



Renata Leme Goto

*Efeito da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias na  
infecção experimental em camundongos Balb/c infectados  
com Trypanosoma cruzi*

Orientador: Professor Doutor Adjunto Paulo Câmara Marques Pereira

Botucatu – SP

2012

Renata Leme Goto

Efeito da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias na infecção experimental  
em camundongos Balb/c infectados com *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Professor Doutor Adjunto Paulo Câmara Marques Pereira

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Doenças  
Tropicais da Faculdade de Medicina,  
Unesp – Universidade Estadual Paulista,  
para obtenção de Título de Mestre.

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Goto, Renata Leme.

Efeito da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias na infecção experimental em camundongos Balb/c infectados pelo *Trypanosoma cruzi* / Renata Leme Goto. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Câmara Marques Pereira

Capes: 40101096

1. Desnutrição. 2. Sistema imune. 3. Citocinas. 4. Tripanossomo.

Palavras-chave: Citocinas pró-inflamatórias; Desnutrição; Sistema imune; *Trypanosoma cruzi*.

*Epígrafe*

*"Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

# *Agradecimentos*

A **Deus**, em primeiro lugar, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida, por iluminar meu caminho e me dar força para seguir em frente.

Aos meus pais, **Carlos Kiyoshi Goto e Rosângela Leme Goto**, com carinho e gratidão, por me darem vida e acreditarem em mim, pela dedicação e paciência, pelo apoio em todas as minhas escolhas. Vocês são o meu porto seguro. Muito obrigada!

A minha irmã, **Patrícia Leme Goto**, pela ajuda e apoio em todos os momentos, pelos conselhos dados nas horas mais difíceis, pelo carinho e compreensão.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira**, pela oportunidade e por confiar a mim esse trabalho, pela dedicação, paciência e pelo ensinamento ao longo da minha jornada. Muito Obrigada!

A minha co-orientadora, **Prof. Dra. Sueli Aparecida Calvi**, pelo apoio e ensinamento.

Ao pessoal do Laboratório de Doenças Tropicais, **Carlinhos, Larissa, Mariana, Fernanda e Francilene**, pela ajuda e dedicação durante a realização do meu experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina, **Marta e Florian**, pela ajuda durante meu trabalho e pelos momentos de descontração.

A **Prof. Dra. Noeme Sousa Rocha e ao Fabrizio Grandi**, pela grande ajuda na finalização de meu trabalho.

A minha amiga, **Lidiane Nunes Barbosa**, uma irmã que ganhei em Botucatu, que sempre esteve ao meu lado.

Aos **meus amigos**, que de alguma forma, contribuíram para a realização do meu trabalho e sempre estiveram ao meu lado.

*Renata Leme Goto*

Ao pessoal da secretária do departamento, **Michele e Solange**, que ao longo desses anos tive o prazer de criar laços de amizade e carinho.

Ao pessoal da Enfermaria de Doenças Tropicais, agradeço pelos anos de companheirismo e pelos momentos de descontração, Muito Obrigada!

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença infecciosa crônica negligenciada. Apresenta grande incidência no Brasil e, nos últimos anos, passou a ser uma endemia de centros urbanos. É acompanhada por alterações no sistema imune com variações nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias. O tratamento disponível no Brasil é o benzonidazol, com baixa eficácia na fase crônica e efeitos colaterais importantes. Não há estudos que relacionem o tratamento, a resposta imune e a desnutrição na doença de Chagas. Sabe-se que a desnutrição é um fator de imunossupressão e que poderia interferir na evolução das doenças infecciosas e parasitárias. Portanto, o objetivo foi avaliar a desnutrição associada com o tratamento anti-parasitário e com as citocinas pró-inflamatórias, em camundongos Balb/c infectados. Foram utilizados 90 animais, divididos em seis grupos: G1-controle, G2-infectado com dieta normal, G3-infectado com dieta normal e tratado, G4-controle desnutrido, G5-desnutrido e infectado e G6 desnutrido, infectado e tratado. Foram avaliados em cinco momentos: M1-1º dia, M2-3º dia, M3-5º dia, M4-7º dia e M5-9º dia. Para infecção foi utilizada a cepa aguda Y, com pico de parasitemia no sétimo dia (M4). Realizou-se a eutanásia de três animais de cada grupo, em cada momento. Para determinação das citocinas foi utilizado o ELISA e, para análise histopatológica, amostras do coração, intestino e fígado. O medicamento foi dado na dosagem de 100 mg/kg/dia. A análise estatística foi realizada pelo Grupo de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu. Observou-se que nos animais desnutridos houve redução significativa do peso no M4, mostrando que a desnutrição agravou a infecção. O coração foi o órgão que apresentou maior diminuição do seu peso, tanto nos animais com dieta normal quanto nos desnutridos no M4. Em relação às citocinas, houve aumento progressivo significativo nos seus níveis séricos em todos os grupos, exceto nos controle G1, fato mais evidente nos grupos G2 e o G5 (não tratados), revelando que o tratamento interferiu positivamente na resposta inflamatória. O grupo controle desnutrido (G4) também mostrou elevações significativas nessa citocina, destacando o papel da desnutrição na resposta imune. As amostras histopatológicas dos órgãos revelaram a presença de infiltrado inflamatório após o 5º dia (M3) nos grupos G2, G3,

G5 e G6. A desnutrição foi fator importante na resposta inflamatória, agravando o processo infeccioso e após o tratamento, observou-se melhora na resposta imune.

Palavras chave: desnutrição, citocinas pró-inflamatórias, sistema imune, *Trypanosoma cruzi*

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected infectious chronic disease. It is highly incident in Brazil and, in the last few years, it has become endemic in certain urban centers. It is accompanied by alterations in the immune system with variations in the serum levels of pro-inflammatory cytokines. The treatment available in Brazil is benznidazole with low efficacy in the chronic phase and important side effects. No studies have related treatment, immune response and malnutrition in Chagas disease. It is known that malnutrition is an immunodepression factor and that it could interfere with the development of infectious and parasitic diseases. Therefore, this study aimed at evaluating malnutrition associated with anti-parasitical treatment and pro-inflammatory cytokines in infected Balb/c mice. Ninety animals were used, and they were divided into six groups: G1-control, G2-infected mice with a normal diet, G3-infected mice with a normal diet and treated, G4-malnourished control, G5-malnourished and infected and G6-Malnourished, infected and treated. The animals were evaluated at five moments: M1-1<sup>st</sup> day, M2-3<sup>rd</sup> day, M3-5<sup>th</sup> day, M4-7<sup>th</sup> day and M5-9<sup>th</sup> day. The acute Y strain, with a parasitemia peak on the seventh day (M4), was used for infection. Three animals from each group were euthanized at each moment. ELISA was used for cytokine determination, and heart and liver samples were used for histological analysis. The drug was used at a dosage of 100 mg/kg/day. Statistical analysis was performed by the Research Support Group of the Botucatu School of Medicine. Significant weight loss at M4 was observed in malnourished animals, thus showing that malnutrition aggravated infection. The heart was the organ that showed the largest weight reduction, both in animals under a normal diet and in malnourished mice at M4. Significant increase was observed in cytokine serum levels in all groups, except in control G1, a fact that was more evident in groups G2 and G5 (untreated), thus showing that treatment interfered positively with the inflammatory response. The malnourished control group (G4) also showed significant increase in this cytokine, which emphasized the role played by malnutrition in the immune response. The histopathological samples of the organs showed the presence of inflammatory infiltrate after the 5<sup>th</sup> day (M3) in groups G2,

G3, G5 and G6. Malnutrition was an important factor in the inflammatory response, aggravating the infectious process, and after treatment, improved immune response was observed.

Keywords: malnutrition, immune system, pro-inflammatory cytokines, *Trypanosoma cruzi*.

# *Sumário*

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                    | i  |
| LISTA DE TABELAS .....                                                    | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                               | v  |
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                         | 1  |
| 1.1 Doença de Chagas, Desnutrição e Imunidade .....                       | 5  |
| 2 OBJETIVOS .....                                                         | 12 |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                  | 12 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                           | 12 |
| 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS .....                                              | 13 |
| 3.1 Casuística.....                                                       | 13 |
| 3.1.1 Animal e Ambiente de Experimentação .....                           | 13 |
| 3.2 Métodos.....                                                          | 13 |
| 3.2.1 Grupos de Estudo.....                                               | 13 |
| 3.2.2 Delineamento do estudo.....                                         | 16 |
| 3.2.3 Cepa de T. cruzi.....                                               | 17 |
| 3.2.4 Infecção dos camundongos por T.cruzi .....                          | 17 |
| 3.2.5 Dieta oferecida .....                                               | 17 |
| 3.2.6 Peso dos Animais .....                                              | 18 |
| 3.2.7 Obtenção do material de estudo.....                                 | 19 |
| 3.2.8 Coleta dos órgãos e histologia .....                                | 20 |
| 3.2.9 Determinação dos níveis séricos de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 ..... | 20 |
| 3.3 Análise Estatística .....                                             | 21 |
| 4 RESULTADOS .....                                                        | 22 |
| 4.1 Avaliação nutricional.....                                            | 22 |

|       |                                                                                                                                                                                  |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1 | Variação quanto ao peso corporal .....                                                                                                                                           | 22 |
| 4.1.2 | Variação quanto ao peso do coração .....                                                                                                                                         | 23 |
| 4.1.3 | Variação quanto ao peso do intestino.....                                                                                                                                        | 25 |
| 4.1.4 | Variação quanto ao peso do fígado .....                                                                                                                                          | 26 |
| 4.2   | Avaliação das citocinas .....                                                                                                                                                    | 27 |
| 4.2.1 | Variação quanto a citocina IL-1 .....                                                                                                                                            | 27 |
| 4.2.2 | Variação quanto a citocina IL-6 .....                                                                                                                                            | 29 |
| 4.2.3 | Variação quanto a citocina TNF- $\alpha$ .....                                                                                                                                   | 31 |
| 4.3   | Avaliação histopatológica .....                                                                                                                                                  | 32 |
| 4.3.1 | Coração.....                                                                                                                                                                     | 32 |
| 4.3.2 | Intestino.....                                                                                                                                                                   | 34 |
| 4.3.3 | Fígado .....                                                                                                                                                                     | 36 |
| 5     | DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                   | 38 |
| 6     | CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                                  | 46 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                 | 48 |
| 8     | ANEXOS.....                                                                                                                                                                      | 59 |
| 8.1   | Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso corporal de camundongos balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos .....                 | 59 |
| 8.2   | Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do coração, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos .....   | 60 |
| 8.3   | Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do intestino, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos ..... | 61 |
| 8.4   | Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do fígado, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis                                      |    |

