ocorre a diminuição da parasitemia no sangue circulante e é possível encontrar o protozoário na intimidade dos tecidos. Inicialmente o portador da doença pode não apresentar sinais e sintomas clínicos, caracterizando assim a forma indeterminada da DC. Em outros casos podem aparecer sintomas que irão determinar formas anátomo-clínicas distintas (Cardíaca, Digestiva, Mista - cardíaca e digestiva, Nervosa e nas últimas décadas, a reativação da DC (Tafuri, 1987; Prata, 1990).

O mecanismo inflamatório desencadeado pela infecção é um importante alvo de estudo para aprimoramento do entendimento da fisiopatologia da doença assim como para a busca novos alvos terapêuticos. Além disso, a resposta inflamatória que se segue à infecção pelo *T. cruzi* embora seja essencial para a resistência do hospedeiro à infecção é também responsável pela diversidade patológica observada na DC (Coura *et al.*, 2014).

A resposta imune anti-*T. cruzi* pode ser considerada mista por envolver a resposta imune celular e humoral. Mesmo com esses potentes mecanismos de defesa, o parasito desenvolveu formas de evasão. Há mecanismos de evasão que desativam o poder fagocitário de macrófagos, escape de lise por complemento, supressão ectópica, ativação policlinal, imunodepressão, ativação preferencial de



1 linfócitos T CD4+ do tipo Th2 (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Durante a fase aguda ocorre  
2 uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ,  
3 além de quimiocinas que são responsáveis por direcionar a resposta inflamatória  
4 para o tecido alvo. Macrófagos e células dendríticas fagocitam o parasito e  
5 expressam IL-12, junto às moléculas coestimuladoras, que dará início à produção de  
6 IFN- $\gamma$  específica de células T (Bilate e Cunha-Neto, 2008). As células NK têm um  
7 papel importante nos primeiros dias de infecção devido à manutenção da produção  
8 de IFN- $\gamma$ , o qual é essencial na primeira semana de infecção (Cardillo *et al.*, 1996), a  
9 partir da segunda semana a produção é derivada principalmente das células T  
10 CD4+. Esses acontecimentos no início da infecção são importantes na construção  
11 posterior da resposta imune humoral e celular. Além disso, a expressão do gene  
12 iNOS contribui de forma significativa para a redução do número de parasitos através  
13 da síntese de espécies reativas de nitrogênio potencializada por perfil de resposta  
14 celular Th1 (Cardillo *et al.*, 1996). Levando em consideração estudos preliminares  
15 em que demonstraram a relação de efeitos deletérios e concentração do inoculo  
16 (Lemos *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*, 2015), assim como a importância da expressão  
17 de iNOs na infecção pelo *T. cruzi* (Borges *et al.*, 2009), se tornou importante o  
18 monitoriamento de efeitos funcionais e estruturais da infecção aguda experimental  
19 por *T. cruzi*.

20

### 21 1.1 *Trypanosoma cruzi*

22

23 O *T. cruzi* pelas suas características biológicas e genéticas, constituindo-se  
24 em cepas ou subespécies, pode ter comportamentos peculiares quando inoculado  
25 em animais experimentais. Segundo BRENER (1965) e Brener & Chiari (1963)  
26 considerando critérios morfológicos, a evolução da parasitemia e o tropismo tissular,  
27 descreveram as cepas Y e CL como cepas “polares”. A caracterização  
28 morfobiológica e histopatológica de cepas do *T. cruzi*, proposta por Andrade *et al.*,  
29 (1983) e Andrade *et al.*, (1995), foi feita através da análise do comportamento em  
30 camundongos Suíços, na fase aguda da infecção, de isolados do parasita de  
31 diferentes fontes (casos humanos, triatomíneos naturalmente infectados,  
32 reservatórios silvestres, etc.). Essa análise permitiu estabelecer os tipos de cepas  
33 designados como I, II, III, os quais apresentam uma correlação com os perfis

1 isoenzimáticos descritos por Miles *et al.*, (1980), como foi demonstrado, ao estudo  
2 bioquímico das cepas, por Andrade *et al.*, (1983).

3 Basicamente, as alterações tissulares predominantes dependem do tropismo  
4 da cepa e, conseqüentemente, do maior grau de parasitismo dos diferentes setores  
5 do organismo (Andrade *et al.*, 1983; Andrade *et al.*, 1995). Desse modo, na infecção  
6 com cepas do Tipo I, observa-se, nas fases iniciais, até 10 dias pós-infecção,  
7 parasitismo dos macrófagos em vários setores do organismo, principalmente em  
8 órgãos como o baço, fígado e linfonodos e no tecido conjuntivo intersticial, onde,  
9 além de macrófagos, são identificados adipócitos, com denso parasitismo (Andrade  
10 *et al.*, 1995). Na fase mais avançada da infecção aguda, é evidente o miotropismo,  
11 com lesões inflamatórias de miocárdio, músculo esquelético e músculo liso das  
12 paredes intestinais, com envolvimento de plexos mioentéricos e lesões neuronais  
13 (Tafari *et al.*, 1971).

14 Na infecção com as cepas de Tipo II, cuja parasitemia tem um curso mais  
15 lento entre o 12<sup>o</sup> e o 20<sup>o</sup> dia, as lesões predominantes ocorrem no miocárdio, na  
16 fase aguda, com acentuado parasitismo das células cardíacas, evoluindo para a  
17 destruição dos miócitos parasitados e necrose dos não parasitados, com intenso  
18 processo de miocardite. Em menor grau, há também lesões de músculo esquelético  
19 e de músculos lisos, com envolvimento de plexos nervosos mioentéricos (Brener *et*  
20 *al.*, 2000).

21 Na infecção com as cepas de Tipo III, cuja parasitemia evolui lentamente,  
22 atingindo níveis elevados aos 30 dias, há nítido miotropismo, principalmente com  
23 envolvimento de músculo esquelético, desenvolvendo-se extensas lesões de fibras  
24 musculares esqueléticas e intenso processo inflamatório, lesões de arterite e  
25 periarterite, com necrose de parede vascular. As lesões miocárdicas são também  
26 proeminentes (Brener *et al.*, 2000).

27 Levando-se em consideração que as cepas do *T. cruzi* são multiclonais e  
28 podem apresentar populações homogêneas ou heterogêneas, com a predominância  
29 de “clones principais”, de acordo com Tibayrene & Ayala (1988), foi sugerido por  
30 Campos *et al.*, (1999), tendo como base o estudo molecular dos clones da cepa  
31 21SF proveniente de São Felipe, BA, que a presença de um clone principal,  
32 circulando em uma mesma área endêmica, pode ser responsável pelo quadro  
33 clínico-patológico da doença nessa área. Isolando os clones de uma cepa do Brasil

1 Central, originária de um paciente com megaesôfago, Lauria-Pires *et al.*, (1996a)  
2 identificaram, na cepa parental e nos clones, o mesmo zimodema (Z2).  
3 Recentemente foi sugerido por Macedo & Pena (1998) um “modelo clonal-  
4 histotrópico”, levando em conta que diferentes clones de uma cepa podem  
5 apresentar tropismo para diferentes tecidos, decorrente das interações moleculares  
6 na superfície celular entre o clone invasor e os tecidos do hospedeiro.

7 Também se tem observado que as características morfológicas do *T. cruzi*  
8 influencia tropismo para órgãos específicos (WHO, 1997). Existem algumas cepas  
9 com predominância delgada, que apresentam afinidade por células do SFM,  
10 parasitando com maior frequência esplenócitos, hepatócitos e células da medula  
11 óssea (Andrade, 1976). Uma característica que pode ser observada é a elevação  
12 precoce dos picos parasitológicos. Mesmo apresentando-se mais sensíveis à ação  
13 dos anticorpos, leva à mortalidade na fase aguda da infecção a grande maioria dos  
14 animais experimentais infectados. Estudos posteriores comprovaram que as cepas  
15 de morfologia larga apresentam tropismo por células musculares devido à presença  
16 de receptores específicos para *T. cruzi* na membrana destas células. No mesmo  
17 estudo verificou-se que as formas largas de tripomastigotas estão mais adaptadas  
18 ao desenvolvimento no vetor, enquanto que as formas finas ou delgadas estão mais  
19 adaptadas a cumprirem o ciclo tecidual (Andrade 1976).

20

## 21 1.2 Evolução e Resposta Imune da Doença de Chagas

22

23 Algumas evidências experimentais indicam que o sistema imune contra o *T.*  
24 *cruzi* está mediado pela capacidade microbida do Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na  
25 ativação macrofágica (Reed, *et al.*, 1988; Revelli, *et al.* 1995). O Fator de Necrose  
26 Tumoral (TNF- $\alpha$ ) também mostra ser eficaz em controlar a infecção aguda (Santos,  
27 *et al.*, 1997), em parte realçando a atividade tripanocida dependente do óxido nítrico  
28 (NO) - IFN- $\gamma$  dos macrófagos ativados (Silva *et al.*, 1995; Uchôa *et al.*, 2002).  
29 Entretanto, a presença do NO e do TNF- $\alpha$  pode ao mesmo tempo ser prejudicial  
30 dado sua participação em ferimento do tecido (Moncada, 2002) uma vez que as  
31 diferentes respostas imunes estão implicadas em maior ou menor lesão tecidual.  
32 (Brenner, 2000). Com o início da infecção começa o processo inflamatório, através do  
33 recrutamento de células “Natural Killers” (NK), neutrófilos, macrófagos e eosinófilos

1 (Muñoz *et al.*, 1992). Todas essas células possuem receptores, que com o auxílio do  
2 TNF- $\alpha$ , ativam macrófagos para produzir citocinas (IL-1 e IL-6) e NO (Golden *et al.*,  
3 1991). Os macrófagos ativados estimulam a inflamação aguda por meio da secreção  
4 de citocinas, principalmente TNF-  $\alpha$  e IL-1, quimiocinas e mediadores lipídicos de  
5 vida curta, tais como o fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos.

6 A ação coletiva dessas citocinas derivadas de macrófagos e dos mediadores  
7 lipídicos é produzir uma inflamação local que é rica em neutrófilos, os quais  
8 fagocitam e destroem organismos infecciosos (Abbas, 2005). As prostaglandinas são  
9 classe de mediadores inflamatórios lipídicos derivadas do ácido araquidônico em  
10 muitas células pela via da ciclooxigenase (Kunkel *et al.*, 2002).

11 Clinicamente, a infecção pode levar ao desenvolvimento de complicações  
12 cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, que muitas vezes culmina com a  
13 morte do indivíduo. O Benzonidazol, que é o único medicamento com ação  
14 tripanomicida empregado atualmente no Brasil, têm sua eficácia limitada (Cançado,  
15 2002). Somado a isso, a DC representa um importante problema social gerado  
16 principalmente pelo medo da morte súbita, a falta de um medicamento que seja  
17 eficaz nas duas fases da doença ou ainda em consequência do afastamento das  
18 funções profissionais devido a uma série de debilitações e restrições impostas pela  
19 doença (Uchôa *et al.*, 2002).

### 21 1.3 Óxido Nítrico

22  
23 O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso responsável por uma variedade de  
24 fenômenos fisiológicos. A l-arginina é a precursora da síntese do óxido nítrico, na  
25 presença de óxido nítrico-sintetase (Cerqueira e Yoshida, 2002), possui atividade  
26 citotóxica, vasodilatadora, modulação de respostas inflamatórias, da qual a sua  
27 atividade biológica depende do tipo celular relacionado (Moncada *et al.*, 1991;  
28 Adams, 1996).

29 A óxido nítrico-sintase (NOS) é a enzima responsável pela síntese do NO. São  
30 vinculadas 3 isoformas de NOS, onde uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS  
31 constitutiva (cNOS). A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) é uma  
32 NOS constitutiva, presente em neurônios, células epiteliais, SNC e SNP periférico,  
33 sistema NANC, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão

1 sexual masculino, células  $\beta$  pancreáticas, além de outros tecidos. Já a isoforma II ou  
2 óxido nítrico-sintetase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas e  
3 lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Por fim, a isoforma III  
4 ou óxido nítrico-sintetase endotelial (eNOS) é uma NOS constitutiva e produz NO em  
5 endotélio vascular sob condições basais. Antígenos associados a citocinas, como  
6 TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  ou INF- $\gamma$ , induzem a síntese de iNOS, de 2 a 4 horas após a exposição  
7 ao agente. A sua indução pode ser suprimida por TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 sozinhos ou  
8 sinergicamente com macrófagos, por IL-8 e por glicocorticóides (Cerqueira e  
9 Yoshida, 2002).

10 Na infecção por *T. cruzi* o macrófago é a principal célula que atua contra o parasito,  
11 através da produção de NO estimulada por IFN- $\gamma$  produzido inicialmente por células  
12 Natural Killer (NK) (Silva et al., 1992). Os cardiomiócitos são outras células que  
13 participam ativamente na resposta à infecção, através da produção de citocinas e  
14 NO, modulando a presença de células inflamatórias no tecido e controlando a  
15 replicação do parasito (Machado et al., 2000). A molécula de NO é produzida pela  
16 isoforma induzível da NO sintase, em resposta a IFN- $\gamma$  e em sinergismo com TNF- $\alpha$ .  
17 Estas citocinas produzidas durante a fase aguda da infecção, onde correlacionam  
18 com um incremento na concentração plasmática de nitrito, produtos finais da via da  
19 arginina/NO. Citocinas do padrão Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) atuam em conjunto para  
20 induzir a ativação de macrófago e a produção de óxido nítrico (NO), atuando na  
21 eliminação do parasito. Citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) bloqueiam  
22 as citocinas do padrão Th1, permitindo a persistência do *T. cruzi* no tecido  
23 (Pavanelli, 2008), assumindo um importante papel a expressão de iNOS no combate  
24 a proliferação do parasito.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

## 1 2.- HIPÓTESE

2

3 As diversidades nos aspectos fisiopatológicos da DC ainda permanecem  
4 divergentes. Levando em consideração estudos preliminares em que demonstraram  
5 a relação de efeitos deletérios e concentração do inoculo, bem como a importância  
6 da expressão de iNOs na infecção pelo *T. cruzi*, hipostenizou-se que os efeitos  
7 deletérios funcionais e estruturais da infecção aguda experimental por *T. cruzi*, em  
8 diferentes inoculos afetam de forma variável os diferentes sistemas.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

### 3.- OBJETIVOS

#### 3.1.-Objetivo geral

Avaliar os parâmetros inflamatórios em camundongos infectados com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2.-Objetivos específicos

- Determinar a curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Delimitar o curso da infecção através da curva de parasitemia em camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Quantificar o número de células no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Quantificar o número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Analisar o hemograma e reticulócitos de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Quantificar metabólitos e íons no plasma e urina de 24 horas de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;
- Quantificar citocinas e quimiocinas no homogeneizado do coração de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes de iNOS<sup>-/-</sup> com diferentes inóculos de *Trypanosoma cruzi*;

## 4.- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Protocolo do CEUA

O parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) está registrado e aprovado com o protocolo de número 293/2013.

### 4.2. Animais

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) e 40 C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> (Universidade de São Paulo – Laboratório de Imunologia) em duplicata, com 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, mantidos no biotério da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Uberaba-MG. Os animais ficaram em sala especial, com renovação constante de ar, à temperatura de 22 a 26°C e umidade entre 45 e 55%, expostos a um ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e alocados em gaiolas plásticas de 414 mm x 344 mm x 168 mm. A alimentação foi com ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. – Curitiba – PR) e água esterilizada oferecida *ad libitum*. A água e a maravalha passaram pelo processo de esterilização antes de serem oferecidas aos animais. Todos os procedimentos realizados estão em conformidade com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório, antigo COBEA (Andersen *et al.*, 2004; Mezdari *et al.*, 2004; Franco, 2005).

### 4.3. Cepa de *Trypanosoma cruzi*

Para produzir a infecção em ambas as linhagens de animais pelo *Trypanosoma cruzi*, foi utilizada a cepa “Y” do *T. cruzi* (Andrade e Magalhães, 1997; De Araújo-Jorge e De Castro, 2000), que é mantida no biotério da Disciplina de Biologia Celular da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG.