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| grupos de estudo e momentos .....                                                                                                                                                                 | 62 |
| 8.5 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Interleucina – 1 (IL-1), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos .....                   | 63 |
| 8.6 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Interleucina – 6 (IL-6), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos .....                   | 64 |
| 8.7 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos ..... | 65 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Nature.....                                                                                                                                                                                                                             | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fonte: Nature.....                                                                                                                                                                                                                             | 3  |
| <b>Figura 3.</b> Importância das citocinas pró-inflamatórias no estado nutricional..                                                                                                                                                                                                                        | 10 |
| <b>Figura 4.</b> Camundongos Balb/c: caixas de acondicionamento e marcação ...                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Fluxograma do experimento.....                                                                                                                                                                                                                                                             | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Inoculação intraperitoneal. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 17 |
| <b>Figura 7.</b> Pesagem dos camundongos Balb/c.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 19 |
| <b>Figura 8.</b> Coleta de órgãos (coração, intestino e fígado).....                                                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| <b>Figura 9.</b> Distribuição das médias dos valores de peso corporal (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal+ <i>T.cruzi</i> (NCh), G3=normal + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (NChBZ), $p<0,05$ .....                      | 22 |
| <b>Figura 10.</b> Distribuição das médias dos valores de peso corporal (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+ <i>T.cruzi</i> (DCh), G6=desnutrido + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (DChBZ), $p<0,05$ . ....   | 23 |
| <b>Figura 11.</b> Distribuição das médias dos valores do peso do coração (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + <i>T.cruzi</i> (NCh), G3=normal + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (NChBZ), $p<0,05$ .....                  | 24 |
| <b>Figura 12.</b> Distribuição das médias dos valores do peso do coração (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido + <i>T.cruzi</i> (DCh), G6=desnutrido + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (DChBZ), $p<0,05$ ..... | 24 |
| <b>Figura 13.</b> Distribuição das médias dos valores do peso do intestino (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + <i>T.cruzi</i> (NCh), G3=normal + <i>T.cruzi</i> +                                                     |    |

Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ ..... 25

**Figura 14.** Distribuição das médias dos valores do peso do intestino (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ ..... 26

**Figura 15.** Distribuição das médias dos valores do peso do fígado (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ ..... 26

**Figura 16.** Distribuição das médias dos valores do peso do fígado (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ . .... 27

**Figura 17.** Distribuição das médias dos valores de IL-1, de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ . .... 28

**Figura 18.** Distribuição das médias dos valores de IL-1, de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ ..... 29

**Figura 19.** Distribuição das médias dos valores de IL-6, de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal+ *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ . .... 30

**Figura 20.** Distribuição das médias dos valores de IL-6, de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ ..... 30

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 21.</b> Distribuição das médias dos valores de TNF- $\alpha$ , de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + <i>T.cruzi</i> (NCh), G3=normal + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (NChBZ), $p<0,05$ . ....                  | 31 |
| <b>Figura 22.</b> Distribuição das médias dos valores de TNF- $\alpha$ , de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido + <i>T.cruzi</i> (DCh), G6=desnutrido + <i>T.cruzi</i> + Benzonidazol (DChBZ), $p<0,05$ . .... | 32 |
| <b>Figura 23.</b> Corte histológico de coração – tecido sadio. Grupos G1 e G4. ....                                                                                                                                                                                                                 | 32 |
| <b>Figura 24.</b> Grupos G2 e G6 – Corte histológico de coração (ápice). Pseudocisto com protozoários (seta). H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                       | 33 |
| <b>Figura 25.</b> Grupo G5 – Corte histológico de coração (ápice). Epicardite e miocardite supurativa e histiocítica. H&E, 400x. ....                                                                                                                                                               | 33 |
| <b>Figura 26.</b> Grupo G3 – Corte histológico de coração (ápice). Epicardite e miocardite necrosupurativa (setas). H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 27.</b> G1 e G4 – Corte histológico de intestino – tecido sadio. H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                                                          | 34 |
| <b>Figura 28.</b> Grupos G2 e G3. Corte histológico de intestino (cólon). Hiperplasia do nódulo linfoglandular. H&E, 200x. ....                                                                                                                                                                     | 35 |
| <b>Figura 29.</b> Grupos G5 e G6 – Corte histológico de intestino (cólon). Edema de lâmina própria-submucosa (seta). H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                | 35 |
| <b>Figura 30.</b> Grupos G1 e G4. Corte histológico do Fígado – tecido sadio. H&E. ....                                                                                                                                                                                                             | 36 |
| <b>Figura 31.</b> Grupos G2 e G3 – Corte histológico do fígado. Hepatite aguda com necrose hepatocelular. H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                           | 36 |
| <b>Figura 32.</b> Grupos G5 e G6 – Corte histológico do fígado. Hepatite aguda com necrose hepatocelular. H&E, 400x. ....                                                                                                                                                                           | 37 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Descrição das condições dos grupos em estudo, compostos por 15 camundongos cada ..... | 14 |
| <b>Tabela 2.</b> Caracterização dos momentos do estudo .....                                           | 14 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                |                               |
|--------------------------------|-------------------------------|
| <b><i>ad libitum</i></b>       | À vontade                     |
| <b>IL-1</b>                    | Interleucina-1                |
| <b>IL-2</b>                    | Interleucina-2                |
| <b>IL-6</b>                    | Interleucina-6                |
| <b>IL-8</b>                    | Interleucina-8                |
| <b>Kg</b>                      | Quilogramas                   |
| <b>mcg</b>                     | Microgramas                   |
| <b>mg</b>                      | Miligramas                    |
| <b>mL</b>                      | Mililitros                    |
| <b>rpm</b>                     | Rotações por minuto           |
| <b><i>T.cruzi</i></b>          | <i>Trypanosoma cruzi</i>      |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral alfa |
| <b>UI</b>                      | Unidade internacional         |

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*), foi descoberta em abril de 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, responsável pela identificação do agente etiológico e, posteriormente, pela determinação das manifestações clínicas, epidemiológicas, do ciclo de vida dos vetores, dos reservatórios silvestres e dos hospedeiros humanos <sup>[1,2]</sup>.

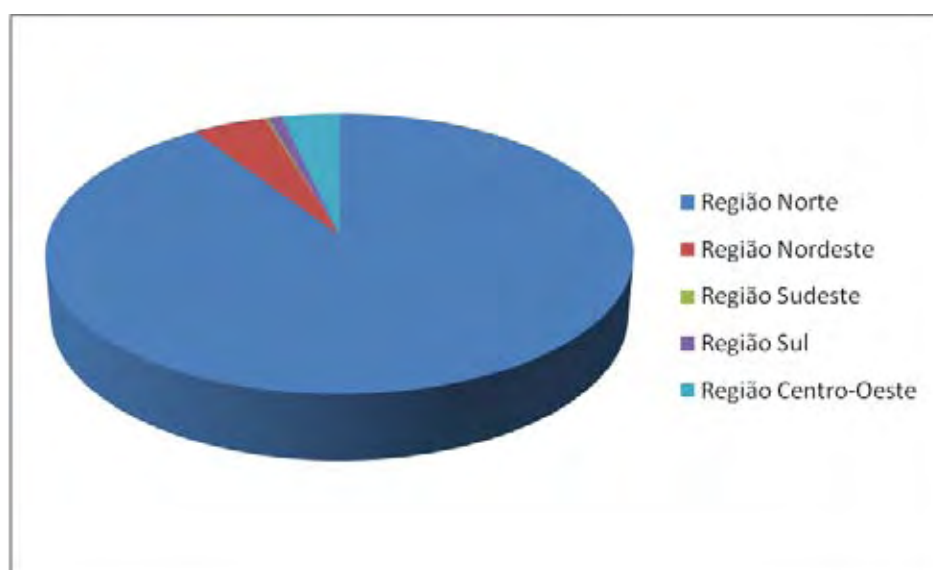
A infecção chagásica segue como problema de saúde pública e afeta aproximadamente 17 milhões de pessoas na América Latina (países do Cone Sul). Sua distribuição cobre a América do Sul, incluindo Chile e Argentina até o sul dos Estados Unidos, por onde existam vetores adequados ao parasito, e apresenta mortalidade de mais de 15 mil pessoas/ano <sup>[1-3]</sup>.