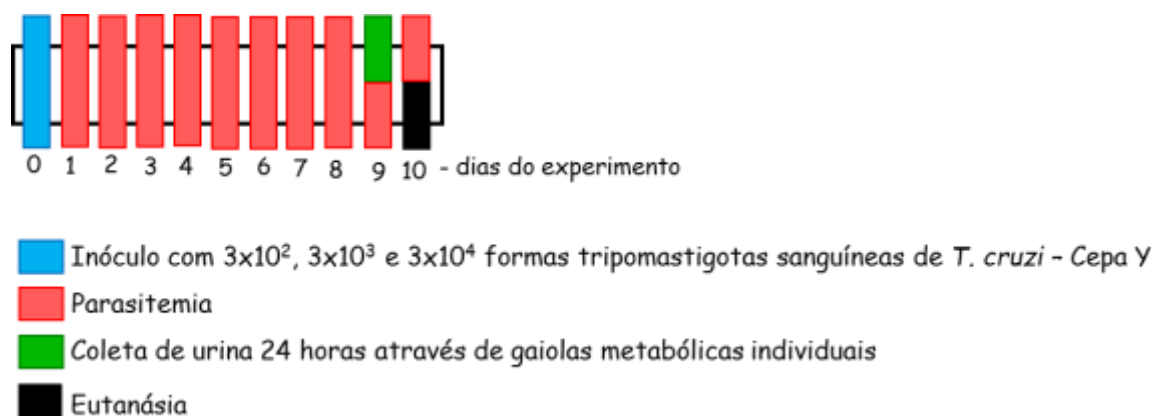
1

## 2 4.4. Desenho experimental

3

4 Os animais foram divididos em 4 grupos com igual número para cada  
 5 linhagem (C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>), conformando o grupo  
 6 Controle sem infecção (**Controle**), grupo Infectado com  $3 \times 10^2$  formas  
 7 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (**Baixo inoculo**), grupo Infectado com  $3 \times 10^3$   
 8 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (**Médio inoculo**) e grupo Infectado  
 9 com  $3 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (**Alto inoculo**). As formas  
 10 tripomastigotas sanguíneas foram inoculadas por via subcutânea e o ajuste do  
 11 inóculo foi realizado conforme o método de (Brener, 1962). O esquema de  
 12 procedimentos realizados com os animais de ambas as linhagens está representado  
 13 na Figura 1. Os animais receberam marcação individual e durante todo o período do  
 14 experimento e foram verificadas a data de óbito para a construção da curva de  
 15 sobrevida.

16



17

18 **Figura 1** Cronograma de atividades do experimento.

19

## 20 4.5. Exame parasitológico

21

22 A determinação do número de parasitos nos animais foi realizada diariamente  
 23 e o protocolo de contagem conforme descrito por (Lemos *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*,  
 24 2015).

25

26

27

#### 1 4.6. Eutanásia

2  
3 Foram administrados por via intraperitoneal 15 unidades de heparina por  
4 grama de peso aos animais e em seguida submetidos à eutanásia com o uso de gás  
5 carbônico. Após este procedimento foi feita a sangria pelo plexo oftálmico para obter  
6 o sangue total que foi utilizado para realização do Hemograma conforme descrito no  
7 item 4.11. Por fim se procedeu à necropsia como descrito a seguir.

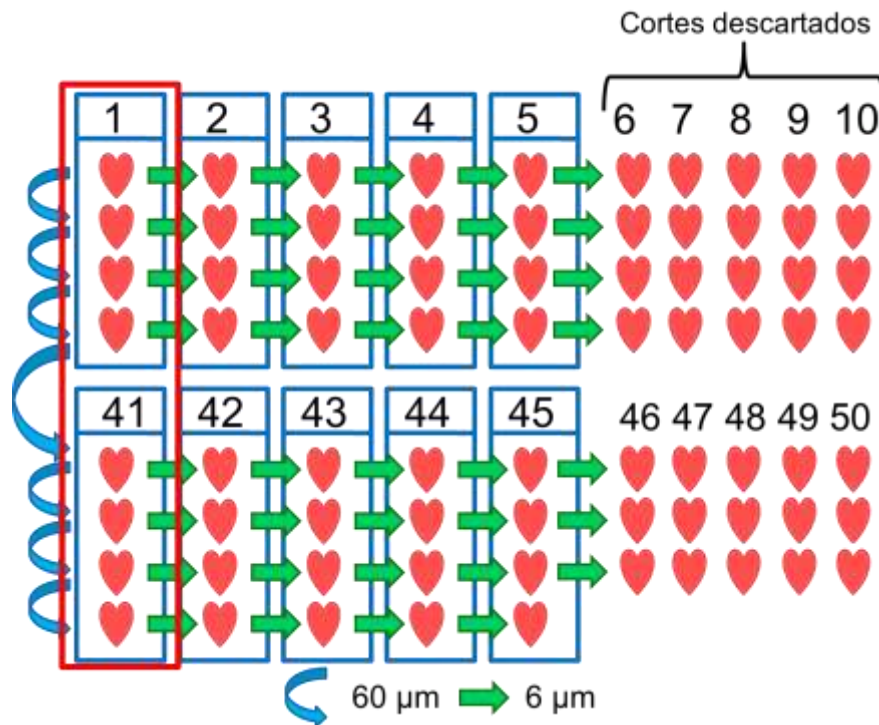
#### 8 9 4.7. Necropsia

10  
11 Os animais foram submetidos à incisão mento-pubiana com subsequente  
12 abertura das cavidades torácica e abdominal. Neste momento foram retirados o  
13 coração para análise, processamento histológico e dosagem de citocinas como  
14 descrito nos itens 4.8 e 4.12, o baço, rim, intestino e fígado para análises  
15 posteriores. Após a necropsia as carcaças foram colocadas em formol a 10% por no  
16 mínimo 48 horas, para posteriormente ser descartadas em lixo hospitalar (De Araújo-  
17 Jorge e De Castro, 2000).

#### 18 19 4.8. Preparo do coração para cortes histológicos

20  
21 Foi realizado um corte transversal ao eixo maior do ventrículo através de um  
22 instrumento contendo divisões com largura de 1mm, o qual permitiu obter um corte  
23 de 2 mm de espessura que correspondeu ao primeiro terço, que foi conservado em  
24 freezer a -70°C em inibidor de proteases para análise das citocinas. Os dois terços  
25 restantes do tecido cardíaco foi acondicionado em methacarn durante 24 horas e  
26 depois armazenado em álcool 70%. Posteriormente, o coração foi submetido aos  
27 processos de desidratação em uma série crescente de álcool etílico, diafanização  
28 em xilol e inclusão em parafina para microtomia. A inclusão de cada fragmento foi  
29 feita pelo posicionamento do plano obtido pelo corte transversal ao eixo maior do  
30 ventrículo, com o plano longitudinal de microtomia. Os blocos de parafina com os  
31 fragmentos de coração foram cortados em micrótomo rotativo (Leica RM2245),  
32 obtendo-se cortes com 6 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, montados em lâminas de  
33 vidro para microscopia, previamente tratadas com adesivo (Silano). Foram obtidos

1 cortes seriados de 6  $\mu\text{m}$  de espessura depositando-se um corte a cada intervalo de  
 2 60  $\mu\text{m}$  na mesma lâmina, repetindo o ciclo até completar 10 lâminas (Figura 2). Os  
 3 cortes após secagem em estufa a 60°C, por um período de 24 horas, foram corados  
 4 com Hematoxilina (Stevens, 1990).  
 5



6  
 7 **Figura 2.** Representação esquemática da disposição dos cortes histológicos nas lâminas de  
 8 microscopia. Os cortes de 6  $\mu\text{m}$  de espessura foram distribuídos em 10 lâminas, sendo quatro cortes  
 9 em cada lâmina. A distância entre cada corte na mesma lâmina é de 60  $\mu\text{m}$ . Para a contagem do  
 10 número de células foram utilizados dois cortes com distância de 120  $\mu\text{m}$  (lâminas destacadas em  
 11 vermelho). Para análise da área de ninhos de amastigotas por imunohistoquímica foram utilizados 1  
 12 lâmina com quatro cortes de animal infectado.

13

#### 14 4.9. Análise Morfométrica

15

##### 16 4.9.1. Captura das imagens microscópicas

17

18 Para análise morfométrica foram utilizadas as lâminas como indicado no item  
 19 4.8. As imagens para análise do infiltrado inflamatório e quantificação do número de  
 20 ninhos de *T. cruzi* foram capturadas utilizando uma câmara de vídeo digital  
 21 (Evolution MP 5.0 – color – Media Cybernetic) acoplada a um microscópio de luz  
 22 (Nikon – Eclipse 50i) que envia as imagens para um computador. As imagens foram  
 23 capturadas com o programa “Image – Pro Plus” (MediaCybernetics) e gravadas para

1 posterior utilização do programa de análise de imagem “ImageJ”  
2 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O tamanho das imagens capturadas foi de 2560 x 1920  
3 pixels. Estas imagens foram calibradas através de uma lâmina (Leica) com régua  
4 graduada em dois milímetros divididos em unidades de 0,01mm (dez micrômetros)  
5 para objetiva de 40X (imunohistoquímica) e 20X (quantificação de células).

#### 6 7 4.9.2. Número de células no tecido cardíaco

8  
9 Para a quantificação das células do tecido cardíaco e infiltrado inflamatório  
10 foram utilizadas lâminas coradas com Hematoxilina e as imagens capturadas com  
11 objetiva de 20X no microscópio conforme o item 4.9.1. Foram utilizadas no total 10  
12 imagens escolhidas aleatoriamente, distribuídas em igual número na região do  
13 ventrículo direito e esquerdo de cada animal em duplicata. Cada imagem media  
14 724,45 x 543,34  $\mu\text{m}$  tendo uma área de 393.625,63  $\mu\text{m}^2$ . No total foi analisada uma  
15 área de 3.936.256,3  $\mu\text{m}^2$  que corresponde a 3,93  $\text{mm}^2$  por duplicata.

16 Para quantificar o número de células foi utilizado o modo semi-automático do  
17 programa ImageJ onde o programa reconhecia os núcleos das células do tecido  
18 cardíaco. Primeiro foi realizado a análise do grupo **Controle** para verificar o número  
19 médio de células por área analisada, e em seguida foram feitos os grupos infectados  
20 com diferentes inóculos. O resultado foi expresso pela relação do número de células  
21 dividido pela área em  $\text{mm}^2$ .

#### 22 23 4.10. Imunohistoquímica

24  
25 A imunohistoquímica para a detecção de ninhos de *T. cruzi* foi realizada nos  
26 cortes do coração dos camundongos infectados obtidos conforme o item 4.8. Cada  
27 lâmina passou por processos de desparafinização, hidratação e lavagem. Após o  
28 bloqueio da peroxidase endógena, das ligações inespecíficas e a recuperação  
29 antigênica, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi*  
30 produzido em coelho (diluição 1:250), durante 2 horas à temperatura ambiente.  
31 Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com a proteína A  
32 conjugada com peroxidase (1:100) e reveladas com DAB-diaminobenzidina, em

1 tampão Tris-HCl pH 7,4. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina e as  
2 lâminas montadas com *Entellan* para análise em microscópio de luz comum.

#### 3 4 4.10.1. Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco

5  
6 Para a quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco  
7 foram utilizadas lâminas conforme descrito no item 4.10 e capturadas imagens no  
8 microscópio com objetiva de 40X conforme o item 4.9.1. Foram utilizadas em média  
9 218 campos por animal correspondendo a uma área total de 10,67 mm<sup>2</sup>. Cada área  
10 de um campo correspondia a 48858,16 µm<sup>2</sup>. As imagens foram distribuídas em igual  
11 número na região do ventrículo direito e esquerdo de cada animal. Ao final foi feita a  
12 relação da somatória de todos os ninhos de *T. cruzi* que se encontravam nessas  
13 áreas pela somatória da área total analisada. O resultado foi expresso em mm<sup>2</sup>.

#### 14 15 4.11. Hemograma e Contagem de Reticulócitos

16  
17 Após coletado o sangue, aliquotou-se 100 µL de sangue total em um tubo  
18 com 5µL de EDTA 10% e em seguida realizada a leitura em hemocitômetro (ABX  
19 MICROS 60 – Horiba ABX Diagnostics – França). O aparelho realizou a leitura dos  
20 seguintes parâmetros hematológicos: Hemácias, Hematócrito, Volume Corpuscular  
21 Médio (VCM), Hemoglobina, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Amplitude de  
22 Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW) e Leucócitos totais. O resultado  
23 corresponde à média de duas leituras da mesma amostra e os dados coletados  
24 foram transferidos a uma planilha eletrônica e analisados estatisticamente. Em  
25 seguida foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para contagem  
26 manual de Plaquetas e Diferencial de Leucócitos e coradas por Panótico (NewProv -  
27 Produtos para Laboratório LTDA – Brasil). Posteriormente incubou-se 15µL do  
28 sangue total com 15µL do corante Azul de Cresil Brilhante (Laborclin – Produtos  
29 para Laboratório LTDA – Brasil) à 37°C por 20 minutos para realização da lâmina  
30 para contagem de Reticulócitos. As lâminas assim coradas foram lidas em  
31 microscópio de luz (Leica Dia Star - 420) com objetiva de 100X. Os resultados foram  
32 expressos em número de Reticulócitos/mm<sup>3</sup>, conforme descrito por (Oliveira *et al.*,  
33 2006).

#### 4.12. Dosagem das citocinas

A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de anticorpo de captura específico para cada citocina testada, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M e pH 9,6, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas com solução de PBS acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio) (Sigma) durante 1 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionadas, em duplicata, as quantidades conhecidas das citocinas recombinantes (curva-padrão) e a amostra a ser analisada, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T e adicionados os anticorpos secundários biotinilados (anticorpo de detecção) específicos para cada citocina, diluídos, que foram pré-incubados por 15 minutos com avidina conjugada a peroxidase. A solução foi adicionada às placas e seguiu-se a incubação à temperatura ambiente durante 1 hora. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) e o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As reações foram bloqueadas após 20 minutos com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC). As concentrações de citocinas (IL-12 p40, IL-10, INF-γ, TNF, IL-4 e IL-17) foram determinadas com referências à curva padrão das diluições seriadas das citocinas recombinantes. Os valores das citocinas foram expressos em pg/mL/g.

#### 4.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa “Instat e Prisma” da Graphpad (<http://www.graphpad.com>). Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov) e a variância homogênea (teste “F” ou Teste de *Bartlett's*). Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou-se testes paramétricos. Quando comparado dois grupos foi

1 utilizado o teste “t” não-pareado e mais de três grupos foi utilizado ANOVA com *post*  
2 *test* de comparação múltipla de Tukey's. Os resultados foram expressos em média ±  
3 EPM. Nos casos em que a distribuição não foi Gaussiana, utilizaram-se os testes  
4 não paramétricos. Quando dois grupos foi utilizado o Teste "Mann Whitney" e mais  
5 de 3 grupos utilizamos o teste "Kruskal-Wallis" com comparação múltipla de Dunn's.  
6 Para correlação das variáveis foi utilizada a correlação de *Spearman*. Os resultados  
7 foram expressos em mediana, valores máximos e mínimos. As diferenças  
8 observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$  (5%) (Arango, 2001;  
9 Mandarin-De-Lacerda, 2003).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

## 1 5.-RESULTADOS

2

### 3 5.1. Curva de Parasitemia

4

5 A curva de Parasitemia (Figura 3) demonstra o número de parasitos dos  
 6 animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com  
 7 diferentes inoculos ao longo do período analisado. A tabela 1 mostra os valores da  
 8 mediana (valor máximo – mínimo) dos grupos Baixo, Médio e Alto para ambas as  
 9 linhagens de camundongos. Os valores foram expressos em mediana (máximo –  
 10 mínimo) usando o teste não-paramétrico. Foram observadas diferenças  
 11 estatisticamente significantes entre os grupos:  $\pi = p < 0,05$  Baixo vs Médio;  $\theta =$   
 12  $p < 0,05$  Baixo vs Alto;  $\Omega = p < 0,05$  Médio vs Alto.

13

14 **Tabela 1.** Valores da mediana (máximo – mínimo) referentes à curva de parasitemia  
 15 realizada nos diferentes dias com os inóculos Baixo, Médio e Alto com ambas as  
 16 linhagens de camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)			
	Baixo	Médio	Alto
5 dias	0,0 (10.000,0 - 0,0)	10.000,0 (20.000,0 - 0,0)	130.000,0 (300.000,0 - 60.000,0)
6 dias	10.000,0 (20.000,0 - 0,0)	10.000,0 (30.000,0 - 0,0)	250.000,0 (520.000,0 - 120.000,0)
7 dias	20.000,0 (30.000,0 - 10.000,0)	120.000,0 (150.000,0 - 30.000,0)	1.320.000,0 (2.020.000,0 - 870.000,0)
8 dias	110.000,0 (240.000,0 - 40.000,0)	360.000,0 (450.000,0 - 210.000,0)	1.830.000,0 (2.350.000,0 - 1.130.000,0)
9 dias	370.000,0 (770.000,0 - 140.000,0)	850.000,0 (1.970.000,0 - 330.000,0)	550.000,0 (630.000,0 - 280.000,0)
10 dias	570.000,0 (910.000,0 - 430.000,0)	580.000,0 (1.120.000 - 340.000,0)	370.000,0 (500.000,0 - 240.000,0)
11 dias	360.000,0 (560.000,0 - 180.000,0)	420.000,0 (890.000,0 - 230.000,0)	9.000,0 (130.000,0 - 20.000,0)
12 dias	250.000,0 (350.000,0 - 80.000,0)	140.000,0 (230.000,0 - 60.000,0)	240.000,0 (400.000,0 - 180.000,0)
17	Mediana (máximo-mínimo)		
C57BL/6 - iNOS-/-			
	Baixo	Médio	Alto
5 dias	0,0 (10.000,0 - 0,0)	10.000,0 (50.000,0 - 0,0)	130.000,0 (490.000,0 - 40.000,0)
6 dias	0,0 (10.000,0 - 0,0)	25.000,0 (110.000,0 - 0,0)	450.000,0 (820.000,0 - 120.000,0)
7 dias	30.000,0 (60.000,0 - 0,0)	250.000,0 (790.000,0 - 30.000,0)	970.000,0 (3.800.000,0 - 590.000,0)
8 dias	865.000,0 (2.055.000,0 - 40.000,0)	765.000,0 (1.520.000,0 - 90.000,0)	2.780.000,0 (5.200.000,0 - 1.180.000,0)
9 dias	1.630.000,0 (3.910.000,0 - 250.000,0)	820.000,0 (2.030.000,0 - 620.000,0)	1.990.000,0 (1.102.000,0 - 1.145.000,0)
10 dias	2.015.000,0 (4.010.000,0 - 1.000.000,0)	920.000 (3.970.000,0 - 260.000,0)	1.410.000,0 (1.876.000,0 - 580.000,0)
11 dias	1.075.000,0 (1.900.000,0 - 220.000,0)	226.667 (420.000,0 - 50.000,0)	1.588.000,0 (2.120.000,0 - 940.000,0)
12 dias	250.000,0 (350.000,0 - 80.000,0)	140.000,0 (230.000,0 - 60.000,0)	240.000,0 (400.000,0 - 180.000,0)
18	Mediana (máximo-mínimo)		

19

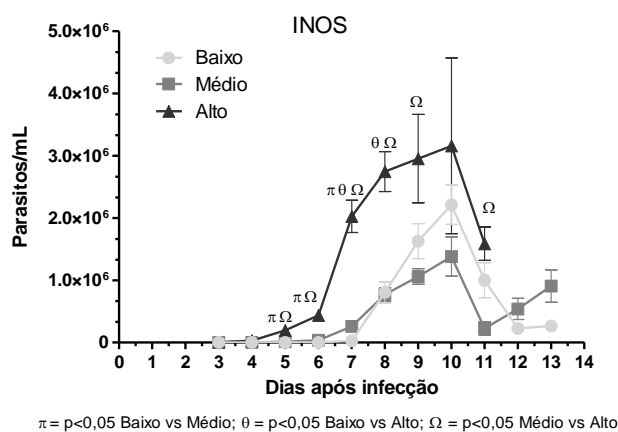
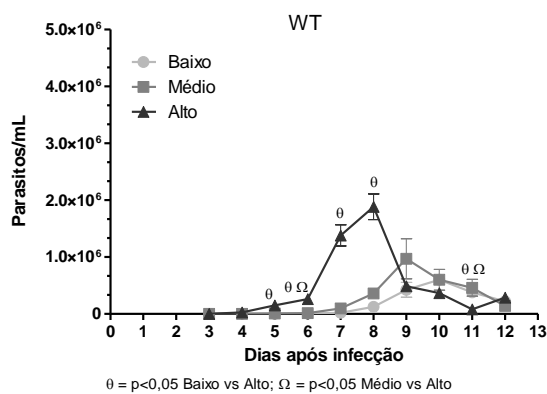
20

21

22

23





1 **Figura 3.** Curva de Parasitemia realizada diariamente para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. O  
 2 gráfico representa o número de parasitos/ml na escala logarítmica de base 10. Os valores foram  
 3 expressos em mediana (máximo – mínimo), usando teste não-paramétrico “Kruskal-Wallis” com pós-  
 4 teste “Dunn's Multiple Comparison”.  $\pi = p < 0,05$  Baixo vs Médio;  $\theta = p < 0,05$  Baixo vs Alto;  $\Omega = p < 0,05$   
 5 Médio vs Alto.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

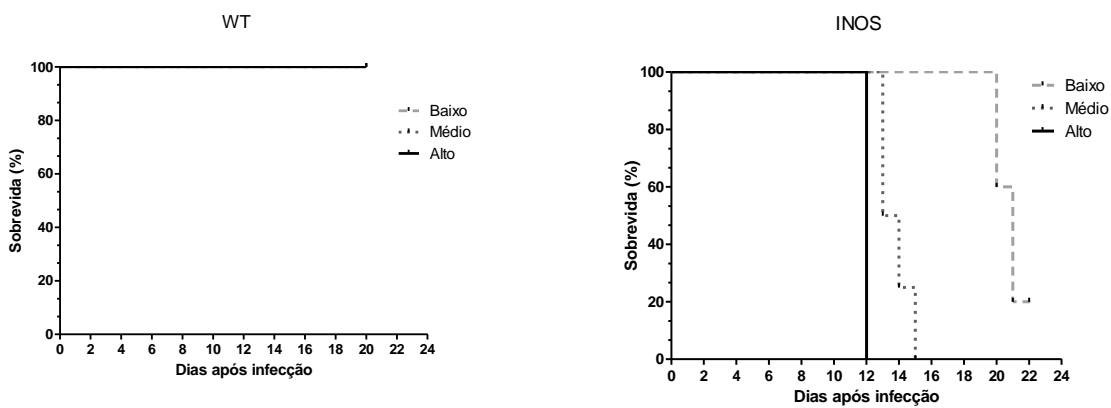
26

## 1 5.2. Curva de Sobrevida

2

3 A curva de sobrevida (Figura 4) demonstra a porcentagem de sobrevivência  
 4 dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados  
 5 com diferentes inóculos ao longo do período analisado. Observamos 100% de  
 6 sobrevivência para os animais da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) para todos os  
 7 inóculos e 100% de morte para os animais da linhagem C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> após 12  
 8 dias de infecção para o alto inóculo.

9



10 **Figura 4.** Curva de Sobrevida. O gráfico representa a porcentagem de sobrevida dos animais para as  
 11 linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Houve diferenças estatisticamente significantes.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

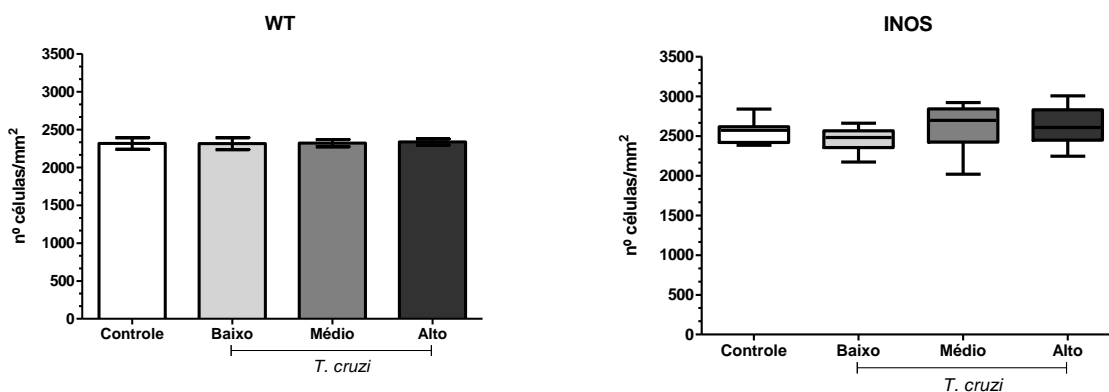
### 1 5.3. Número de células no tecido cardíaco

2

3 Foi realizada a contagem do número de células do tecido cardíaco dos  
4 animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com  
5 diferentes inoculos e os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM para WT e  
6 mediana (máximo - mínimo) para INOS (Figura 5).

7 Para a linhagem C57BL/6 selvagens (WT), o grupo **Controle** obteve valores  
8 de  $2.316,0 \pm 76,89$ , grupo **Baixo**  $2314,0 \pm 78,35$ , grupo **Médio**  $2.320,0 \pm 47,22$  e  
9 grupo **Alto**  $2.336,0 \pm 40,72$ . Para a linhagem C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>, o grupo **Controle**  
10 obteve os valores de  $2.573,0$  ( $2.839,0 - 2.384,0$ ), grupo **Baixo**  $2.481,0$  ( $2.661,0 -$   
11  $2.173,0$ ), grupo **Médio**  $2697,0$  ( $2.921,0 - 2.020,0$ ) e grupo **Alto**  $2.607,0$  ( $3.006,0 -$   
12  $2.245,0$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os  
13 grupos,  $p > 0,05$ .

14



15 **Figura 5.** Número de células no tecido cardíaco expresso em  $\text{mm}^2$  para as linhagens C57BL/6 WT e  
16 iNOS<sup>-/-</sup>. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM para WT, Teste ANOVA, pós-teste "Tukey's  
17 Multiple Comparison" e mediana (máximo - mínimo) para INOS "Kruskal-Wallis" com pós-teste  
18 "Dunn's Multiple Comparison". Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos  
19 analisados,  $p > 0,05$ .

20

21

22

23

24

25

26

27

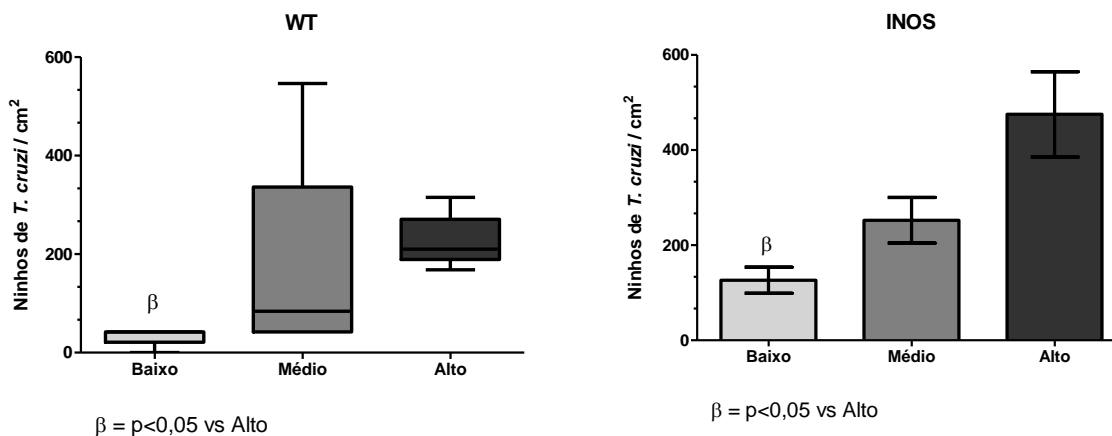
1 5.4. Quantificação dos ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica

2

3 Foi realizada a quantificação de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco  
 4 expressos em  $\text{cm}^2$  dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 -  
 5 iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos e os valores foram expressos em  
 6 mediana (máximo - mínimo) para WT e média  $\pm$  EPM para INOS (Figura 6).

7 Para a linhagem C57BL/6 selvagens (WT), o grupo **Baixo** obteve valores de  
 8 42,04 (42,0 - 0,0), grupo **Médio** 84,1 (546,6 - 42,0) e grupo **Alto** 210,2 (315,3 -  
 9 168,2). Para a linhagem C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>, o grupo **Baixo** obteve os valores de  
 10  $126,1 \pm 27,4$ , grupo **Médio**  $252,3 \pm 47,9$  e grupo **Alto**  $475,1 \pm 89,8$ . Para ambas as  
 11 linhagens de camundongos foram observadas diferenças estatisticamente  
 12 significantes entre os grupos **Baixo** x **Alto**,  $p < 0,05$ .

13



14 **Figura 6.** Quantificação do número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco por Imunohistoquímica,  
 15 expressos em  $\text{cm}^2$  para as linhagens C57BL/6 WT e iNOS<sup>-/-</sup>. Os valores foram expressos em  
 16 mediana (máximo – mínimo) para WT, “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn’s Multiple Comparison” e  
 17 média  $\pm$  EPM para INOS Teste ANOVA, pós-teste “Tukey’s Multiple Comparison”. Houve diferenças  
 18 estatisticamente significativas entre os grupos analisados,  $\beta = p < 0,05$  vs Alto.

19

20

21

22

23

24

25

26

## 1 5.5. Quantificação do Hemograma e Reticulócitos

2

### 3 5.5.1. Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito

4

5 Foi realizada a quantificação do número de Hemácias, Hemoglobina e  
 6 Hematócrito no sangue dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e  
 7 C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos (Figura 7) e os valores foram  
 8 expressos em mediana (máximo - mínimo) para Hemácias, Hemoglobina,  
 9 Hematócrito – WT, Hemácias, Hematócrito – INOS e média  $\pm$  EPM para  
 10 Hemoglobina INOS (Tabela 2). Foram observadas diferenças estatisticamente  
 11 significantes entre os grupos, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

12

13 **Tabela 2.** Valores da mediana (máximo – mínimo) e média  $\pm$  EPM referentes à  
 14 quantificação do número de Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito realizada com  
 15 os grupos Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto com ambas linhagens de  
 16 camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Hemácias	8.920.000,0 (9.690.000,0 – 8.620.000,0)	7.778.000,0 (8.040.000,0 – 7.580.000,0)	7.610.000,0 (7.630.000,0 – 7.530.000,0)	6.389.000,0 (6.430.000,0 – 6.320.000,0)
Hemoglobina	13,5 (14,2 - 12,4)	11,7 (11,8 - 11,4)	11,2 (11,6 - 10,9)	9,9 (10,4 - 9,6)
Hematócrito	46,1 (49,4 - 42,2)	37,2 (38,4 - 36,1)	35,8 (36,0 - 35,3)	30,0 (31,0 - 29,5)
17 Mediana (máximo – mínimo)				
C57BL/6 - iNOS <sup>-/-</sup>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Hemácias	9.410.000,0 (1.061.000,0 - 5.770.000,0)	8.830.000,0 (9.290.000,0 - 6.540.000,0)	7.330.000,0 (8.650.000,0 - 4.070.000,0)	7.530.000,0 (7.710.000,0 - 6.610.000,0)
Hemoglobina*	13,2 $\pm$ 0,7	12,3 $\pm$ 0,6	10,6 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 0,3
Hematócrito	44,1 (50,1 - 26,2)	40,5 (42,6 - 33,0)	33,1 (39,5 - 28,8)	33,5 (34,50 - 29,2)
19 Mediana (máximo – mínimo), * Média $\pm$ EPM				