Muitos destes países possuem programas de controle dos vetores bem estabelecidos, porém, o contato com a urina ou fezes de triatomíneos contaminados ainda é a principal causa de infecção. Além disso, as áreas endêmicas, em que a transmissão do parasito ainda não é controlada, representam uma constante ameaça para as áreas vizinhas, o que significa que pelo menos 120 milhões de pessoas apresentam risco de infecção. A Organização Mundial da Saúde estima que surgem 300 mil novos casos/ano da doença de Chagas devido à ausência de triagem sanguínea para *T.cruzi* nos bancos de sangue de áreas não endêmicas e ao grande número de imigrantes sul americanos que desconhecem sua infecção, ocasionando a transmissão transfusional em países onde a doença era ausente, como os Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália <sup>[2, 4-8]</sup>.

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com cerca de 03 milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada em diferentes estados como Maranhão, Pernambuco, Piauí, Paraná, Minas Gerais, com maior frequência de casos e

surtos registrados em alguns estados da Região da Amazônia Legal como Amazonas, Maranhão, Goiás, Amapá, Pará e Tocantins <sup>[9]</sup>.

De 2007 a 2010, o Ministério da Saúde notificou em torno de 690 casos de doença de Chagas aguda, sendo as regiões de maior ocorrência apresentados na Figura 1 <sup>[9]</sup>. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu conta com um ambulatório especializado que atende em torno de 500 pacientes chagásicos e, segundo levantamento recente realizado no hemocentro do hospital, há 60 casos novos/ano da doença <sup>[10]</sup>.

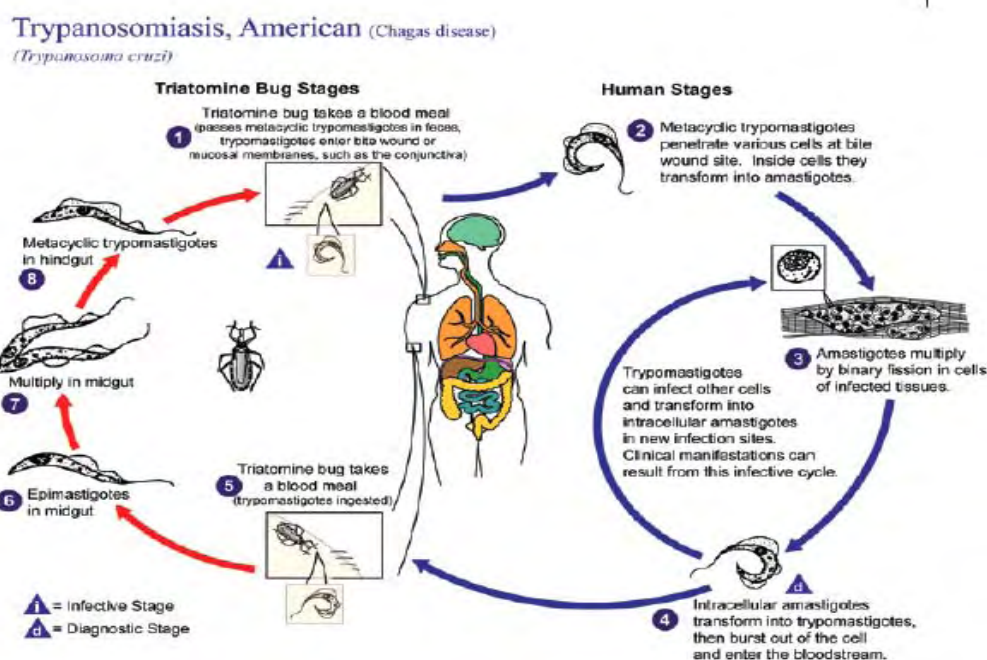


**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Nature.

A transmissão natural ou primária é a vetorial, que ocorre através do contato com as fezes de triatomíneos, insetos hematófagos da família *Reduviidae*, vulgarmente conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”, seu ciclo evolutivo é mostrado na Figura 2 <sup>[5,11]</sup>. Essa transmissão está relacionada a fatores ambientais e sócio-políticos, como produtividade, migrações, tipo de vivenda, educação e ação antrópica sobre a natureza. Outros mecanismos de transmissão descritos, secundários ou alternativos, são: o transfusional (que ganhou grande importância epidemiológica nas duas últimas décadas como citado anteriormente), o transplacentário (congenito), por transplante de órgãos e tecidos de pacientes

infectados, acidente de laboratório e aleitamento materno, sendo os dois últimos de pouca significância epidemiológica [11-14].

A transmissão por via oral já esta bem estabelecida, em decorrência de alguns surtos episódicos. Recentemente, foram relatados casos no Paraná (Brasil) e em Caracas (Venezuela) da forma aguda, decorrentes da ingestão de caldo de cana e suco de goiaba, respectivamente, contaminados com fezes de barbeiros. O fruto da palmeira de açaí, presente na Floresta Amazônica, é outra fonte comum de contaminação [2,11,15].



**Figura 2.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Nature.

A doença apresenta duas fases clínicas, caracterizada por fase inicial aguda, com sinais e sintomas quase sempre inespecíficos, quando presentes; e pode evoluir para fase crônica, com comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica), digestivo (megaesôfago e megacólon) ou indeterminado. Outras manifestações clínicas são bastante raras, como a meningoencefalite chagásica [11,16,17].

A fase aguda, quando aparente, corresponde aos fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dias ou meses da infecção inicial, sendo diagnosticada pelo encontro do parasito (forma tripomastigota) no sangue periférico. As manifestações gerais são: febre (pouco elevada), mal estar geral, astenia, cefaleia, anorexia, edema, hipertrofia de linfonodos. Frequentemente ocorre hepatoesplenomegalia e podem existir duas portas de entrada aparente, a ocular (sinal de Romaña - edema bipalpebral) ou cutânea (chagoma de inoculação) <sup>[11,17]</sup>. Esta fase tem duração de acerca de 03 a 08 semanas, e o paciente evolui para fase crônica. Esta última se associa a ausência de sintomatologia clínica, sendo definida como forma indeterminada da infecção, caracterizada apenas pela sorologia positiva <sup>[17-19]</sup>. Esta forma tem particular interesse médico-social e trabalhista, pelo fato dos indivíduos chagásicos, que são assintomáticos, estarem em plena faixa produtiva da vida e serem excluídos do mercado de trabalho <sup>[20]</sup>.

A fase crônica é caracterizada por virtual escassez de parasitos no sangue ou nos tecidos e apresenta as seguintes formas clínicas:

(a) Forma indeterminada: mais freqüente, sendo caracterizada por ausência de sintomatologia <sup>[17,21]</sup>;

(b) Forma cardíaca: considerada a mais importante pelo impacto de morbimortalidade, podendo ser sintomática ou não; e também causa grande impacto médico-social, pela perda de produtividade, impedimento ao trabalho e custos com tratamentos e cirurgias <sup>[17,21]</sup>;

(c) Forma digestiva crônica: afeta a deglutição, pode ocasionar regurgitação de alimentos ingeridos (sinais associados ao megaesôfago). Pode ocorrer também, disfagia, epigastralgia, soluços e salivação aumentada, resultado da dificuldade em se alimentar. Cerca de um terço dos indivíduos podem desenvolver dilatação do trato gastrointestinal e distúrbios motores gastrointestinais, como acalasia da cárdia, distúrbios de esvaziamento gástrico, alterações no trânsito

intestinal e alterações motoras do cólon e vesícula biliar, podendo causar deficiências nutricionais <sup>[1,17,21-22]</sup>.

Nos últimos anos, essa endemia passou a se manifestar em centros urbanos devido à progressiva urbanização da população rural e pode ser considerada uma doença emergente em vista da co-infecção com HIV/aids e da sua incidência em imunodeprimidos submetidos a transplantes de órgãos e terapêutica imunodepressora <sup>[16]</sup>. Cabe salientar que ainda não existe uma quimioterapia segura para o tratamento da doença, a única droga disponível e utilizada no Brasil é o benzonidazol, recomendada pela Fundação Nacional da Saúde, com baixa eficácia na fase crônica <sup>[21,23,24]</sup>. Esse medicamento possui ainda efeitos colaterais importantes, particularmente dermatites por hipersensibilidade, polineurite e depressão da medula óssea <sup>[25-29]</sup>.

Portando, a doença de Chagas continua sendo importante problema de saúde pública, muito negligenciada, e com muitos aspectos a serem esclarecidos, dentre eles, a relação entre nutrição, infecção e imunidade.

### **1.1 Doença de Chagas, Desnutrição e Imunidade**

A doença de Chagas é ainda muito negligenciada por falta de interesse governamental em investir em novos tratamentos e porque as pesquisas geralmente não revertem no desenvolvimento e amplificação de acesso a novos medicamentos, testes diagnósticos, vacinas e outras tecnologias para sua prevenção e controle <sup>[30,31]</sup>. Em particular, as indústrias farmacêuticas como são orientadas pelo lucro, não investem em novas pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos, já que o retorno financeiro exigido não seria alcançado no caso de doenças que atingem populações marginalizadas, de baixa renda e pouca influência política, localizadas, majoritariamente, em países em desenvolvimento <sup>[30,32,33]</sup>.

Essas populações marginalizadas, na sua maioria, apresentam hábitos alimentares inadequados, por deficiência na ingestão de alimentos ou de nutrientes, levando ao comprometimento do seu estado nutricional, que pode

influenciar o estado imunológico e infeccioso do indivíduo. O estado nutricional é um dos principais moduladores da resposta imune, sendo, por um lado, importante determinante do risco e do prognóstico de doenças infecciosas e, por outro, diretamente influenciado pela infecção <sup>[34]</sup>.

O comprometimento do estado nutricional pode gerar um quadro conhecido como desnutrição protéico-energética, considerada um grande problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais, e a maior causa de alta prevalência de imunodeficiência adquirida no mundo, seguida pela alta morbidade e mortalidade <sup>[35,36]</sup>. É caracterizada por deficiência proteica, calórica e de vários micronutrientes, como vitamina A, vitamina E, vitamina B6, folato, zinco, ferro, cobre, e selênio <sup>[37,38]</sup>.

Como consequências dessa desnutrição, alterações imunológicas podem ser observadas, incluindo atrofia de tecido linfóide (diminuição do número de células e órgãos linfóides mal desenvolvidos), leucopenia e redução da resposta imune celular e humoral (afetando várias funções como fagocitose, diferenciação de células T, ativação de macrófagos, produção de citocinas, entre outros); sendo caracterizada nutricionalmente, como síndrome de imunodeficiência adquirida <sup>[26,39,40]</sup>.

A desnutrição protéico-energética pode ser observada em indivíduos que possuem ingestão inadequada de alimentos, influenciando na susceptibilidade a infecções por patógenos (bactérias, parasitas e vírus), perda de peso, baixa imunidade, danos à mucosa gastrointestinal, perda de apetite, má-absorção de nutrientes, podendo ocorrer reativação de infecções virais e desenvolvimento de infecções oportunistas <sup>[21,24,38,41,42]</sup>. A deficiência de micronutrientes (vitaminas e minerais) pode ser considerada fator de risco para muitas doenças agudas e crônicas, contribuindo para altas taxas de morbidade e mortalidade <sup>[43]</sup>.

Vários estudos experimentais têm relatado a interação entre a infecção e diversas deficiências nutricionais, tanto de macronutrientes (proteínas, carboidratos e gorduras), como de micronutrientes (eletrólitos, minerais e

vitaminas). De acordo com Fraker e colaboradores, os baixos níveis dietéticos de zinco afetam a resposta imune de animais à infecção pelo *T.cruzi*. Brazão e colaboradores descreveram que a suplementação dietética de zinco está associada com a redução nos níveis sanguíneos de *T.cruzi* durante a fase aguda da infecção em ratos <sup>[44-45]</sup>. Tem sido observado forte associação entre desnutrição proteico-energética/deficiência de micronutrientes e o aumento de infecções, incluindo HIV/Aids, tuberculose, malária, leishmaniose, e talvez, a doença de Chagas <sup>[36,46-55]</sup>.

Além disso, as infecções por protozoários habitualmente só causam doença em uma parcela de indivíduos infectados, indicando que o sistema imune não permite na maioria das vezes, a multiplicação em grande escala dos protozoários e a disseminação da infecção. Sendo assim, esses agentes podem permanecer no hospedeiro por toda a vida sem manifestar a doença, a não ser que esse equilíbrio seja perdido por uma depressão imune ou pelo desencadeamento de uma resposta imunitária exacerbada com inflamação tecidual. Sabe-se que a desnutrição protéica-energética é a principal causa de imunodeficiência adquirida e isso pode ser um fator agravante no desenvolvimento da doença, que acomete uma população mais carente <sup>[56]</sup>.

Estudos experimentais em camundongos demonstraram que a resposta imune Th1, caracterizada pela produção de interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), contribuem para o controle do parasitismo <sup>[57-59]</sup>.

Em relação à participação do sistema imune na infecção chagásica, o pesquisador Keusch relata que o sistema imune estimula mecanismos de defesa inespecíficos (resposta inata) e específicos (resposta adaptativa) do indivíduo na tentativa de eliminar o parasita circulante, que podem ser diretamente influenciados pelo estado nutricional de micronutrientes e de macronutrientes <sup>[60]</sup>. Ambos os processos envolvem ativação de células imunológicas e síntese de um conjunto de moléculas que requerem replicação de DNA, expressão de RNA e síntese/secreção protéica, que são grandes consumidores de energia. Os mediadores de inflamação também contribuem para o aumento da resposta

catabólica <sup>[61,62]</sup>. Na fase aguda desse tipo de infecção pode ocorrer um processo de hipercatabolismo, agravado pela anorexia, o que resulta na perda e, consequentemente, depleção das reservas nutricionais do corpo <sup>[25,60]</sup>. A alta demanda energética, exigida durante a infecção é seguida por alterações de marcadores metabólicos, com o objetivo de preparar o organismo contra o agente agressor <sup>[24]</sup>.

Sabe-se que quase todos os nutrientes da dieta desempenham papel crucial na manutenção de uma resposta imune “ideal”, e sua deficiência afeta negativamente o estado imunológico e a susceptibilidade a uma variedade de patógenos, incluindo o *T.cruzi* <sup>[62,63]</sup>.

Entretanto, o grande problema da infecção não é o parasita em si, mas as consequências da resposta imune desencadeadas por ele no organismo. Com o objetivo de eliminar o patógeno ocorre um processo inflamatório, gerando morte celular e danos teciduais ao hospedeiro <sup>[64]</sup>.

Durante a infecção chagásica há produção de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- $\alpha$ , que são responsáveis por uma série de alterações metabólicas como regulação do ritmo metabólico, da resposta imune e da composição corporal, afetando direta e indiretamente o metabolismo <sup>[24,28,65,66]</sup>. Essa resposta inflamatória da fase aguda é estabelecida nos primeiros dias de infecção, sendo caracterizada por reação não específica do corpo ao agente agressor, que ocorre inicialmente no local, depois, torna-se sistêmica <sup>[26,27]</sup>.

Embora haja um determinado perfil de resposta imune na infecção, esta depende do tipo de parasita e, algumas vezes, também da genética do hospedeiro, podendo a resposta final ser constituída por um balanço entre mecanismos celulares, humorais e secreção de citocinas pró-antiinflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), numa clara evidência de co-evolução <sup>[64]</sup>.

Essas citocinas são mediadoras de uma grande variedade de reações biológicas, algumas essenciais para a resposta metabólica, hemodinâmica,

imunológica e reparadora do organismo ao trauma. A complexa interação entre as citocinas, o sistema neuroendócrino clássico e os vários outros fatores humorais secundários estimula a resposta inflamatória que visa, em última estância, à preservação da vida <sup>[67]</sup>.

A IL-1 influencia de maneira sinérgica em muitos efeitos do TNF- $\alpha$ . O TNF induz à síntese de IL-1 pelas células endoteliais e pelos monócitos. Por sua vez, a IL-1 aumenta muitos os efeitos do TNF- $\alpha$ , por meio de um provável feedback de auto-regulação. Ambas citocinas influenciam importantes funções imunológicas, como estimulação de interleucina-2 (IL-2) e interleucina-8 (IL-8), amplificação da proliferação de timócitos ao estímulo antigênico e aumento da proliferação e da resposta de células B. A IL-1 promove febre, anorexia, sonolência, hipotensão arterial, redução dos níveis de catecolaminas e tiroxina, depressão de diversos sistemas enzimáticos, aumento de fatores estimulantes de colônias e da IL-6, aumento de proteínas de fase aguda, além do extenso extravasamento de líquido intravascular <sup>[67]</sup>.

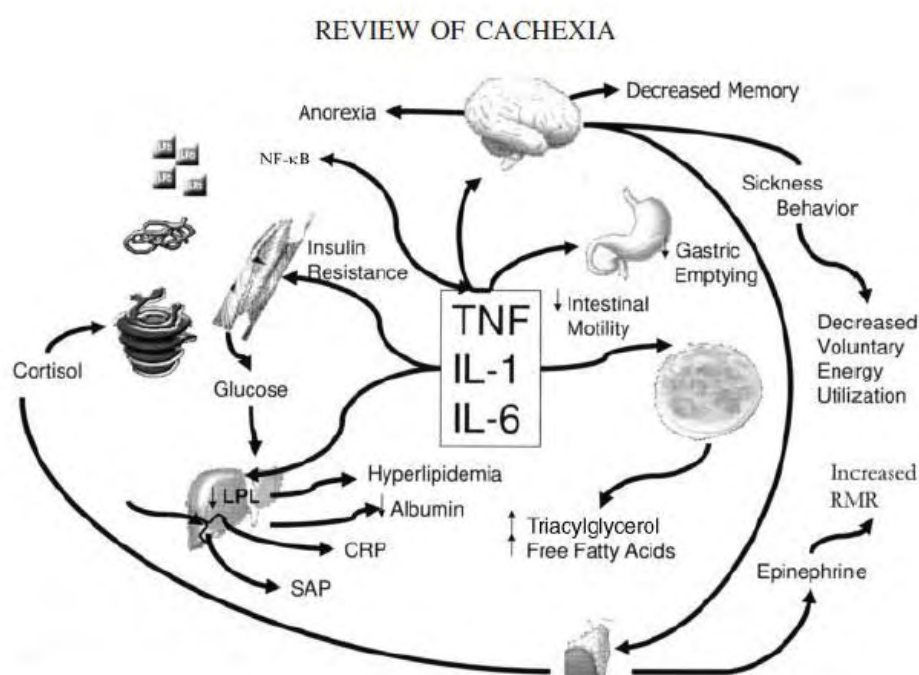
A IL-6, produzida pelos linfócitos, estimula, junto com a IL-2 várias funções dos linfócitos T e B, assim como a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos <sup>[67]</sup>.

O TNF- $\alpha$  que é produzido pelos monócitos e macrófagos inibe a atividade da lipase lipoprotéica, apresentando efeito pirogênico e induzindo a caquexia ou perda de peso severa (“wasting”) <sup>[68]</sup>. Também desencadeia liberação de outras citocinas como IL-1 e IL-2, que mediam um aumento no gasto energético, assim como a mobilização de aminoácidos, atuando no catabolismo protéico muscular <sup>[67]</sup>. Vários estudos em modelos experimentais e em humanos têm relatado o papel de citocinas como o TNF- $\alpha$  na regulação da resposta imunológica na fase aguda da doença de Chagas <sup>[69]</sup>.