20

21

22

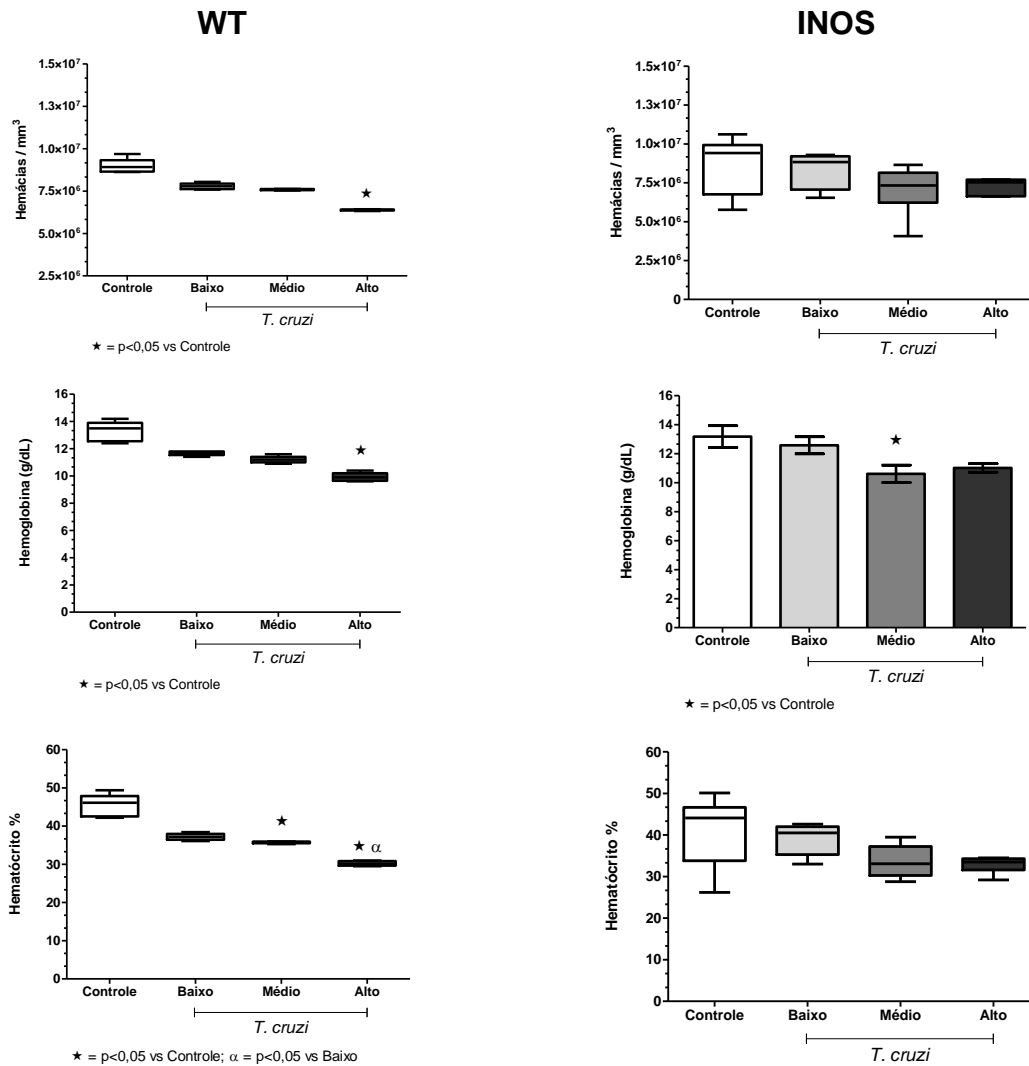
23

24

25

26

27



1 **Figura 7.** Quantificação de Hemácias, Hemoglobina e Hematócrito no sangue dos animais das  
 2 linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os  
 3 valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) quando usado teste não-paramétrico  
 4 “Kruskal-Wallis” com pós-teste “Dunn's Multiple Comparison” e média ± EPM quando usado teste  
 5 paramétrico ANOVA, pós-teste “Tukey's Multiple Comparison”. Houve diferenças estatisticamente  
 6 significantes, onde \* = p<0,05 vs Controle e α = p<0,05 vs Baixo.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

1 5.5.2. VCM, HCM e Reticulócitos

2

3 Foi realizada a análise do VCM, HCM e contagem de Reticulócitos no sangue  
 4 dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados  
 5 com diferentes inoculos (Figura 8) e os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM  
 6 (Tabela 3). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes, onde \* =  
 7  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

8

9 **Tabela 3.** Valores da média  $\pm$  EPM referentes à quantificação do VCM, HCM e  
 10 número de Reticulócitos dos grupos Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto com  
 11 ambas linhagens de camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
VCM	50,8 $\pm$ 1,1	47,6 $\pm$ 0,5	47,0 $\pm$ 0,3	47,2 $\pm$ 0,4
HCM	14,8 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,1	15,5 $\pm$ 0,2
Reticulócitos	309.138,0 $\pm$ 47.785,0	376.240,0 $\pm$ 30.383,0	234.055,0 $\pm$ 24.610,0	189.335,0 $\pm$ 15.074,0
Média $\pm$ EPM				

C57BL/6 - iNOS <sup>-/-</sup>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
VCM	47,13 $\pm$ 0,4	47,6 $\pm$ 1,2	45,3 $\pm$ 0,5	44,7 $\pm$ 0,3
HCM	15,2 $\pm$ 0,1	15,3 $\pm$ 0,3	15,1 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 0,1
Reticulócitos	173.412,0 $\pm$ 12.514,0	415.620,0 $\pm$ 75.091,0	347.732,0 $\pm$ 28.127,0	298.283,0 $\pm$ 66.006,0
Média $\pm$ EPM				

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

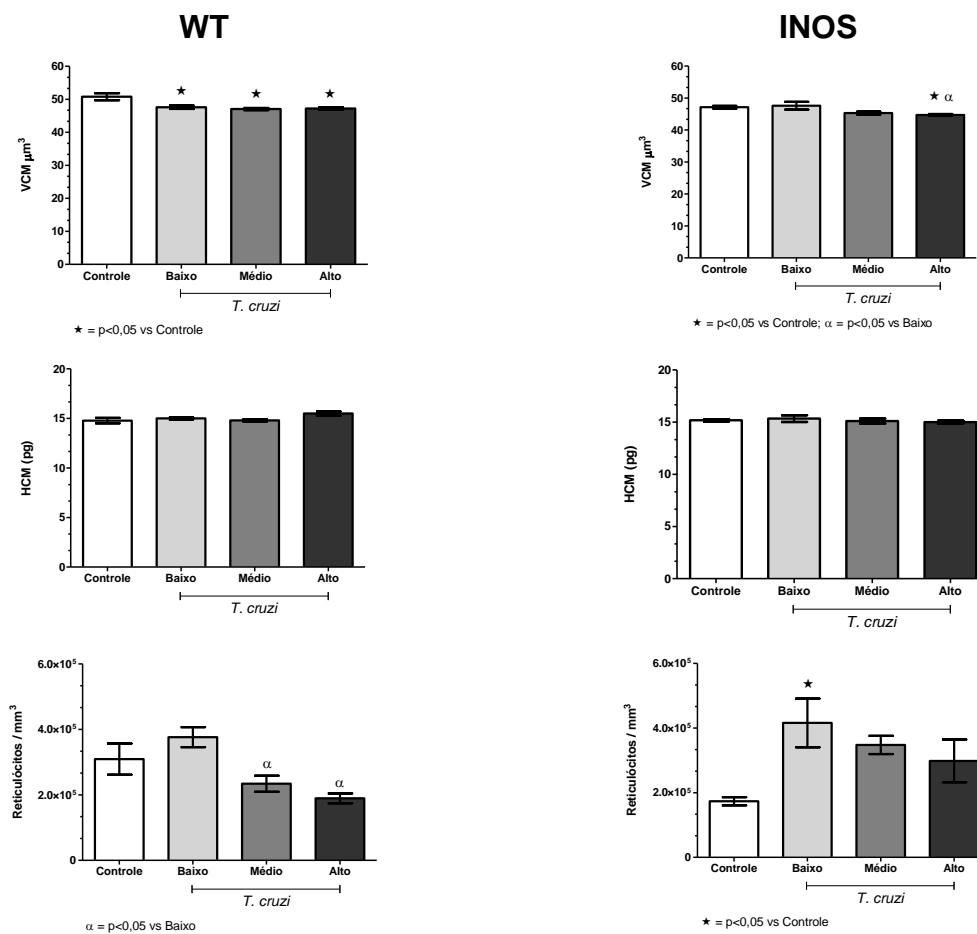
25

26

27

28

1



2 **Figura 8.** Análise do VCM, HCM e contagem de Reticulócitos no sangue periférico dos animais das  
 3 linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os  
 4 valores foram expressos em média  $\pm$  EPM, ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison".  
 5 Diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18



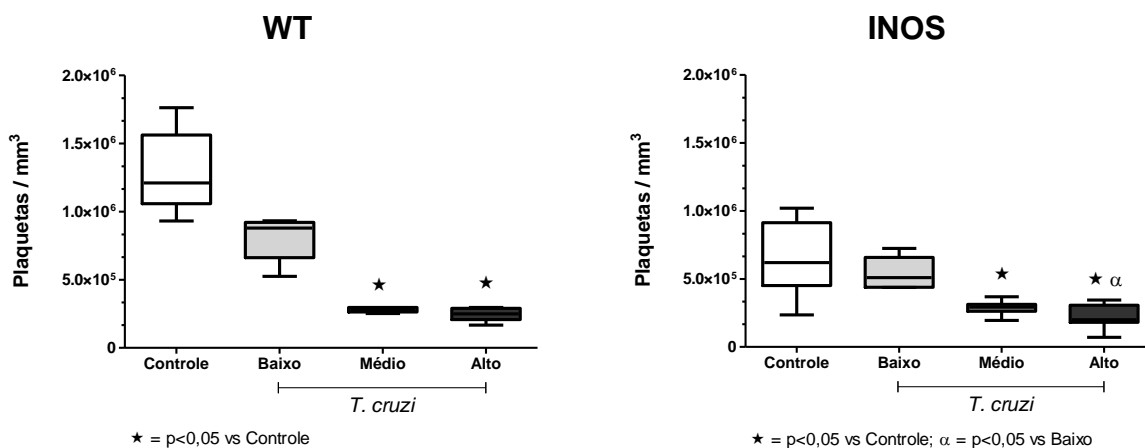
### 1 5.5.3. Plaquetas

2

3 Foi realizada a contagem de Plaquetas no sangue dos animais das linhagens  
4 C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos e  
5 os valores foram expressos em mediana (máximo - mínimo) (Figura 9).

6 Para a linhagem C57BL/6 selvagens (WT), o grupo **Controle** obteve valores  
7 de 1.211.000,0 (1.763.000,0 – 930.960,0), grupo **Baixo** 879.750,0 (932.640,0 –  
8 524.520,0), grupo **Médio** 279.915,0 (296.790,0 – 251.790,0) e grupo **Alto** 248.900,0  
9 (297.040,0 – 167.180,0). Para a linhagem C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup>, o grupo **Controle**  
10 obteve os valores de 620.000,0 (1.020.000,0 – 235.250,0), grupo **Baixo** 510.120,0  
11 (724.620,0 – 437.280,0), grupo **Médio** 292.310,0 (368.280,0 – 195.000,0) e grupo  
12 **Alto** 200.200,0 (344.760,0 – 70.000,0). Foram observadas diferenças  
13 estatisticamente significantes entre os grupos,  $p < 0,05$ .

14



15 **Figura 9.** Contagem de Plaquetas no sangue periférico dos animais das linhagens C57BL/6  
16 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos ao longo do período  
17 analisado. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo), “Kruskal-Wallis” com pós-  
18 teste “Dunn's Multiple Comparison”. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* =  $p < 0,05$  vs  
19 Controle;  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo”.

20

21

22

23

24

25

26

## 1 5.5.4. Leucograma

2

3 Foi realizada a análise do Leucograma no sangue dos animais das linhagens  
 4 C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos  
 5 (Figura 10). Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM (Tabela 4). Foram  
 6 observadas diferenças estatisticamente significantes, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  
 7  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

8

9 **Tabela 4.** Valores da média  $\pm$  EPM referentes à análise do Leucograma dos grupos  
 10 Controle e inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

<b>C57BL/6 selvagens (WT)</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Leucócitos totais	7.640,0 $\pm$ 804,7	4.620,0 $\pm$ 518,1	6.875,0 $\pm$ 418,8	5.933,0 $\pm$ 370,6
Linfócitos	6.717,0 $\pm$ 676,7	3.502,0 $\pm$ 439,4	4.939,0 $\pm$ 372,8	4.636,0 $\pm$ 388,1
Monócitos	355,0 $\pm$ 179,1	357,8 $\pm$ 65,1	1259,0 $\pm$ 137,2	792,9 $\pm$ 49,4
Neutrófilos	567,6 $\pm$ 130,2	760,2 $\pm$ 110,2	677,8 $\pm$ 86,8	514,0 $\pm$ 52,2
11 Média $\pm$ EPM				
<b>C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup></b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Leucócitos totais	6.413,0 $\pm$ 818,4	11.240,0 $\pm$ 1.285,0	10.870,0 $\pm$ 922,8	7.867,0 $\pm$ 1.482,0
Linfócitos	6.618,0 $\pm$ 1.091,0	5.884,0 $\pm$ 528,2	7.509,0 $\pm$ 530,7	6.082,0 $\pm$ 1.122,0
Monócitos	353,9 $\pm$ 106,0	1.696,0 $\pm$ 232,7	1.589,0 $\pm$ 307,4	1.014,0 $\pm$ 174,0
Neutrófilos	428,6 $\pm$ 94,8	3.660,0 $\pm$ 614,4	1.771,0 $\pm$ 526,0	770,6 $\pm$ 269,9
12 Média $\pm$ EPM				

13

14

15

16

17

18

19

20

21

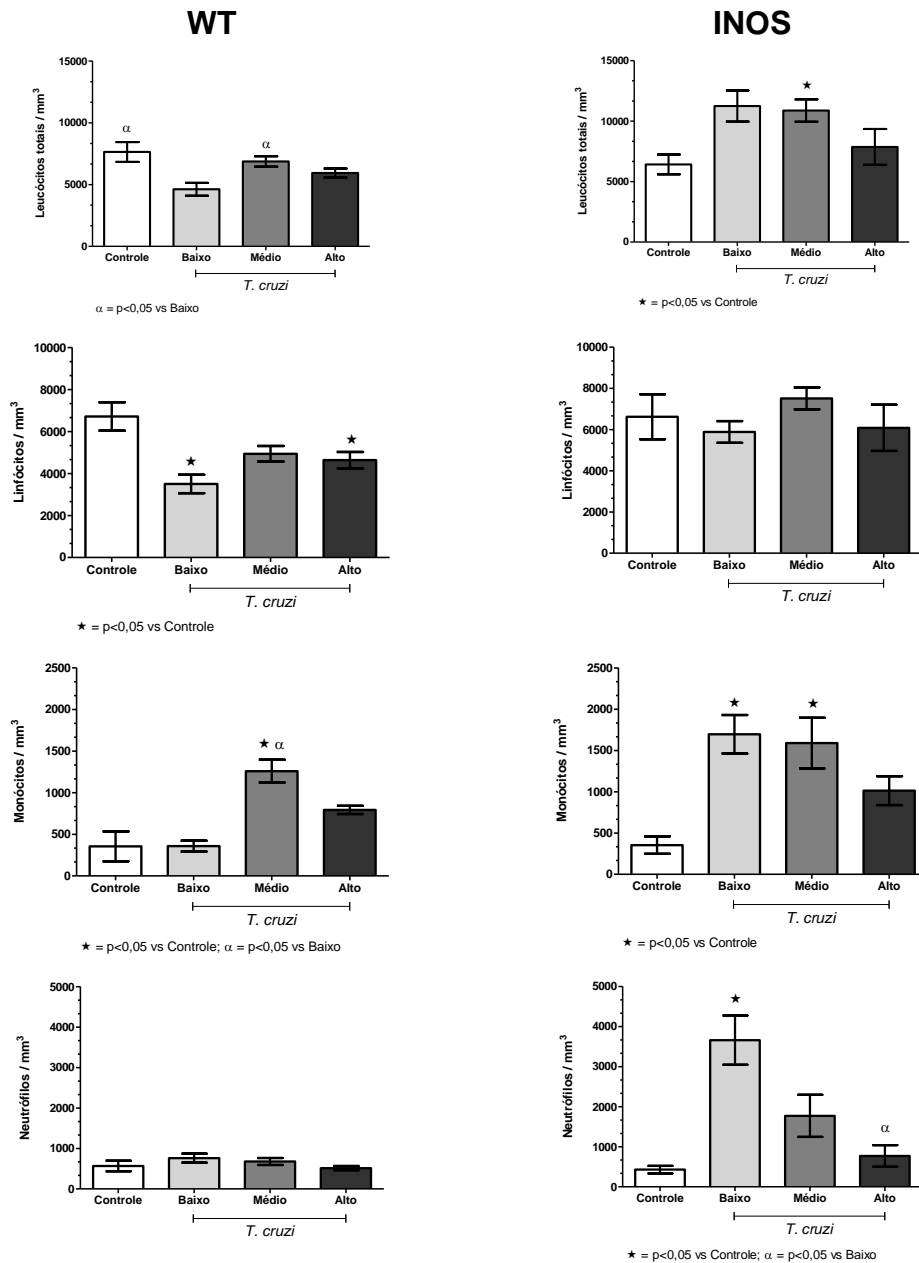
22

23

24

25

26



1 **Figura 10.** Análise do Leucograma no sangue dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e  
 2 C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média ± EPM  
 3 ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \*  
 4 = p<0,05 vs Controle; α = p<0,05 vs Baixo".