A participação dessas citocinas tem sido observada tanto no processo inflamatório agudo quanto crônico <sup>[26]</sup>. Todo esse processo é acompanhado por aumento da demanda energética e baixa ingestão de alimentos, o que pode afetar

o estado nutricional do indivíduo, podendo até evoluir para caquexia; mostrando a importância dessas citocinas pró-inflamatórias na tríade desnutrição-infecção-imunidade (Figura 3) [24].

Existem poucos estudos que relatam a associação da desnutrição com a infecção pelo *T.cruzi*. [70]. Com base nessas considerações, decidimos avaliar a participação das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  no processo infeccioso causado pelo *T.cruzi* e as repercussões nutricionais.



**Figura 3.** Importância das citocinas pró-inflamatórias no estado nutricional. Fonte: Cachexia: pathophysiology and clinical relevance, 2006.

Estudos experimentais realizados em camundongos com infecção chagásica têm sido fundamentais para determinar o papel dessas citocinas e dos vários tipos celulares, mediadores e protetores contra a infecção aguda [3,71].

Por fim, embora já tenha sido observado que as deficiências nutricionais exercem efeito direto na infecção pelo *T.cruzi*, muitos aspectos, como a participação de mecanismos imunológicos envolvidos, ainda estão pouco

explorados, incluindo a associação do efeito da desnutrição, do sistema imune e de mecanismos patológicos dessa infecção.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos da desnutrição e das citocinas pró-inflamatórias em camundongos Balb/c machos na evolução da infecção aguda pelo *T. cruzi* e durante o tratamento com o benzonidazol.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Correlacionar os efeitos da desnutrição com a resposta imune adaptativa mediada por TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 através da realização de dosagem dessas citocinas nos diferentes momentos do estudo.

- Realizar análise histopatológica de órgãos (coração, intestino e fígado) para verificar diferenças entre a desnutrição e estado infeccioso dos camundongos.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

##### **3.1.1 Animal e Ambiente de Experimentação**

O presente estudo foi desenvolvido com 90 camundongos isogênicos Balb/c, machos, com 12 semanas de vida e aproximadamente 30 g de peso corporal, mantidos em temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com alimentação restrita apenas para o grupo de camundongos desnutridos e água *ad libitum*. Os animais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Grupos de Estudo**

Os parâmetros utilizados no estudo foram os seguintes:

- Infecção pelo *T. cruzi*;
- Tratamento com Benzonidazol através do método de gavagem, 100mg/Kg/dia, a partir do primeiro até o quinto dia após infecção;
- Restrição dietética: 75% da dieta normal.

A partir desses parâmetros foram constituídos seis grupos (G1 a G6) e todos foram avaliados em cinco momentos do estudo (Tabela 1).

Os cinco momentos, classificados como: M1, M2, M3, M4 e M5, para coleta das variáveis, foram estipulados a partir do dia de infecção pelo *T. cruzi*: (Tabela 2).

**Tabela 1.** Descrição das condições dos grupos em estudo, compostos por 15 camundongos cada

| Grupo     |       | Características                        |                     |
|-----------|-------|----------------------------------------|---------------------|
|           |       | Estado de saúde                        | Dieta               |
| <b>G1</b> | CN    | não infectados (controle)              | Normal              |
| <b>G2</b> | NCh   | Infectados                             | Normal              |
| <b>G3</b> | NChBZ | infectados e tratados com benzonidazol | Normal              |
| <b>G4</b> | CD    | não infectados (controle)              | restrição dietética |
| <b>G5</b> | DCh   | Infectados                             | restrição dietética |
| <b>G6</b> | DChBZ | infectados e tratados com benzonidazol | restrição dietética |

CN = controle normal; NCh = normal com *T.cruzi*; NChBZ = normal + *T.cruzi* + Benzonidazol; CD = controle desnutrido; DCh = desnutrido com *T.cruzi*; DChBZ = desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol

**Tabela 2.** Caracterização dos momentos do estudo

| MOMENTOS              | TEMPO                                             |
|-----------------------|---------------------------------------------------|
| <b>M1 (momento 1)</b> | 24 horas após infecção pelo <i>T.cruzi</i>        |
| <b>M2 (momento 2)</b> | 3° dia de infecção                                |
| <b>M3 (momento 3)</b> | 5° dia de infecção                                |
| <b>M4 (momento 4)</b> | 7° dia de infecção (pico de virulência da cepa Y) |
| <b>M5 (momento 5)</b> | 9° dia de infecção                                |

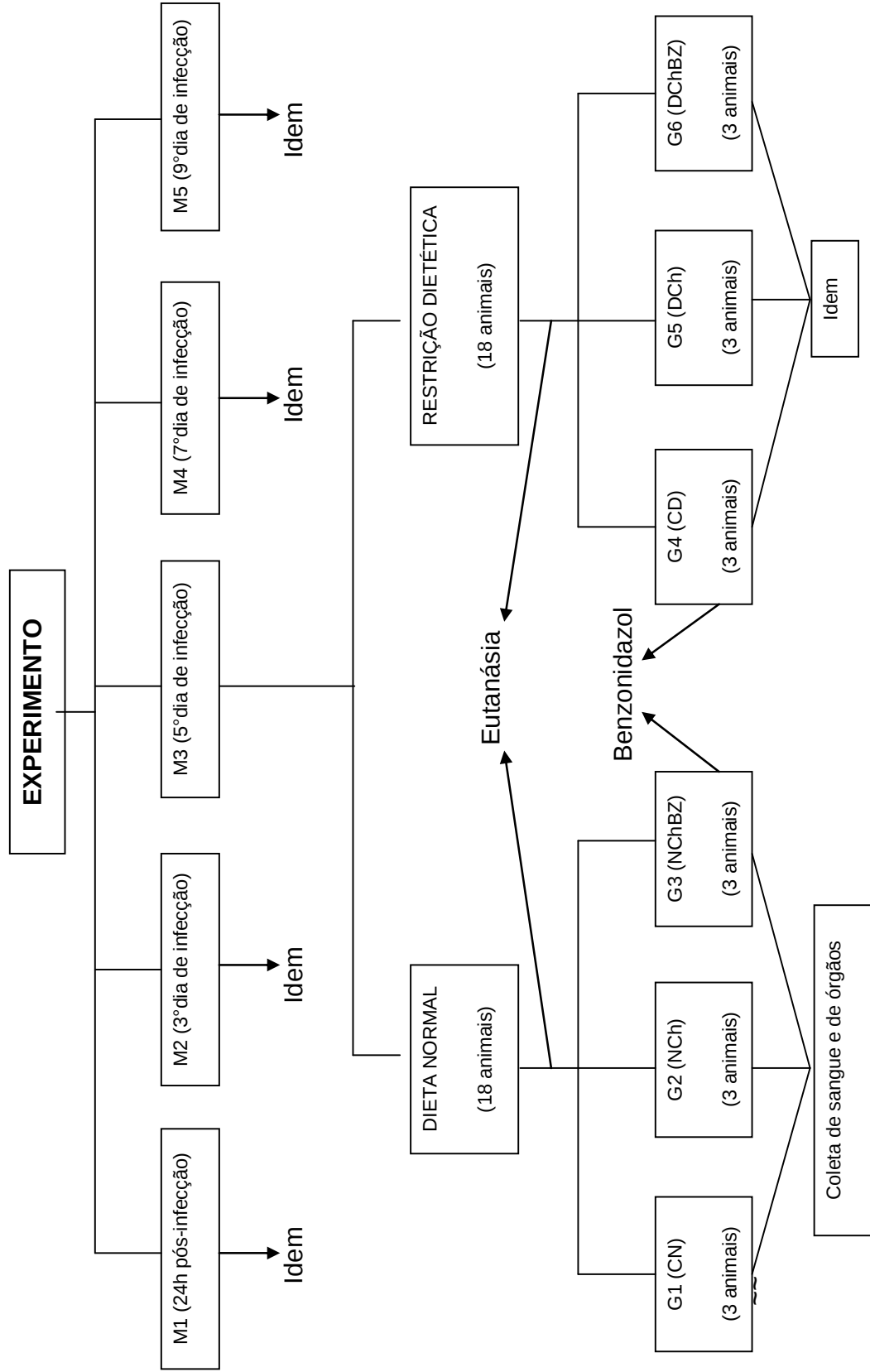
A restrição dietética foi estabelecida para se obter uma perda de peso de 12-15% do peso inicial. Para isso, os camundongos que pertenciam aos grupos dos desnutridos foram submetidos a um período de desnutrição prévia, com duração de aproximadamente 20 dias.

Os 90 camundongos foram distribuídos em caixas, cada uma com capacidade para cinco camundongos (Figura 4).



**Figura 4.** Camundongos Balb/c: caixas de acondicionamento e marcação.

### 3.2.2 Delineamento do estudo



**Figura 5.** Fluxograma do experimento.

### **3.2.3 Cepa de *T. cruzi***

Para realizar a infecção foi utilizada a cepa aguda Y de *T. cruzi*, mantida no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

### **3.2.4 Infecção dos camundongos por *T. cruzi***

Os camundongos machos Balb/c foram infectados com as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A infecção foi feita pela inoculação intraperitoneal de  $10^4$  tripomastigotas/mL de sangue, obtidas por punção cardíaca de animais previamente infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (Figura 5) e mantidas no Laboratório de Pesquisa em Doenças Tropicais. A concentração desejada para a infecção foi feita pela contagem de parasitas em câmara de Neubauer.