5

6

7

8

9

10

11

## 1 5.6. Análise Bioquímica

2

## 3 5.6.1. Avaliação dos parâmetros plasmáticos renal

4

5 Foram quantificados os metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro no plasma  
6 dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados  
7 com diferentes inoculos (Figura 11). Os valores foram expressos em mediana  
8 (máximo – mínimo) para C57BL/6 selvagens (WT) e média  $\pm$  EPM para C57BL/6 -  
9 iNOS-/- (Tabela 5). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes,  
10 onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

11

12 **Tabela 5.** Valores da mediana (máximo – mínimo) e média  $\pm$  EPM referentes à  
13 quantificação dos metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro no plasma dos grupos  
14 Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

<b>C57BL/6 selvagens (WT)</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Uréia	36,8 (37,6 - 36,3)	35,6 (36,1 - 35,4)	47,8 (47,9 - 47,5)	52,9 (59,4 - 51,1)
Sódio	165,3 (182,0 - 156,0)	151,0 (153,0 - 150,0)	150,5 (152,0 - 149,0)	150,0 (151,0 - 149,0)
Potássio	7.620,0 (8.070,0 - 6.840,0)	6.260,0 (6.310,0 - 5.950,0)	7.275,0 (8.570,0 - 6.520,0)	6.760,0 (7.090,0 - 6.050,0)
Cloro	122,8 (135,9 - 115,4)	112,2 (112,9 - 111,5)	112,8 (114,9 - 109,6)	115,5 (117,8 - 113,9)
15	Mediana (máximo – mínimo)			
<b>C57BL/6 - iNOS-/-</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Uréia	41,4 $\pm$ 3,4	46,1 $\pm$ 3,4	43,4 $\pm$ 1,9	46,7 $\pm$ 1,5
Sódio	148,6 $\pm$ 2,1	149,0 $\pm$ 1,7	146,5 $\pm$ 1,5	149,0 $\pm$ 1,4
Potássio	6,3 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	7,7 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,3
Cloro	109,1 $\pm$ 1,8	109,1 $\pm$ 1,4	110,0 $\pm$ 0,9	113,0 $\pm$ 1,7
16	Média $\pm$ EPM			

17

18

19

20

21

22

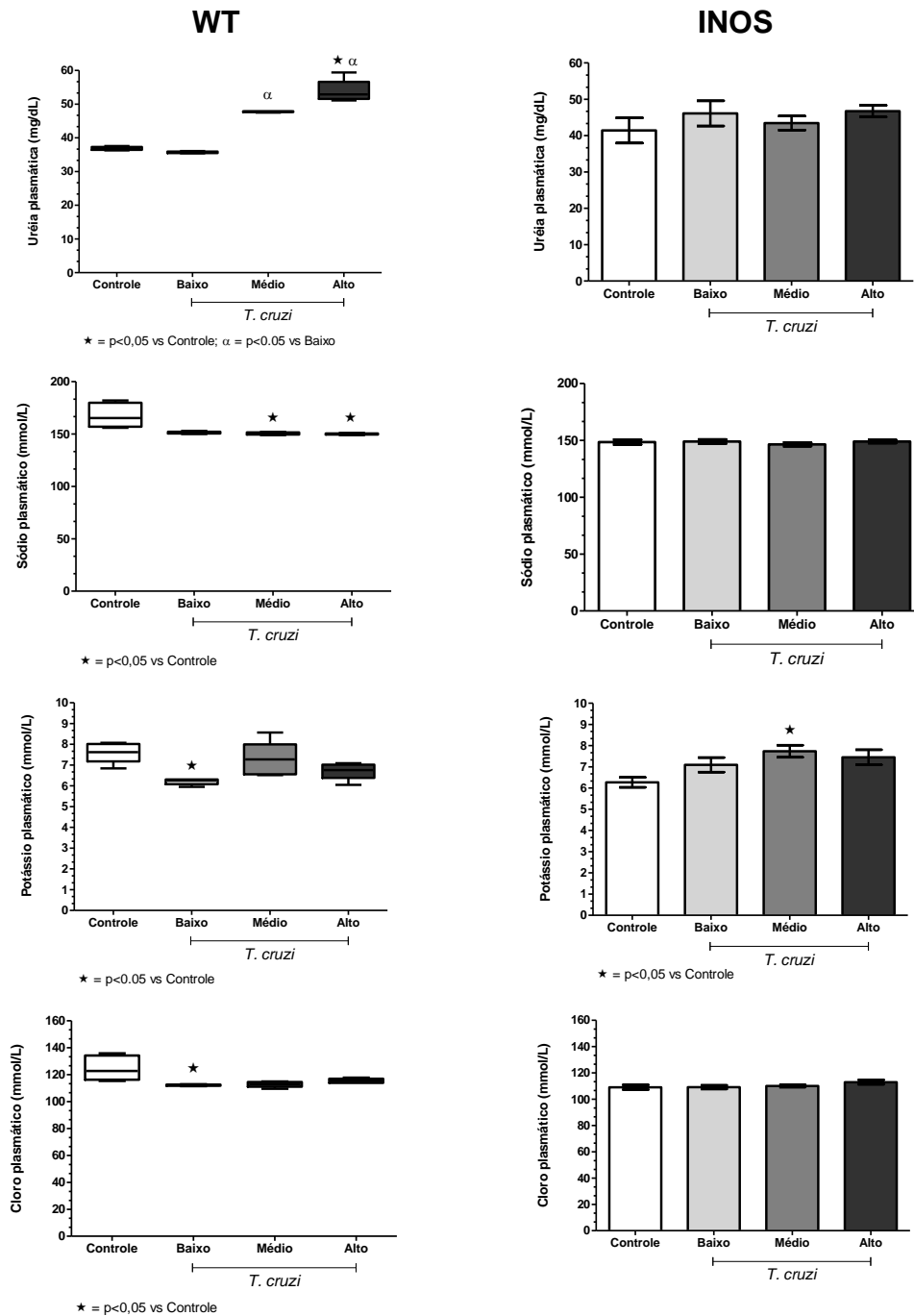
23

24

25

26

27



1 **Figura 11.** Quantificação dos metabólitos para avaliação dos parâmetros plasmáticos renal dos  
 2 animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes  
 3 inoculos. Os valores foram expressos em mediana (máximo – mínimo) “Kruskal-Wallis” com pós-teste  
 4 “Dunn's Multiple Comparison” para as análises dos grupos dos animais C57BL/6 selvagens (WT) e  
 5 média ± EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" para análises dos grupos de animais  
 6 C57BL/6 - iNOS-/. Existem diferenças estatisticamente significantes, \* = p<0,05 vs Controle; α =  
 7 p<0,05 vs Baixo".

8

9

10

11

## 1 5.6.2. Avaliação dos parâmetros urinários renal

2

3 Foram quantificados os metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro na urina  
4 dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-/- infectados  
5 com diferentes inoculos (Figura 12). Os valores foram expressos em mediana  
6 (máximo – mínimo) e média  $\pm$  EPM (Tabela 6). Foram observadas diferenças  
7 estatisticamente significantes, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle.

8

9 **Tabela 6.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à  
10 quantificação dos metabólitos Uréia, Sódio, Potássio e Cloro na urina dos grupos  
11 Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

<b>C57BL/6 selvagens (WT)</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Uréia	11.487,0 $\pm$ 704,8	7.427,0 $\pm$ 934,8	7.759,0 $\pm$ 671,7	6.526,0 $\pm$ 865,7
Sódio	119,6 $\pm$ 16,0	83,6 $\pm$ 4,3	120,4 $\pm$ 9,8	80,2 $\pm$ 9,1
Potássio	734,9 $\pm$ 71,8	430,3 $\pm$ 60,1	423,9 $\pm$ 30,4	325,7 $\pm$ 43,0
*Cloro	343,0 (460,1 - 284,8)	260,2 (348,5 - 176,5)	333,9 (334,7 - 256,6)	221,7 (304,6 - 141,3)
12	Média $\pm$ EPM ; *Mediana (máximo – mínimo)			
<b>C57BL/6 - iNOS-/-</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Uréia	7.590,0 $\pm$ 997,2	9.355,0 $\pm$ 630,9	8.618,0 $\pm$ 506,4	8.700,0 $\pm$ 295,6
*Sódio	117 (194 - 78)	154,5 (248,0 - 109,0)	151,5 (166,0 - 120,0)	124,0 (187,0 - 87,0)
Potássio	343,8 $\pm$ 38,5	378,7 $\pm$ 24,3	356,8 $\pm$ 23,8	361,7 $\pm$ 25,0
Cloro	216,5 $\pm$ 22,7	252,9 $\pm$ 12,9	272,5 $\pm$ 14,0	271,5 $\pm$ 21,8
13	Média $\pm$ EPM ; *Mediana (máximo – mínimo)			

14

15

16

17

18

19

20

21

22

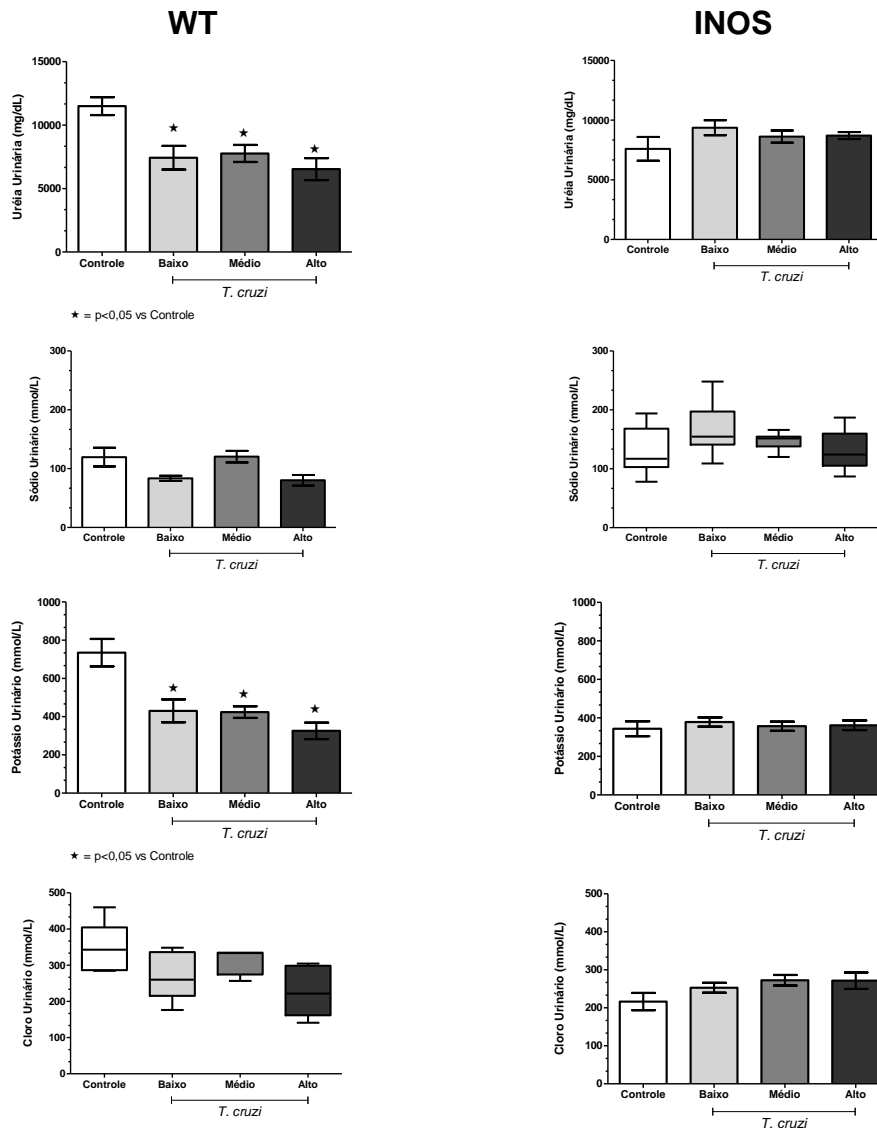
23

24

25

26

27



1 **Figura 12.** Quantificação dos metabólitos para avaliação dos parâmetros urinários renal dos animais  
 2 das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os  
 3 valores foram expressos em média ± EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e  
 4 mediana (máximo – mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison". Existem  
 5 diferenças estatisticamente significantes, \* = p<0,05 vs Controle.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

1 5.6.3. Avaliação dos parâmetros renal – Creatinina urinária, Proteinúria e Clearance  
2 de creatinina

3

4 Foram quantificados os metabólitos Creatinina urinária, Proteinúria e  
5 Clearance de creatinina dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e  
6 C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos (Figura 13). Os valores foram  
7 expressos em mediana (máximo – mínimo) e média  $\pm$  EPM (Tabela 7). Foram  
8 observadas diferenças estatisticamente significantes, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  
9  $\beta$  =  $p < 0,05$  vs Alto.

10

11 **Tabela 7.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à  
12 quantificação dos metabólitos Creatinina urinária, Proteinúria e Clearance de  
13 creatinina dos grupos Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto para ambas as  
14 linhagens de camundongos.

<b>C57BL/6 selvagens (WT)</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Creatinina urinária	37,1 $\pm$ 1,4	35,7 $\pm$ 2,6	39,1 $\pm$ 4,5	33,4 $\pm$ 4,0
*Proteinúria	658,8 (1.051,0 - 577,2)	475,2 (803,4 - 394,5)	710,8 (799,9 - 489,8)	387,9 (419,0 - 364,5)
Clearance de creatinina	0,1047 $\pm$ 0,015	0,1233 $\pm$ 0,065	0,1165 $\pm$ 0,024	0,1166 $\pm$ 0,012
15 Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				
16				
<b>C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup></b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Creatinina urinária	31,1 $\pm$ 2,7	46,5 $\pm$ 4,7	44,9 $\pm$ 2,4	53,8 $\pm$ 3,5
*Proteinúria	495,1 (897,7 - 265,4)	395,0 (970,8 - 20,0)	371,8 (697,4 - 227,7)	356,8 (431,4 - 228,6)
Clearance de creatinina	0,0995 $\pm$ 0,017	0,1242 $\pm$ 0,020	0,1381 $\pm$ 0,013	0,1177 $\pm$ 0,023
17 Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				

18

19

20

21

22

23

24

25

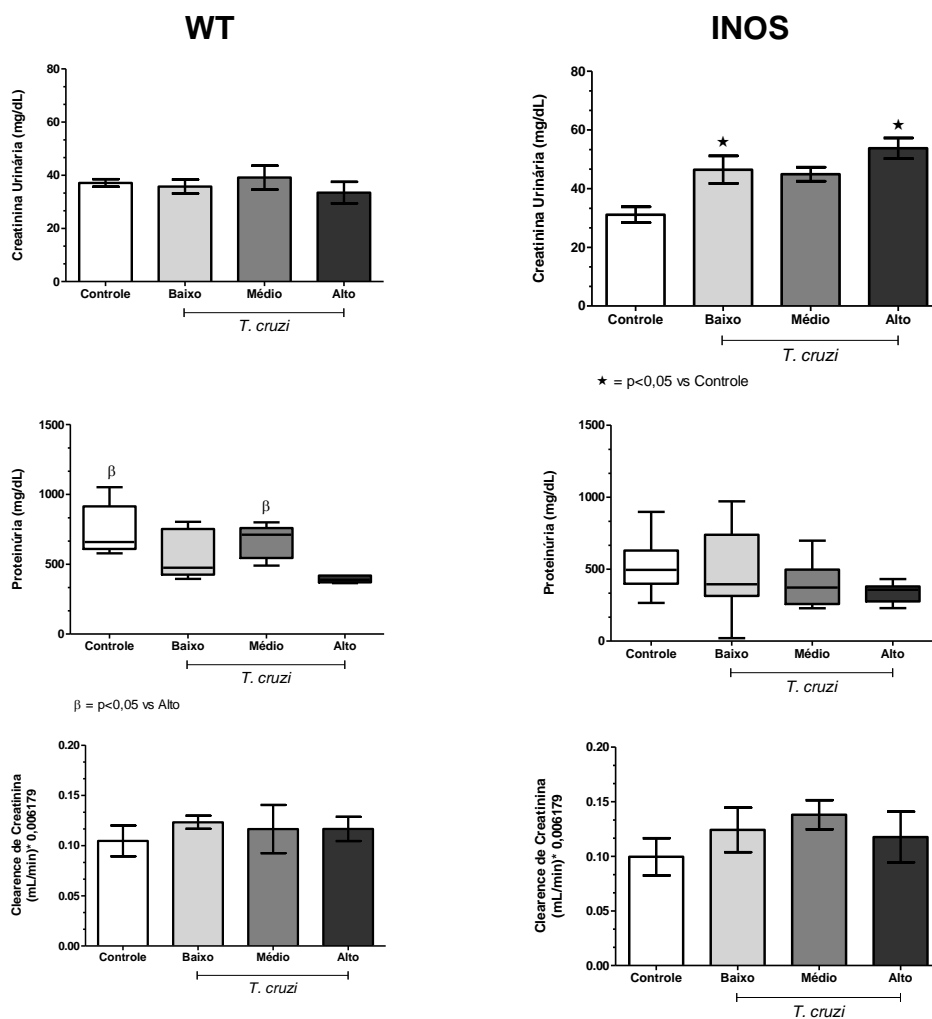
26

27

28

29





1 **Figura 13.** Quantificação dos metabólitos Creatinina, Proteinúria e Clearance de creatinina na urina  
 2 de 24 horas para avaliação dos parâmetros urinários renal dos animais das linhagens C57BL/6  
 3 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos  
 4 em média ± EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo)  
 5 "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente  
 6 significantes, \* = p<0,05 vs Controle, β = p<0,05 vs Alto.