**Figura 6.** Inoculação intraperitoneal.

### **3.2.5 Dieta oferecida**

Os animais receberam dieta normal composta por ração específica (RC FOCUS 1765 Camundongos PP) para alimentação de roedores em laboratório.

Essa ração é composta por: óleo de soja degomado, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), milho moído, farelo de soja, farelo de trigo (55,4091%), farinha de carne e ossos, aditivo, antioxidante, premix mineral vitamínico, farinha de peixe. Além desses componentes, possui enriquecimento mineral e vitamínico por Kg de peso, e micronutrientes como: ferro 100mg, cobre 10mg, zinco 60mg, manganês 75 mg, iodo 2 mg, selênio 0,2 mg, cobalto

1,5 mg, magnésio 2 mg, vitamina A 12.600 UI, vitamina D3 2.500 UI, vitamina E 60 UI, vitamina K 10 mg, ácido fólico 3 mg, biotina 0,4 mg, colina 500 mg, niacina 65 mg, ácido pantotênico 25 mg, tiamina 5 mg, vitamina B2 6 mg, piridoxina 8 mg, vitamina B12 30 mcg, metionina 300 g e lisina 100 mg.

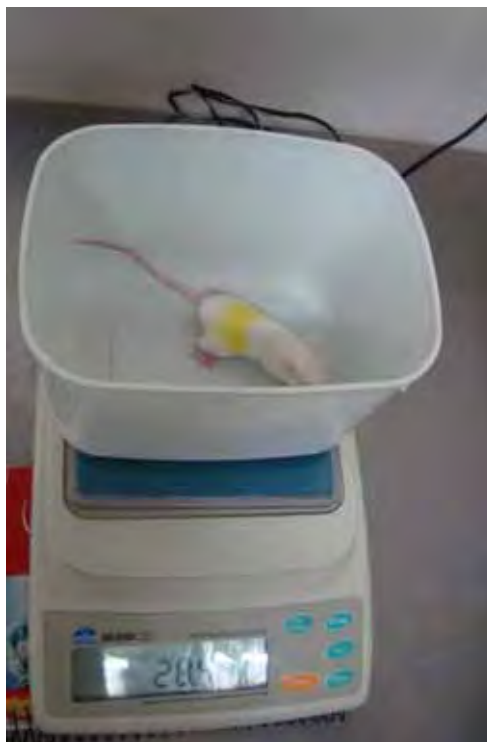
A dieta foi pesada diariamente em balança digital (Spider 2 – Metter Toledo), com precisão de 2-6 g.

Os animais dos grupos G4, G5 e G6 foram submetidos à restrição dietética com oferta diária de 75% da quantidade ingerida pelo grupo normal por 20 dias, antes do início do estudo.

Diariamente verificou-se o consumo do grupo controle normal, pela pesagem da ração, e a partir daí retirou-se 25% do total, que foi então distribuída para os camundongos com restrição dietética. Decorridos 20 dias, iniciou-se o estudo com infecção nesses animais.

### **3.2.6 *Peso dos Animais***

O peso dos animais foi medido em cinco momentos (M1, M1, M3, M4 e M5). Foi feita a eutanásia de 03 animais de cada grupo, em cada momento, considerando os seis grupos de animais (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) (Figura 6).



**Figura 7.** Pesagem dos camundongos Balb/c.

Os cinco momentos determinados também foram fixados para os animais não infectados no primeiro momento, ou primeiro dia ou 24 horas após a infecção.

Depois de sorteados os animais de cada grupo, o peso de cada um foi medido com uso da balança digital acima descrita e registrado semanalmente. No início do experimento, os animais não infectados de ambos os grupos (com e sem restrição dietética) foram pesados, obtendo-se o peso inicial e final.

### **3.2.7 Obtenção do material de estudo**

Os animais foram anestesiados por inoculação intraperitoneal de pentobarbital sódico a 4%, na proporção de 01 mL/Kg de peso. Em seguida, foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue, que foi centrifugado e armazenado a -80°C para posterior análise. Realizou-se eutanásia de 3 animais de cada grupo por dia, somando um total de 15 animais/dia.

Esses animais foram pesados e submetidos à necropsia para retirada do coração, intestino e fígado (Figura 7).



**Figura 8.** Coleta de órgãos (coração, intestino e fígado).

### **3.2.8 Coleta dos órgãos e histologia**

Os órgãos (coração, intestino e fígado) retirados foram pesados em balança digital e conservados em frascos contendo formol tamponado a 10% por 24 horas. Após este período, a solução de formol tamponado 10% foi trocada para acondicionar os órgãos até o momento do processamento.

O preparo das lâminas foi feito pela Histologia da Faculdade de Medicina. O material foi submetido a álcool absoluto por uma hora, repetindo o processo por seis vezes. Na sequência, as amostras foram submersas em mistura de álcool e xilol (1:1), e depois somente em xilol (1 hora). Então as amostras foram colocadas em cubas de parafina para obtenção de cortes histológicos no micrótomo. Posteriormente realizou-se a coloração com hematoxilina-eosina.

As lâminas foram encaminhadas para análise histopatológica no serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – Unesp.

### **3.2.9 Determinação dos níveis séricos de $TNF\alpha$ , IL-1 e IL-6**

Nos dias em que foi feito a eutanásia, foi coletado sangue (por punção cardíaca) de três animais de cada grupo para determinação das citocinas. Em seguida, esses animais foram fixados em decúbito dorsal, em suporte para dissecação.

O sangue foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia da realização da análise por ELISA.

### **3.3 Análise Estatística**

Foi utilizada a distribuição gama e a comparação foi feita com a opção diff do processo Genmod. Os grupos observados no tempo eram independentes e utilizou-se um esquema em fatorial, considerando como efeitos principais grupo e tempo. Utilizou-se Anova com teste de Tukey para tratar os dados de normalidade. O nível de significância considerado foi  $p \leq 0,05$ . Programa SAS for Windows, versão 9.2.

A análise estatística foi realizada com auxílio do GAP (Grupo de Apoio à Pesquisa) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

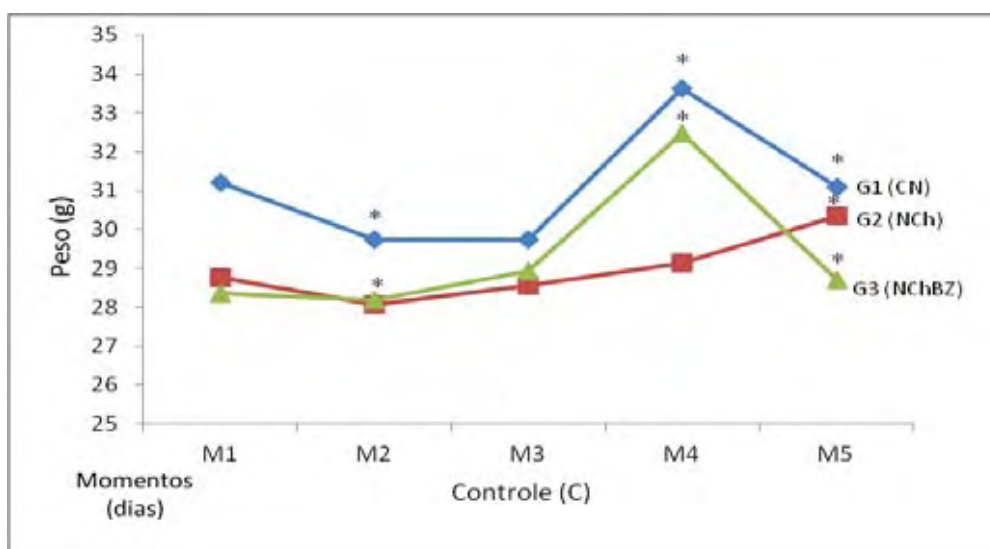
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação nutricional

Para realização da avaliação nutricional foi feita a pesagem de três animais de cada grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), nos cinco momentos (M1, M2, M3, M4 e M5). Para avaliação do peso do coração, intestino e fígado, após a eutanásia, estes, também foram pesados.

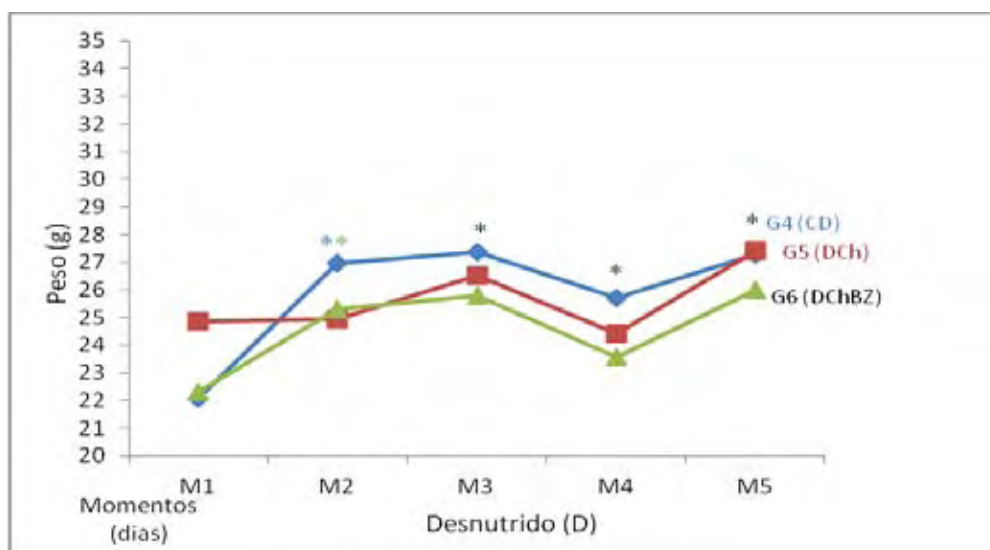
#### 4.1.1 Variação quanto ao peso corporal

Em relação aos grupos que receberam dieta normal (Figura 9), observou-se que no grupo controle (G1) e no grupo infectado e tratado com benzonidazol (G3) houve aumento de peso corporal mais significativo no momento M4, considerado o momento de maior parasitemia da cepa Y, com redução significativa do peso no momento M5. Já no grupo somente infectado (G2) houve aumento significativo do peso corporal no momento M5.



**Figura 9.** Distribuição das médias dos valores de peso corporal (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal+ *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

Em relação aos grupos com restrição dietética (Figura 10), observou-se que no grupo controle (G4) e no grupo infectado e tratado com benzonidazol (G6) houve aumento significativo de peso do momento M1 para o momento M2. Entretanto, houve maior variação foi observada no momento de maior parasitemia (M4) na qual houve redução do peso corporal nos três grupos (G4, G5 e G6), seguido de um aumento de peso no momento M5.

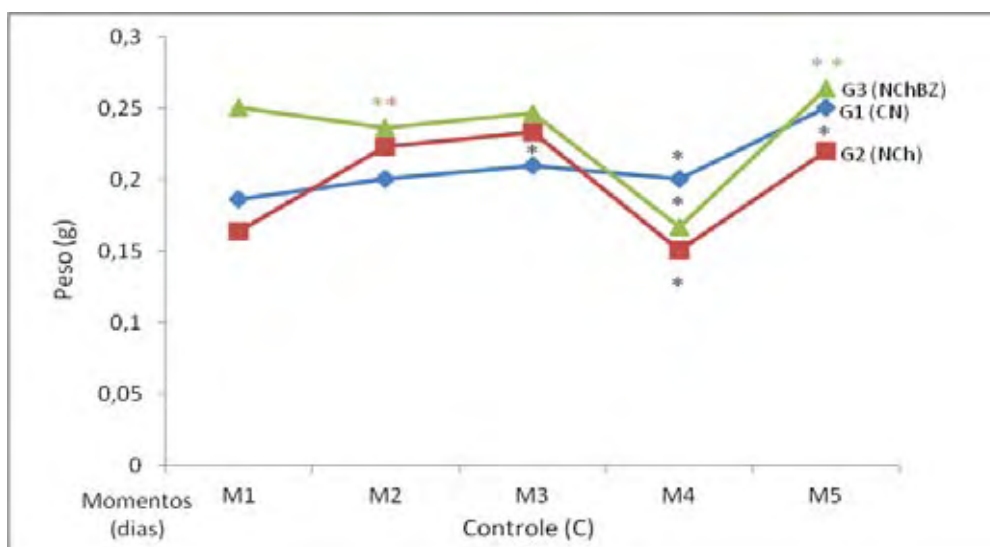


**Figura 10.** Distribuição das médias dos valores de peso corporal (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T. cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T. cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

Portanto, houve interação entre a dieta e a infecção pelo *T. cruzi* nos cinco momentos do estudo, como mostrado nas Figuras 9 e 10.

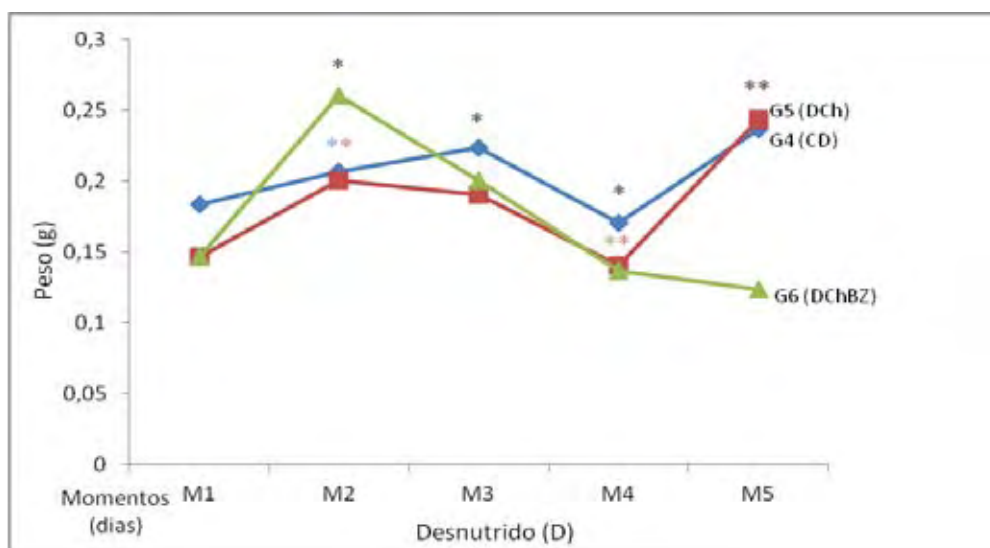
#### 4.1.2 Variação quanto ao peso do coração

Em relação aos grupos que receberam dieta normal (Figura 11), observaram-se variações significativas do momento M1 para o momento M2: aumento do peso do coração no grupo infectado (G2) e redução do peso no grupo infectado e tratado (G3). Porém, no momento M4 (maior parasitemia), foi observada redução significativa do peso do coração nos três grupos (G1, G2 e G3) e no momento M5, aumento significativo.



**Figura 11.** Distribuição das médias dos valores do peso do coração (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

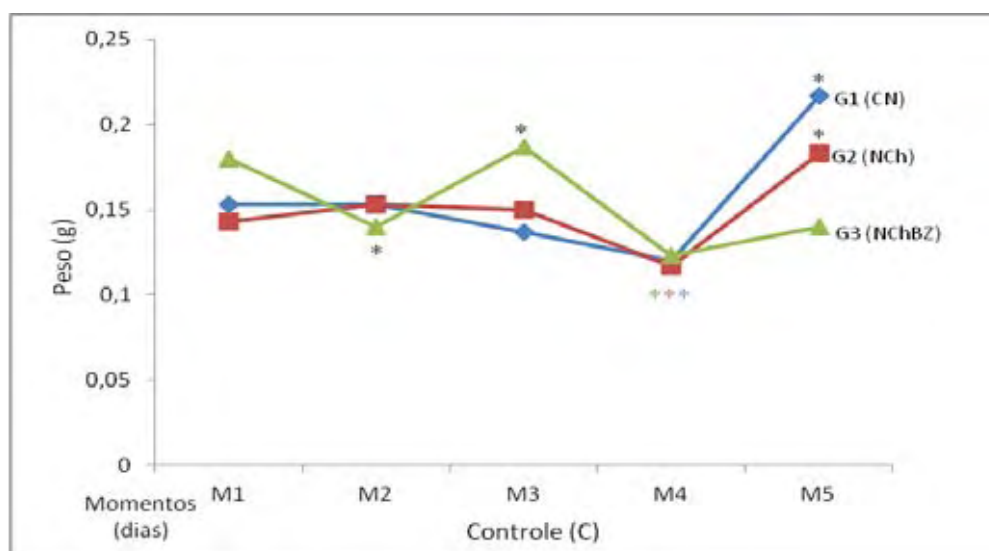
Em relação aos grupos com restrição dietética (Figura 12), observou-se nos grupos nos três grupos (G4, G5, G6) aumento significativo do peso do coração do momento M1 para o momento M2; e redução bastante significativa dessa variável em todos os grupos no momento M4 (maior parasitemia)



**Figura 12.** Distribuição das médias dos valores do peso do coração (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido + *T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

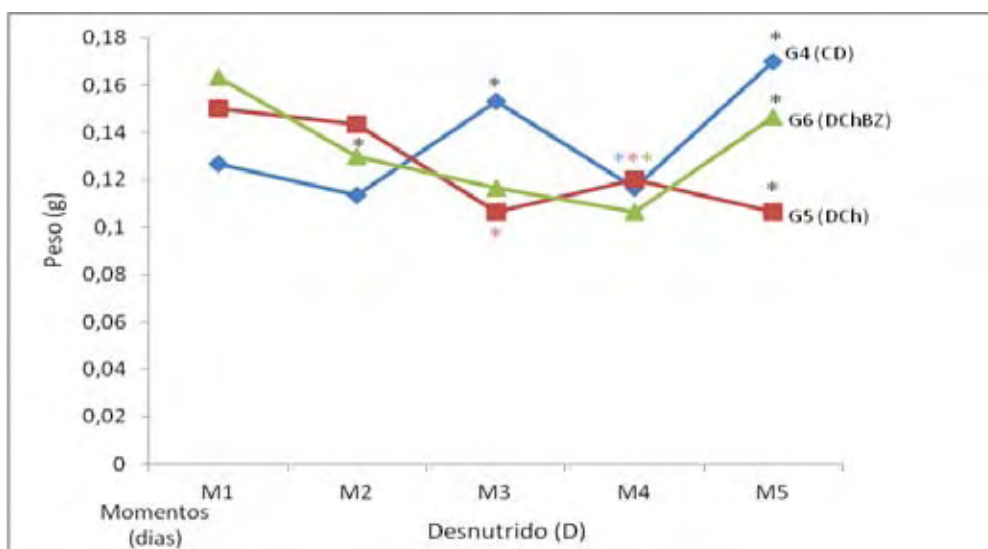
#### 4.1.3 Variação quanto ao peso do intestino

Em relação aos grupos que receberam dieta normal, observou-se que nos três grupos (G1, G2, e G3) houve redução significativa do peso do intestino no momento M4 (maior parasitemia). Foi observado também, variação do peso no grupo G3, com redução significativa no momento M2 e aumento significativo no momento M3 (Figura 13).