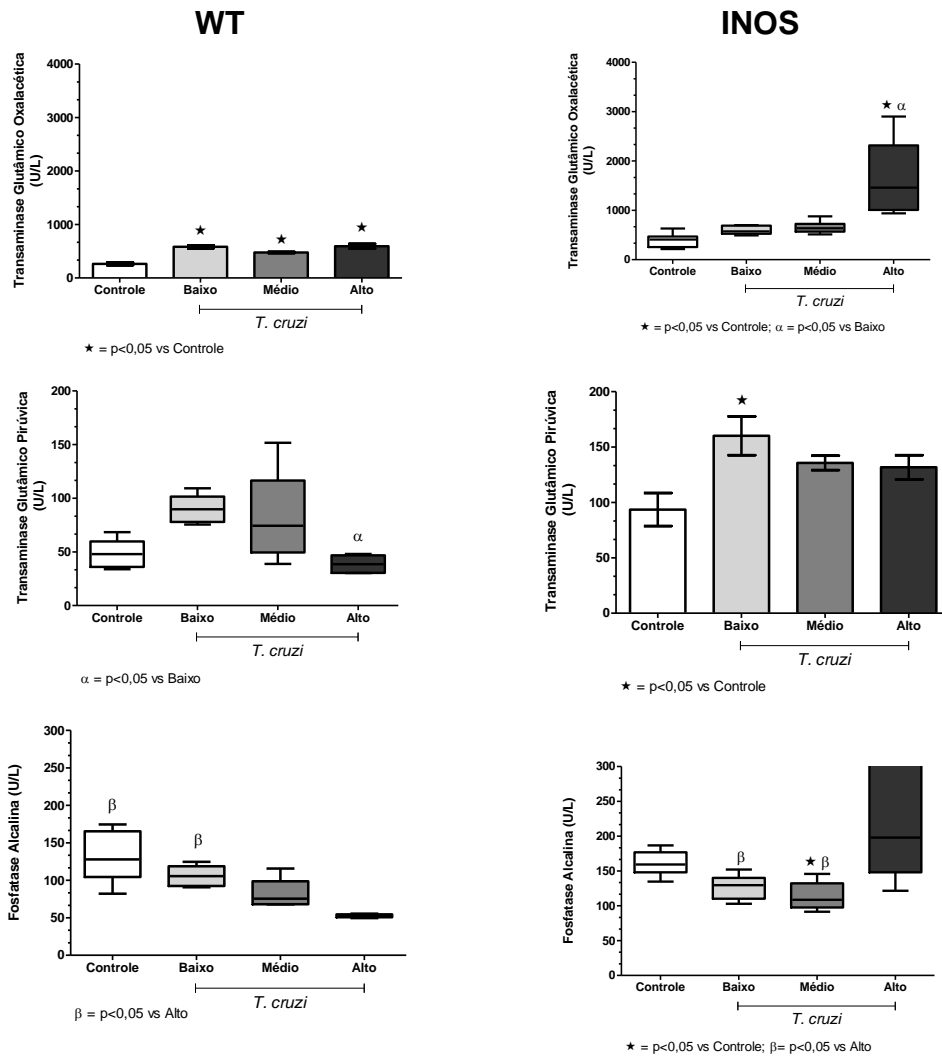
7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17

#### 5.6.4. Avaliação dos parâmetros hepáticos - TGO, TGP e Fosfatase Alcalina

Foram quantificados os parâmetros TGO, TGP e Fosfatase Alcalina dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos (Figura 14). Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) (Tabela 8). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle,  $\alpha$  =  $p < 0,05$  vs Baixo e  $\beta$  =  $p < 0,05$  vs Alto.

**Tabela 8.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à quantificação dos parâmetros TGO, TGP e Fosfatase Alcalina dos grupos Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
TGO	263,8 $\pm$ 27,4	583,4 $\pm$ 29,1	477,4 $\pm$ 13,0	594,5 $\pm$ 44,8
*TGP	47,9 (68,4 - 33,9)	89,71 (109,3 - 75,4)	74,3 (151,7 - 38,7)	38,6 (48,0 - 30,3)
*Fosfatase Alcalina	127,9 (174,6 - 82,1)	105,6 (124,7 - 90,7)	75,57 (115,6 - 68,0)	52,62 (55,6 - 49,7)
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				
C57BL/6 - iNOS <sup>-/-</sup>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
*TGO	407,7 (632,3 - 214,5)	573,8 (700,0 - 492,5)	635,8 (877,9 - 511,3)	1.461,0 (2.901,0 - 939,7)
TGP	94,0 $\pm$ 15,0	160,2 $\pm$ 17,5	135,7 $\pm$ 6,5	131,8 $\pm$ 10,9
*Fosfatase Alcalina	159,3 (186,8 - 134,7)	129,7 (152,0 - 103,0)	108,7 (145,9 - 91,5)	198,1 (361,4 - 121,6)
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				



1 **Figura 14.** Quantificação dos parâmetros TGO, TGP e Fosfatase Alcalina para avaliação bioquímica  
 2 hepática dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com  
 3 diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's  
 4 Multiple Comparison" e mediana (máximo - mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple  
 5 Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* = p<0,05 vs Controle,  $\alpha$  = p<0,05 vs  
 6 Baixo e  $\beta$  = p<0,05 vs Alto.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

1 5.6.5 Avaliação dos parâmetros hepáticos - Proteínas totais, Albumina, Globulina,  
2 Relação A/G

3

4 Foram quantificados os parâmetros Proteínas totais, Albumina, Globulina e  
5 Relação A/G dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS-  
6 /- infectados com diferentes inoculos (Figura 15). Os valores foram expressos em  
7 média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) (Tabela 9). Foram observadas  
8 diferenças estatisticamente significantes, onde  $\alpha = p < 0,05$  vs Controle,  $\alpha = p < 0,05$  vs  
9 Baixo e  $\beta = p < 0,05$  vs Alto.

10

11 **Tabela 9.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à  
12 quantificação dos parâmetros Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação A/G  
13 dos grupos Controle e inoculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de  
14 camundongos.

<b>C57BL/6 selvagens (WT)</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Proteínas Totais	5,4 $\pm$ 0,11	5,1 $\pm$ 0,04	5,013 $\pm$ 0,12	4,6 $\pm$ 0,07
*Albumina	3,9 (4,8 - 3,3)	2,9 (3,1 - 2,9)	2,7 (2,9 - 2,4)	2,4 (2,5 - 2,3)
*Globulina	1,2 (1,9 - 0,9)	2,2 (2,2 - 2,1)	2,3 (2,4 - 2,1)	2,2 (2,5 - 2,0)
*Relação A/G	3,3 (5,1 - 1,7)	1,4 (1,4 - 1,3)	1,2 (1,3 - 1,0)	1,1 (1,2 - 1,0)
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				
<b>C57BL/6 - iNOS-/-</b>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
Proteínas Totais	5,7 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,2
*Albumina	3,6 (4,0 - 3,3)	3,5 (4,0 - 3,3)	2,7 (2,7 - 2,6)	2,6 (2,9 - 2,4)
*Globulina	1,9 (2,4 - 1,7)	2,8 (3,2 - 2,2)	3,2 (3,3 - 2,6)	4,1(5,0 - 3,7)
Relação A/G	1,8 $\pm$ 0,06	1,2 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,03
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				

15

16

17

18

19

20

21

22

23

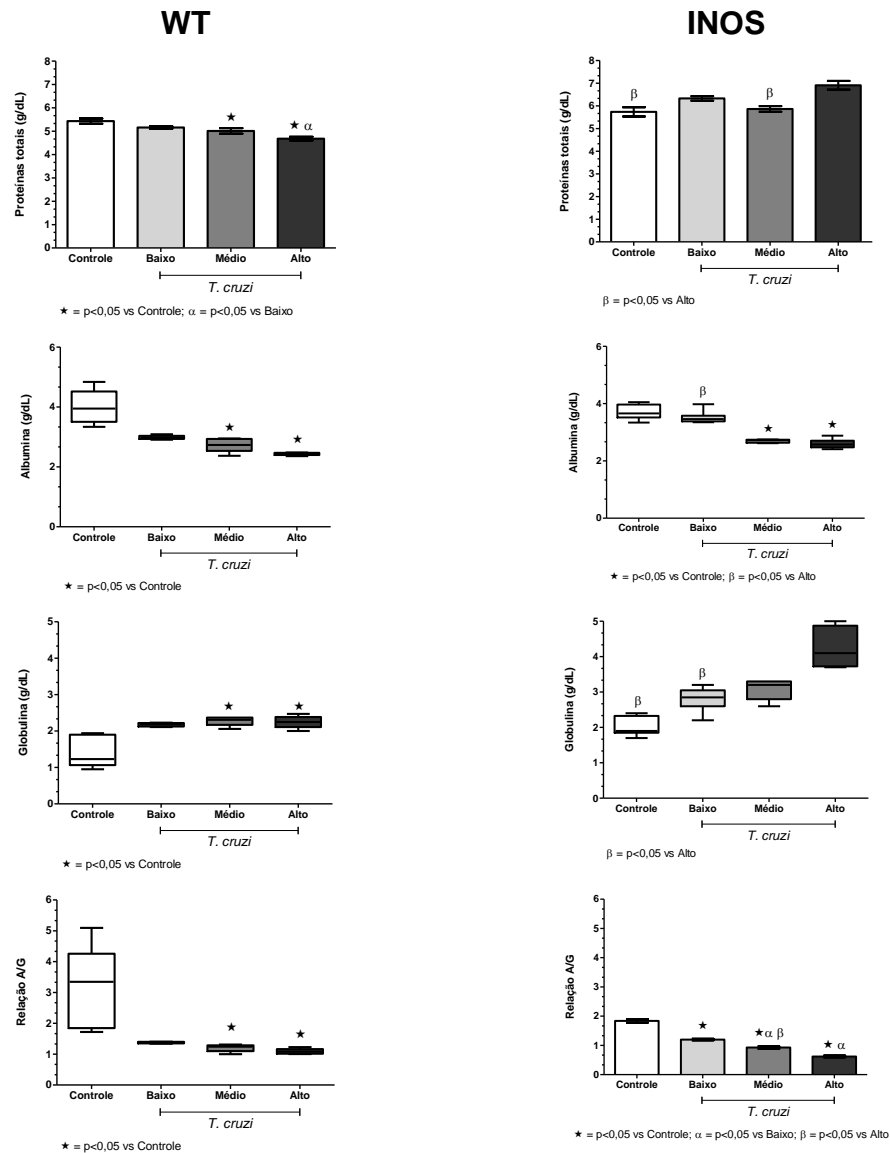
24

25

26

27

28



1 **Figura 15.** Quantificação dos parâmetros Proteínas totais, Albumina, Globulina e Relação A/G para  
 2 avaliação bioquímica hepática dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 -  
 3 iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média ± EPM ANOVA,  
 4 pós-teste "Tukey's Multiple Comparison" e mediana (máximo – mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-  
 5 teste "Dunn's Multiple Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* = p<0,05 vs  
 6 Controle, α = p<0,05 vs Baixo e β = p<0,05 vs Alto.

7

8

9

10

11

12

13

14

1 5.6.6. Avaliação dos parâmetros bioquímicos CPK e CKMB

2

3 Foram quantificados os parâmetros CPK e CKMB dos animais das linhagens  
4 C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes inoculos  
5 (Figura 16). Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e mediana (máximo –  
6 mínimo) (Tabela 10). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes,  
7 onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle e  $\alpha = p < 0,05$  vs Baixo.

8

9 **Tabela 10.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à  
10 quantificação dos parâmetros CPK e CKMB dos grupos Controle e inoculos Baixo,  
11 Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
*CPK	584,4 (837,5 - 346,0)	5.456,0 (8.402,0 - 2.315,0)	3.202,0 (10.721,0 - 633,0)	2.511,0 (5.045,0 - 1.171,0)
CKMB	535,0 $\pm$ 42,7	807,0 $\pm$ 79,5	799,5 $\pm$ 131,4	658,5 $\pm$ 50,4
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				

12

C57BL/6 - iNOS <sup>-/-</sup>				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
CPK	747,7 $\pm$ 148,3	1.587,0 $\pm$ 255,1	652,6 $\pm$ 109,4	902,4 $\pm$ 216,6
CKMB	623,8 $\pm$ 99,6	574,9 $\pm$ 50,0	484,6 $\pm$ 32,5	540,8 $\pm$ 59,6
Média $\pm$ EPM; *Mediana (máximo – mínimo)				

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

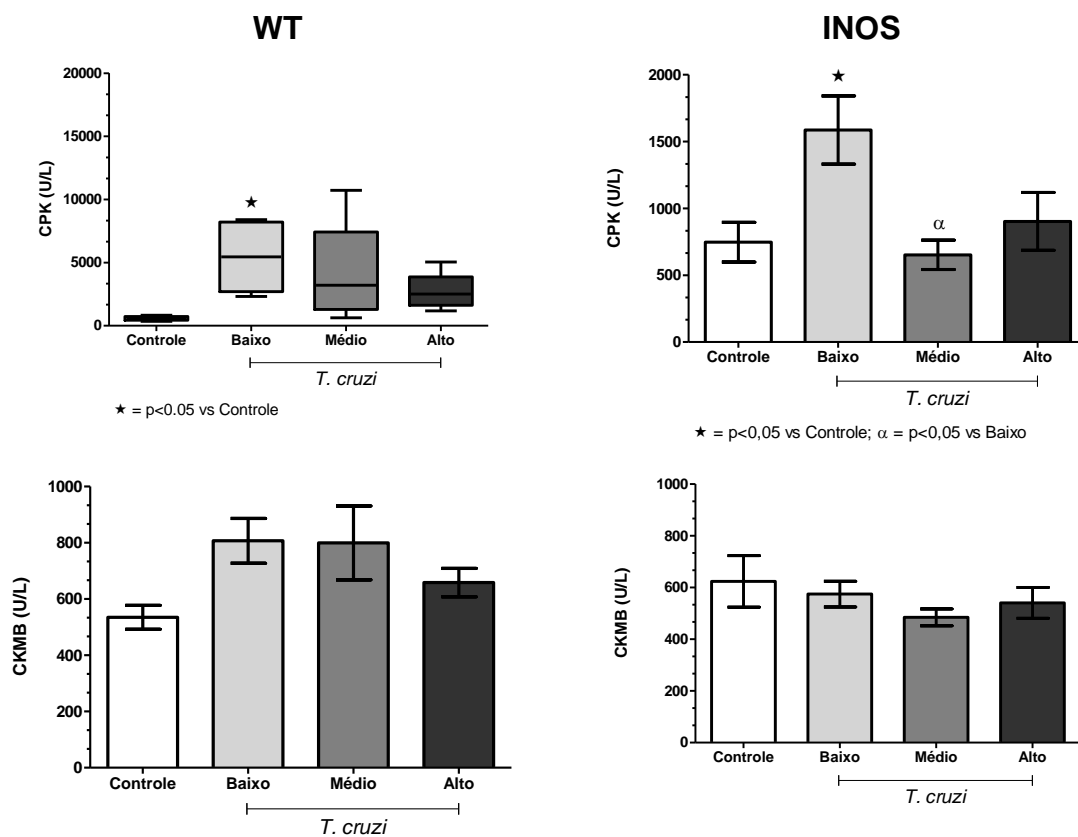
26

27

28

29

30



1 **Figura 16.** Quantificação dos parâmetros CPK e CKMB para avaliação bioquímica cardíaca dos  
 2 animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com diferentes  
 3 inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's Multiple  
 4 Comparison" e mediana (máximo - mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple  
 5 Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* = p<0,05 vs Controle e  $\alpha$  = p<0,05  
 6 vs Baixo.

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

1 5.7. Avaliação das citocinas no homogenato do coração

2

3 Foram quantificados as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12p40 e IL-17

4 no homogenato do coração dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e

5 C57BL/6 - iNOS-/- infectados com diferentes inoculos (Figura 17). Os valores foram

6 expressos em média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) (Tabela 11). Foram

7 observadas diferenças estatisticamente significantes, onde \* =  $p < 0,05$  vs Controle.

8

9 **Tabela 11.** Valores da média  $\pm$  EPM e mediana (máximo – mínimo) referentes à

10 quantificação das citocinas no homogenato do coração dos grupos Controle e

11 inóculos Baixo, Médio e Alto para ambas as linhagens de camundongos.

C57BL/6 selvagens (WT)				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
TNF- $\alpha$	64,0 $\pm$ 24,7	103,3 $\pm$ 14,5	313,3 $\pm$ 58,0	423,3 $\pm$ 39,3
IL-10	115,0 $\pm$ 45,4	203,3 $\pm$ 65,9	533,3 $\pm$ 145,3	606,7 $\pm$ 69,8
IFN- $\gamma$	163,3 $\pm$ 68,4	166,7 $\pm$ 66,9	483,3 $\pm$ 93,9	616,7 $\pm$ 116,7
IL-4	88,9 $\pm$ 27,3	50,0 $\pm$ 6,4	54,8 $\pm$ 7,7	40,3 $\pm$ 8,2
IL-12p40	206,7 $\pm$ 61,7	133,3 $\pm$ 60,1	453,3 $\pm$ 74,2	616,7 $\pm$ 60,1
IL-17	193,3 $\pm$ 63,6	136,7 $\pm$ 47,0	348,3 $\pm$ 77,5	606,7 $\pm$ 69,8

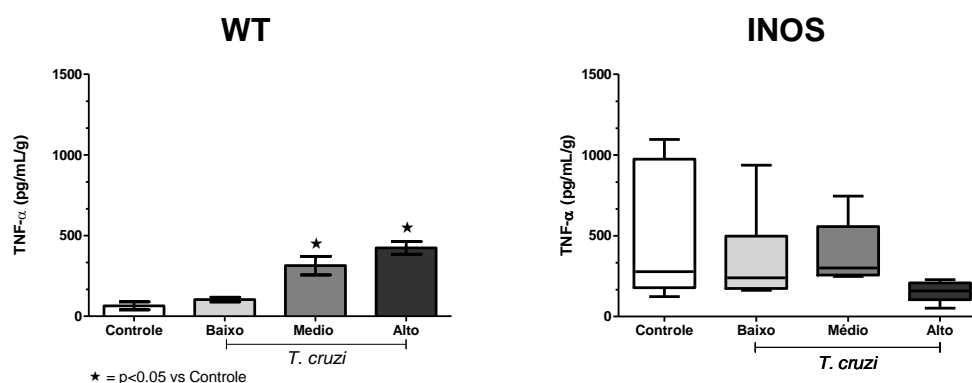
12 Média  $\pm$  EPM

13

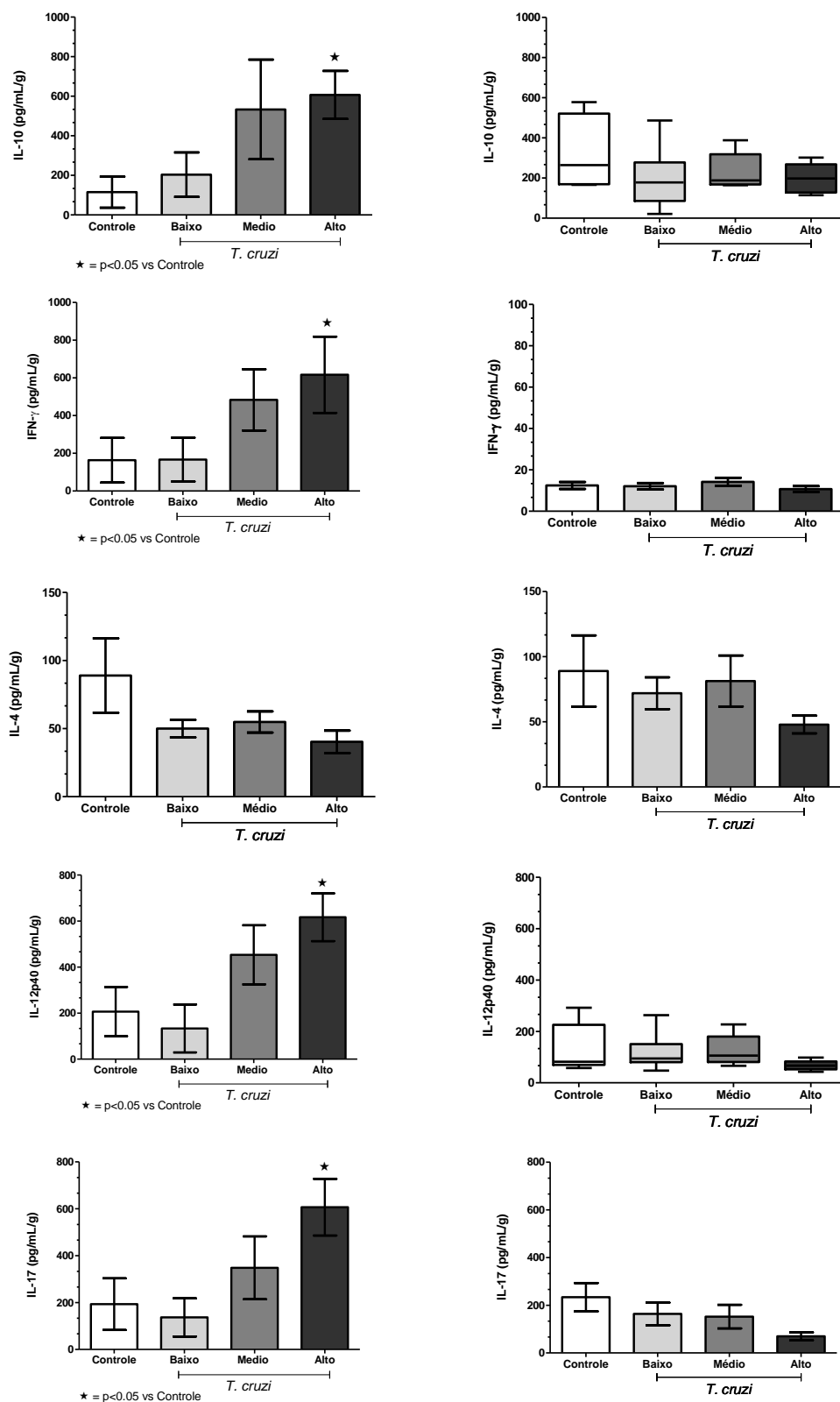
C57BL/6 - iNOS-/-				
	Controle	Baixo	Médio	Alto
*TNF- $\alpha$	278,0 (1.096,0 - 123,6)	239,2 (936,5 - 162,8)	300,7 (745,5 - 247,9)	158,4 (228,3 - 51,5)
*IL-10	264,3 (578,1 - 166,1)	177,8 (486,6 - 21,1)	188,5 (388,3 - 163,8)	198,0 (301,9 - 114,8)
IFN- $\gamma$	12,4 $\pm$ 1,7	12,1 $\pm$ 1,5	14,2 $\pm$ 1,9	10,7 $\pm$ 1,4
IL-4	89,0 $\pm$ 27,3	71,9 $\pm$ 12,2	81,33 $\pm$ 19,6	47,9 $\pm$ 6,8
*IL-12p40	82,2 (292,2 - 57,5)	94,6 (263,4 - 47,4)	105,8 (227,2 - 66,4)	66,9 (98,2 - 43,1)
IL-17	233,9 $\pm$ 59,4	163,6 $\pm$ 47,6	152,4 $\pm$ 49,6	70,0 $\pm$ 16,8

14 Média  $\pm$  EPM; \*Mediana (máximo – mínimo)

15







1 **Figura 17.** Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12p40 e IL-17 no homogenato do  
2 coração dos animais das linhagens C57BL/6 selvagens (WT) e C57BL/6 - iNOS<sup>-/-</sup> infectados com  
3 diferentes inoculos. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM ANOVA, pós-teste "Tukey's  
4 Multiple Comparison" e mediana (máximo - mínimo) "Kruskal-Wallis" com pós-teste "Dunn's Multiple  
5 Comparison". Existem diferenças estatisticamente significantes, \* = p < 0,05 vs Controle.

## 1 6.-DISCUSSÃO

2

3 A DC continua sendo um grave problema de saúde pública, já passa do seu  
4 primeiro centenário após a sua descoberta e ainda continua intrigando a ciência pela  
5 sua variabilidade em sintomatologia clínica, resistência parasitária e relação com o  
6 hospedeiro. As formas de tratamento são limitadas de acordo com as fases da  
7 doença, assim como há uma busca incessante de medidas de vacinação ou mesmo  
8 de cura. Embora exista uma tendência de declínio significativo pelas próximas 3  
9 décadas de indivíduos infectados com a doença, existem pessoas que sofrem com o  
10 desenvolvimento da doença e um risco iminente em novos focos de contágios. Para  
11 isso, a compreensão de todos os mecanismos associados com a doença torna-se de  
12 grande importância, relatando uma breve contribuição para o estudo experimental.

13 Assim a ciência busca minimizar os danos associados a esta doença através  
14 da busca de medidas profiláticas cada vez mais eficientes, terapias vacinais,  
15 tratamentos com efeitos deletérios menores, até mesmo a cura na forma crônica da  
16 doença. Neste sentido, um grande desafio é a modulação da resposta imune, pois  
17 este é um dos mecanismos que se interagem e colabora para os danos associados  
18 com a doença na forma sintomática. Além disso, a ativação imune e participação de  
19 proteínas que em concentrações elevadas favorecem para dano tecidual e  
20 instalação de alterações fisiológicas observadas na doença.

21 Os modelos de estudo têm sido categóricos ao demonstrar que a  
22 variabilidade da doença está relacionada com os complexos polimorfismos gênicos  
23 do parasito e hospedeiro e ainda existem diferentes rotas possíveis direcionadas por  
24 moléculas de sinalização. Aqui nosso estudo permitiu comparar não apenas os  
25 modelos valiosos, C57BL-6 versus C57BL-6 INOS<sup>-/-</sup>, mas também a interação da  
26 carga do inóculo sobre a fisiopatologia da doença.

27 A contribuição da expressão de INOS na DC já demonstrou ser um fator  
28 importante no controle da carga parasitária, independente e/ou dependente da  
29 indução via INF- $\alpha$  (Rottenberg *et al.*, 1996). Nossos dados corroboram com a  
30 literatura, pois evidenciamos um aumento da parasitemia em até 100% nos animais  
31 INOS<sup>-/-</sup>, em relação ao tipo selvagem.

1 Surpreendentemente, os animais knockout morreram após o 12<sup>o</sup> dia de  
2 infecção dose-dependente, atingindo até o 22<sup>o</sup> dia de infecção apenas os animais  
3 com baixa inóculo (apenas 20% dos animais). O aumento de citocinas pró-  
4 inflamatórias como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-1 é prejudicial ao tecido, mas contribui para a  
5 expressão do gene INOS e a produção de componente tripanocida, o óxido nítrico  
6 (Kelly, 2003). Assim, ratifica-se o que evidenciamos, a vulnerabilidade dos animais  
7 pela ausência deste importante componente tripanocida.

8 Acreditamos que a liberação de várias proteínas pró-inflamatórias  
9 contribuíram para lesão de órgãos alvo como o coração e a ausência de INOS não  
10 foi possível controlar eficazmente a proliferação e os danos mediados por parasitas.

11 Em um estudo prévio, nosso grupo pode demonstrar um distúrbio discreto  
12 funcional e renal estrutural no modelo WT (Lemos *et al.*, 2013), o que nos encorajou  
13 a avaliar a função renal em animais KO para INOS, uma vez que as células  
14 justaglomerulares renais estão associadas com a produção de grandes quantidades  
15 de NO, fato que os favorecia em processo infeccioso parasitário (De Oliveira *et al.*,  
16 2011). Nossa avaliação mostrou que a ausência de expressão de INOS não foi um  
17 fator determinante para aumento da lesão renal, acreditamos que o forte tropismo  
18 por moléculas expressas em células-alvo, como cardiomiócitos, desencadeia a  
19 relação do parasita com o miotropismo.

20 Em outro estudo, nosso grupo pode demonstrar que a produção de NO foi  
21 mais evidente em camundongos infectados com doses mais altas do parasito e foi  
22 particularmente pronunciada no sexto dia de infecção, sugerindo que a produção  
23 desse intermediário está relacionada à carga parasitária e ocorre nos primeiros dias  
24 de infecção, possuindo, contudo um papel central na proliferação parasitaria (Lemos  
25 *et al.*, 2013).

26 Biomarcadores laboratoriais são importantes instrumentos para indicar  
27 manifestações em diferentes órgãos, bem como induzir a diagnósticos diferenciais.  
28 Na DC, espera-se um quadro extremamente variável, dado à variabilidade  
29 encontrada entre a relação parasito-hospedeiro. Aqui descrevemos de forma  
30 comparativa diferentes marcadores, de função renal, hepática e cardíaca; onde  
31 observamos diferentes associações carga dependente e expressão INOS-/  
32 dependente. (Barr *et al.*, 1991), já descreveram esta variabilidade clínica laboratorial

1 em cães infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, este desequilíbrio de metabólitos, íons  
2 e enzimas na doença de chagas é diretamente associado na fase aguda da doença  
3 (De Souza *et al.*, 2008).

4 Na avaliação de enzimas hepáticas, a AST também encontrada no tecido  
5 cardíaco foi elevada em grupos infectados knockout. Sugerimos que o aumento de  
6 ninhos de amastigotas, bem como lesões mediadas pelo processo inflamatório,  
7 desempenhou um papel importante na elevação AST. Já sua relação com a doença  
8 hepática é um processo mais raro (Sosa-Estani *et al.*, 2009).

9 Os efeitos observados na contagem das células do sangue, embora sejam de  
10 diferentes intensidades, são reproduzíveis em ambos os grupos. Na proporção de  
11 proteínas, existe um aumento mais elevado (dependente da dose) das globulinas de  
12 animais knockout. Acreditamos que a não interação de citocinas como estimuladores  
13 da retroativação macrófaga pode contribuir para a indução da resposta humoral de  
14 forma imediata. Além disso, a relação pró-inflamatória da expressão do INOS  
15 contribuiu significativamente para a indução de citocinas pró-inflamatórias, algo não  
16 evidenciado em animais knockout. Este achado corrobora com a associação da  
17 produção de NO e aumento da inflamação, também associada à lesão tecidual  
18 (Chandrasekar *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2012).

19 A participação do NO, TNF- $\alpha$  e Prostaglandinas tem sido relacionado com  
20 estresse oxidativo, reportando um aumento de lesões pré-hemolíticas (Malvezi *et al.*,  
21 2004; Tatakihara *et al.*, 2008). Nossos dados corroboram com os achados na  
22 literatura em relação ao aumento do processo hemolítico presente na infecção  
23 aguda pelo *T. cruzi*, onde encontramos uma diminuição dos valores provindos do  
24 Eritrograma nos grupos infectados, dentre eles o número de Eritrócitos,  
25 Hemoglobina, Hematócrito e Índices Hematimétricos (VCM e HCM). No entanto o  
26 processo pelo qual se desencadeia a vulnerabilidade eritrocítica associada à DC  
27 aguda ainda não está clara. Tatakihara *et al.*, (2008) concluíram que a infecção pelo  
28 *T. cruzi* induz lesões pré-hemolíticas na membrana dos eritrócitos através do  
29 estresse oxidativo e que este mecanismo é cepa-dependente. Além disso, nosso  
30 estudo pode contribuir demonstrando que esta variação é inoculo e expressão de  
31 INOS-/- dependente. Para camundongos com elevada produção de NO, a lesão  
32 oxidativa depende da reação do NO com o oxigênio; já para camundongos com

1 baixa produção o dano oxidativo é resultante quase que exclusivamente devido à  
2 produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e não depende da ativação da via  
3 ciclooxigenase, nos camundongos INOS<sup>-/-</sup> não há via ROS. Outro dado  
4 demonstrado por Borges C.L. *et al.*, (2009) é a contribuição da 5-lipoxigenase para o  
5 controle do parasitismo no tecido cardíaco e a sua participação no estresse oxidativo  
6 de eritrócitos dependente da produção de NO endógeno. Malvezi *et al.*, (2004) que  
7 abordam o envolvimento do NO e do TNF- $\alpha$  na associação entre o estresse  
8 oxidativo e anemia na infecção pelo *T. cruzi* afirmam que, embora o NO não  
9 contribua diretamente para o desenvolvimento da anemia, pode favorecer outras  
10 alterações hematológicas durante a infecção, tais como a elevação de Reticulócitos  
11 e a redução de Leucócitos circulantes no sangue periférico.

12 Encontramos também uma variação de tamanho dos elementos eritrocitários  
13 circulantes no sangue periférico dos animais infectados que se reflete em alterações  
14 na Amplitude de Distribuição do Volume dos Eritrócitos (RDW). O aumento de  
15 Reticulócitos em animais infectados com *T. cruzi* foi notado por Tatakihara *et al.*,  
16 (2008) em camundongos BALB/c e C57BL/6. Marcondes *et al.*, (2000) demonstram  
17 uma forte associação entre a diminuição da carga parasitária e diminuição dos  
18 efeitos deletérios encontrados no hemograma de camundongos C3H infectados com  
19 a cepa CL de *T. cruzi* após tratamento antiparasitário pós-infecção. No grupo que  
20 não recebeu tratamento observaram um aumento exponencial da carga parasitária,  
21 anemia, trombocitopenia, leucopenia, e hipoplasia da medula óssea.

22 Em relação ao número de Plaquetas o estímulo dos megacariócitos a uma  
23 fragmentação citoplasmática para geração de novas plaquetas parece ser  
24 importante na DC, uma vez que se mostrou a participação plaquetária no controle *in*  
25 *vivo* da infecção pelo *T. cruzi* (Umekita e Mota, 1989). Entretanto as alterações  
26 plaquetárias, seja uma plaquetopenia ou plaquetose na DC é dependente da cepa e  
27 do hospedeiro (Marcondes *et al.*, 2000; Borges C.R.B., *et al.*, 2009; Arantes *et al.*,  
28 2011). Nosso estudo pode contribuir relacionando a concentração do inoculo, bem  
29 como a expressão INOS<sup>-/-</sup>.

30 Quimiocinas aparentam engatilhar a síntese de citocinas pró-inflamatórias,  
31 induzindo a produção de NO por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi in vitro*  
32 (Aliberti *et al.*, 1999; Aliberti *et al.*, 2001). Devido a seu papel de atração de células

1 para o sítio da lesão, são consideradas muito importantes no processo de defesa do  
2 hospedeiro (Deng *et al.*, 2003). Esta produção de elementos quimiotáticos culmina  
3 em infiltrados inflamatórios, que de acordo com (Marinho *et al.*, 1999), o maior  
4 número de parasitos durante a fase aguda da infecção irá refletir em um nível  
5 elevado de infiltrado inflamatório no músculo cardíaco e esquelético durante a fase  
6 aguda. Nossos dados corroboram com estes dados, uma vez que importantes  
7 citocinas inflamatórias se elevaram TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  no grupo selvagem infectado. Já o  
8 grupo INOS-/- houve um déficit da produção destas importantes proteínas  
9 relacionadas ao controle da disseminação parasitaria. Além disso, pudemos  
10 observar um aumento dos ninhos de amastigotas no INOS-/-.

11 O controle da disseminação parasitária e a redução das manifestações do  
12 hospedeiro atribuídas à presença do parasito estão associados com respostas  
13 imune inata e adaptativa direcionadas e eficientes. Vários são os esforços para  
14 modular uma resposta eficiente para eliminação e/ou controle de diversos parasitas.  
15 Nossos dados mostraram para o grupo selvagem um perfil esperado para a proteção  
16 contra o *T. cruzi* em se tratando do comportamento dos níveis de citocinas pró-  
17 inflamatórias das quais favorecem o perfil Th1, com aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$   
18 (Golden e Tarleton, 1991; Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; Moncada e Higgs, 1993).

19 No entanto, o presente estudo permite concluir que os efeitos nocivos da  
20 infecção pelo *T. cruzi* são variáveis de acordo com o inóculo e a via de ativação do  
21 INOS desempenha um papel importante no controle do parasito, mas é afetada  
22 pelos níveis de parasitas infectantes. Também permite apontar para um tropismo de  
23 tecido independente da produção de NO.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

## 1 7.-CONCLUSÃO

2

3 Concluimos que os efeitos nocivos da infecção pelo *T. cruzi* são variáveis de  
4 acordo com o inoculo, e a via de ativação do INOS desempenha um papel  
5 importante no controle do parasita, mas é afetada pelos níveis de parasitas  
6 infectantes. Também permite apontar para um tropismo de tecido independente da  
7 produção de NO.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

## 1 8.-REFERÊNCIAS

2

3 ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro:  
4 Elsevier, 2005.

5 Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for  
6 endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 1996; 209:1297-302.

7 ALIBERTI, J. C. et al.  $\beta$ -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric  
8 oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected  
9 with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 9, p. 4819-4826, 1999.

10 ALIBERTI, J. C. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in  
11 interferon- $\gamma$ -and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi*  
12 infection. *The American journal of pathology*, v. 158, n. 4, p. 1433-1440, 2001.

13 ANDERSEN, M. L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de  
14 experimentação. Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina.  
15 Universidade Federal de São Paulo, 2004.

16 ANDRADE Z.A.; ROCHA SILVA, H. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*.  
17 *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 521-522, 1995.

18 ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma*  
19 *cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da*  
20 *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.

21 ANDRADE, S.G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in some  
22 types. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v.18, p.140-141, 1976.

23 ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G.; Correlation between isoenzyme  
24 patterns and biological behavior of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy*  
25 *Soc Trop Med Hyg.* v.77, p. 796-799, 1983.

26 ARANGO, H. G. Bioestatística teórica e computacional. In: (Ed.). Bioestatística  
27 teórica e computacional: Guanabara Koogan, 2001.

28 ARANTES, J. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: desferrioxamine decreases mortality and  
29 parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Experimental*  
30 *parasitology*, v. 128, n. 4, p. 401-408, 2011.

31 BARR, S.; GOSSETT, K.; KLEI, T. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic  
32 observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma*  
33 *cruzi* isolates. *American journal of veterinary research*, v. 52, n. 6, p. 954-960, 1991.

34 BATISTA, J. S. et al. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos.  
35 *Pesq. Vet. Bras*, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2006.

36 BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States.  
37 *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

38 BILATE, A.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of  
39 an old disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 50, n. 2, p.  
40 67-74, 2008.



- 1 BORGES, C. L. *et al.* 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden  
2 and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease.  
3 *Immunology Letters*, v. 123, n. 1, p. 38-45, 2009.
- 4 BORGES, C. R. B. *et al.* Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões  
5 cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista*  
6 *da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, p. 170-174, 2009.
- 7 BRENER Z.; CHIARI E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras  
8 de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v. 5, n.  
9 5, p. 220-224, 1963.
- 10 BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop*  
11 *Med Parasitol.* v.59, p. 19-26, 1965.
- 12 BRENER, Z. Patologia experimental da doença de Chagas. In: BRENER, Z.,  
13 ANDRADE Z., BARRAL-NETTO, M., *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2. ed.  
14 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 177-197, 2000.
- 15 BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally  
16 infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 4, n. 11-12, p.  
17 389-396, 1962.
- 18 CAMPOS, R.F.; GONÇALVES, M.S.; DOS REIS E.A.G.; DOS REIS, M.G.  
19 Comparative analysis by PCR amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable  
20 strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe – Bahia, its clones and subclones:  
21 Possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.  
22 v.94, p.23-29, 1999.
- 23 CANÇADO J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with  
24 benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, n. 1, p.  
25 29-37, 2002.
- 26 CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma  
27 interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and immunity*, v. 64, n. 1, p.  
28 128-134, 1996.
- 29 CARVALHO, C. M. E. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric  
30 oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys: association with  
31 heart injury. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 5, p. e1644, 2012.
- 32 CERQUEIRA N, FREIRE E YOSHIDA W, BONETTI. ÓXIDO NÍTRICO. REVISÃO.  
33 *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 17 (6) 2002 – 417.*
- 34 CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo  
35 evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade  
36 morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 2, p. 159-218,  
37 1909.
- 38 CHANDRASEKAR, B. *et al.* Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and  
39 inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *The*  
40 *American journal of pathology*, v. 152, n. 4, p. 925, 1998.

- 1 COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what  
2 should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*  
3 *Tropical*, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.
- 4 COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. Ecoepidemiology, short history and  
5 control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-  
6 endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 856-862,  
7 2014.
- 8 CUNHA-NETO, E. *et al.* Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular.  
9 *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v. 5, p. 217-229,  
10 1995.
- 11 DE ARAÚJO-JORGE, T. C.; DE CASTRO, S. L. Doença de Chagas: Manual para  
12 experimentação animal. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2000.
- 13 DE OLIVEIRA, G. M. *et al.* Induction of proinflammatory cytokines and nitric oxide by  
14 *Trypanosoma cruzi* in renal cells. *Parasitology research*, v. 109, n. 2, p. 483-491,  
15 2011.
- 16 DE REZENDE, J.; MONTALVÃO, F.; CENTENO, A. Effects of food temperature on  
17 the esophageal motility in Chagas' megaesophagus. Manometric study. *Arquivos de*  
18 *gastroenterologia*, v. 18, n. 1, p. 8-13, 1980. ISSN 0004-2803.
- 19 DE SOUZA, A. I. *et al.* Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por  
20 *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciencia rural*, v. 38, n. 5, p.  
21 1351-1356, 2008.
- 22 DENG, C. *et al.* IL-1 receptor-associated kinase 1 regulates susceptibility to organ-  
23 specific autoimmunity. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 6, p. 2833-2842, 2003.
- 24 DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015.  
25 *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. ESP, p. 7-86, 2016.
- 26 FRANCO, M. Centro de desenvolvimento de modelos experimentais:  
27 CEDEME/COBEA da Universidade de São Paulo 2005.
- 28 GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on  
29 macrophage trypanocidal activity. *Experimental parasitology*, v. 72, n. 4, p. 391-402,  
30 1991.
- 31 GOLDEN, J.M.; TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on  
32 macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol.* v.72, p.391–402, 1991.
- 33 HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview  
34 and a report card. *Microbes and Infection*, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.
- 35 KELLY, J. M. *Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Chagas' Disease*. Springer  
36 Science & Business Media, 2003.
- 37 KUNKEL, E.J.; BUTCHER, E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of  
38 lymphocytes. *Immunity*, v.16, p.1-4, 2002.
- 39 LAURIA-PIRES, L.; TEIXEIRA, A.R.L. Virulence and pathogenicity associated with  
40 diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease  
41 patients. *Am J Trop Med Hyg.*v.55, p.304-310, 1996a.

- 1 LEMOS, J. R. D. *et al.* Influence of Parasite Load on Renal Function in Mice Acutely  
2 Infected with *Trypanosoma cruzi*. PloS one, v. 8, n. 8, p. e71772, 2013.
- 3 LUJAN, H.; BRONIA, D. Intermembrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi*-  
4 induced erythrocyte membrane destabilization. Parasitology, v. 108, n. 03, p. 323-  
5 334, 1994.
- 6 MACEDO AM, PENA SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for  
7 the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today*. v.14, p.119-123, 1998.
- 8 MACEDO, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and  
9 relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Memorias do  
10 Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2004.
- 11 MACHADO FS, MARTINS GA, ALIBERTI JC, *et al.* *Trypanosoma cruzi*-infected  
12 cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-  
13 dependent trypanocidal activity. Circulation, 102(24): 3003-8, 2000.
- 14 MALVEZI, A. D. *et al.* Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  in the oxidative  
15 stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. FEMS  
16 Immunology & Medical Microbiology, v. 41, n. 1, p. 69-77, 2004.
- 17 MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. Anais  
18 da Academia Brasileira de Ciências, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.
- 19 MARCONDES, M. C. *et al.* Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with  
20 anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by  
21 nifurtimox treatment. Microbes and infection, v. 2, n. 4, p. 347-352, 2000.
- 22 MARINHO, C. R. *et al.* Influence of acute-phase parasite load on pathology,  
23 parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas'  
24 disease. Infection and immunity, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.
- 25 MARTINS, G. A. *et al.* Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of  
26 *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunology letters, v. 63, n. 2, p. 113-120,  
27 1998.
- 28 MEZADRI, T. J. TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. Animais de laboratório: cuidados  
29 na iniciação experimental. Editora da UFSC, 2004.
- 30 MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters  
31 of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans Roy Soc*  
32 *Trop Med Hyg*. v.74, p.221-237, 1980.
- 33 MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: pathophysiology, and  
34 pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.
- 35 MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England Journal*  
36 *of Medicine*, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.
- 37 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.; FRESNO, M. Synergism between  
38 tumour necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\gamma$  on macrophage activation against  
39 intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxidedependent mechanism. *Eur J*  
40 *Immunol*. v.22, p.301-307, 1992.
- 41 MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of  
42 human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- $\alpha$  and

- 1 IFN- $\gamma$  through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology letters*, v. 33, n. 1,  
2 p. 35-40, 1992.
- 3 NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai  
4 palm fruit, Brazil. *Headache*, v. 10, p. 91, 2009.
- 5 OLIVEIRA, G. L.; MENDIBURU, C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação do  
6 perfil hematológico de portadores de talassemia alfa provenientes das regiões  
7 Sudeste e Nordeste do Brasil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v.  
8 28, n. 2, p. 105-109, 2006.
- 9 PAVANELLI W, R. Cytokines and nitric oxide in Chagas Disease. *Biosaúde*,  
10 Londrina, v. 10, n. 2, p. 147-146, jul./dez. 2008.
- 11 PRATA, A. Classificação da infecção chagásica no homem. *Revista da Sociedade*  
12 *Brasileira de Medicina Tropical*, v. 23, n. 2, p. 109-113, 1990.
- 13 REED, S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN-g induces macrophage  
14 activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in  
15 experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* v.140, p.4342–4347, 1988.
- 16 REVELLI, S.; DAVILA, H.; FERRO, M.E.; *et al.* Experimental *Trypanosoma cruzi*  
17 infection in the rat. Response to systemic treatment with recombinant rat interferon  
18 gamma. *Microbiol Immunol.* v.39, p.275–282, 1995.
- 19 ROTTENBERG, M. E. *et al.* Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and  
20 inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction.  
21 *European journal of immunology*, v. 26, n. 12, p. 3203-3213, 1996.
- 22 SANTOS LIMA, E.C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M.H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P.  
23 Evidence for a protective role of tumour necrosis factor in the acute phase of  
24 *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* v.65, p.457–465, 1997.
- 25 SILVA JS, MORRISSEY PJ, GRABSTEIN KH, MOHLER KM, ANDERSON D, REED  
26 SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma*  
27 *cruzi* infection. *J Exp Med*, 175(1): 169-74, 1992.
- 28 SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, .FG. Tumour  
29 necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by  
30 inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages.  
31 *Infect Immun.* v.63, p.4862–4867, 1995.
- 32 SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy, diagnosis and prognosis of  
33 chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo*  
34 *Cruz*, v. 104, p. 167-180, 2009.
- 35 STEVENS, A. The haematoxylin. Theory and practice of histological techniques.  
36 Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 111-3, 1990.
- 37 TAFURI, W. L. Patogenia da doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina*  
38 *Tropical de São Paulo*, v. 29, n. 4, p. 194-199, 1987.
- 39 TAFURI, W.L.; MARIA, T.A.; LOPES, E.R. Lesões do plexo mientérico do esôfago,  
40 do jejuno e do colo de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. *Rev.*  
41 *Inst. Med. Trop. São Paulo.* v.13, p.76, 1971.

- 1 TATAKIHARA, V. L. H. *et al.* Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden,  
2 anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. FEMS  
3 Immunology & Medical Microbiology, v. 52, n. 1, p. 47-58, 2008.
- 4 TIBAYRENE, M.; AYALA, F. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi* the agent of  
5 Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evaluation*.  
6 v.42, p.277-292, 1988.
- 7 Uchôa *et al.*, 2002
- 8 UMEKITA, L.; MOTA, I. Role of platelets in the in vivo removal of *T. cruzi* from  
9 circulation. Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de  
10 pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica. v. 23, n. 6-7, p.  
11 593-596, 1989.
- 12 VAZQUEZ, B. P. *et al.* Inflammatory responses and intestinal injury development  
13 during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load.  
14 Parasites & vectors, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- 15 WHO (World Health Organization). Chagas disease. Interruption of transmission.  
16 *Wekly Epidemiol Rec.* v.72, p.1-5, 1997.
- 17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37