**Figura 13.** Distribuição das médias dos valores do peso do intestino (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

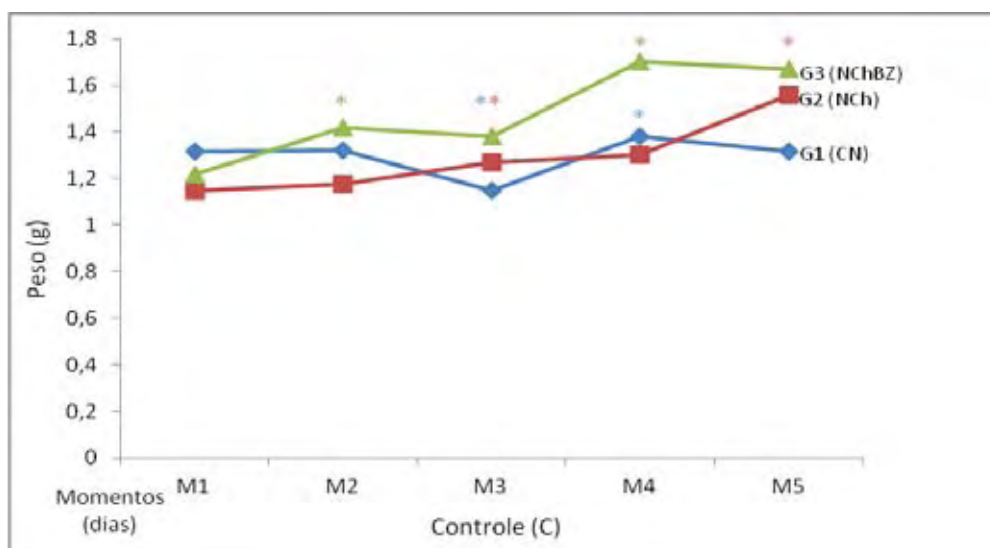
Em relação aos grupos com restrição dietética, observou-se nos três grupos (G4, G5 e G6) um comportamento diferente de variação do peso durante os cinco momentos do estudo. No momento M4 (maior parasitemia), houve redução significativa do peso do intestino nos grupos G4 e G6 e aumento significativo da mesma variável no grupo G5 (Figura 14).



**Figura 14.** Distribuição das médias dos valores do peso do intestino (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T. cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T. cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

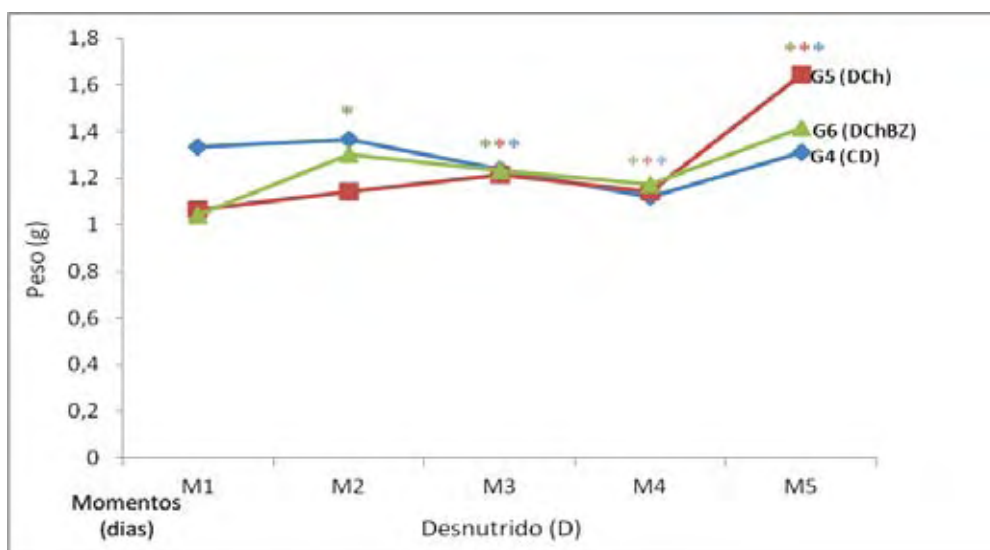
#### 4.1.4 Variação quanto ao peso do fígado

Em relação aos grupos com dieta normal, observou-se variação do peso do fígado diferente nos três grupos (G1, G2 e G3). No momento M2 houve redução do peso no grupo G1 e aumento significativo no grupo G2. Já no momento M4 (de maior parasitemia) houve aumento significativo do peso no grupo G3 (Figura 15).



**Figura 15.** Distribuição das médias dos valores do peso do fígado (gramas) de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T. cruzi* (NCh), G3=normal + *T. cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

Em relação aos grupos com restrição dietética, observou-se no momento M2 redução significativa do peso do órgão no grupo controle (G4) e no grupo infectado e tratado (G6) e aumento significativo no grupo infectado (G5). No momento M4, de maior parasitemia da cepa Y, houve redução bastante significativa do peso do fígado nos grupos G4, G5 e G6, seguido de aumento significativo no momento M5 (Figura 16).



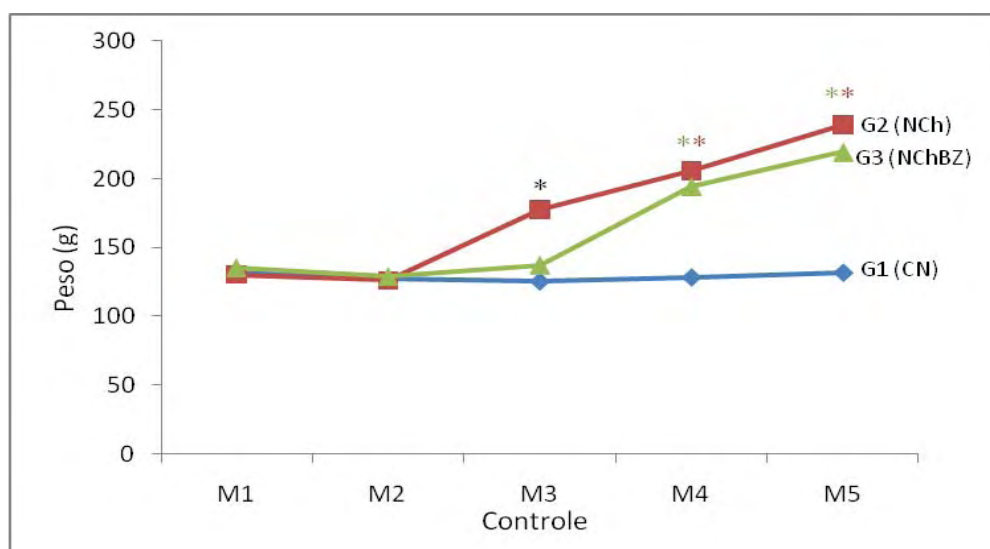
**Figura 16.** Distribuição das médias dos valores do peso do fígado (gramas) de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T. cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T. cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

## 4.2 Avaliação das citocinas

Para avaliação das citocinas foi retirado o sangue de três animais de cada grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), nos cinco momentos (M1, M2, M3, M4 e M5) após eutanásia, para realização da análise.

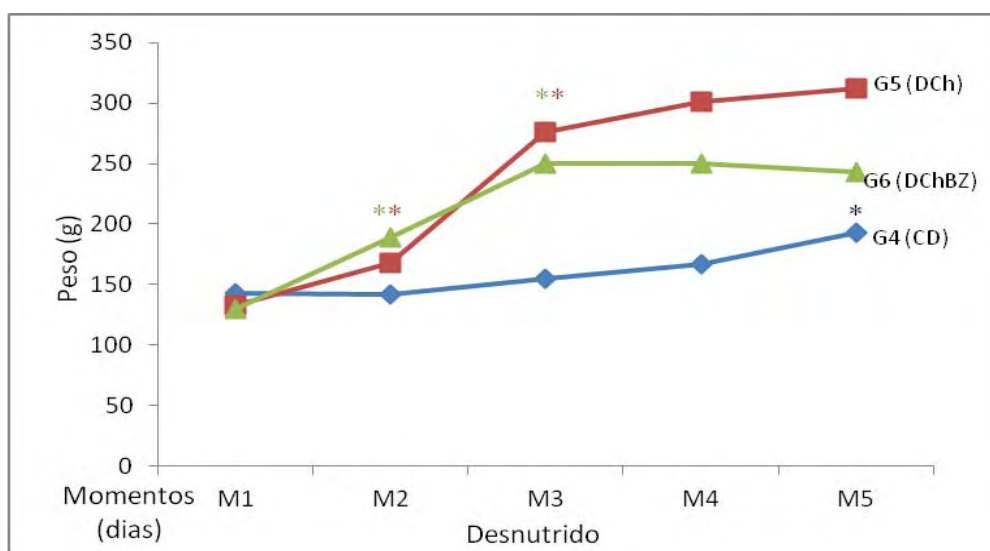
### 4.2.1 Variação quanto a citocina IL-1

Em relação aos grupos com dieta normal, observou-se que no grupo controle (G1), não houve variação significativa da IL-1 durante os cinco momentos. Já no grupo infectado (G2) houve aumento significativo da variável do momento M2, progredindo até o momento M5. No grupo infectado e tratado (G3) observou-se aumento significativo da variável do momento M4 (maior parasitemia) até o momento M5 (Figura 17).



**Figura 17.** Distribuição das médias dos valores de IL-1, de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T. cruzi* (NCh), G3=normal + *T. cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

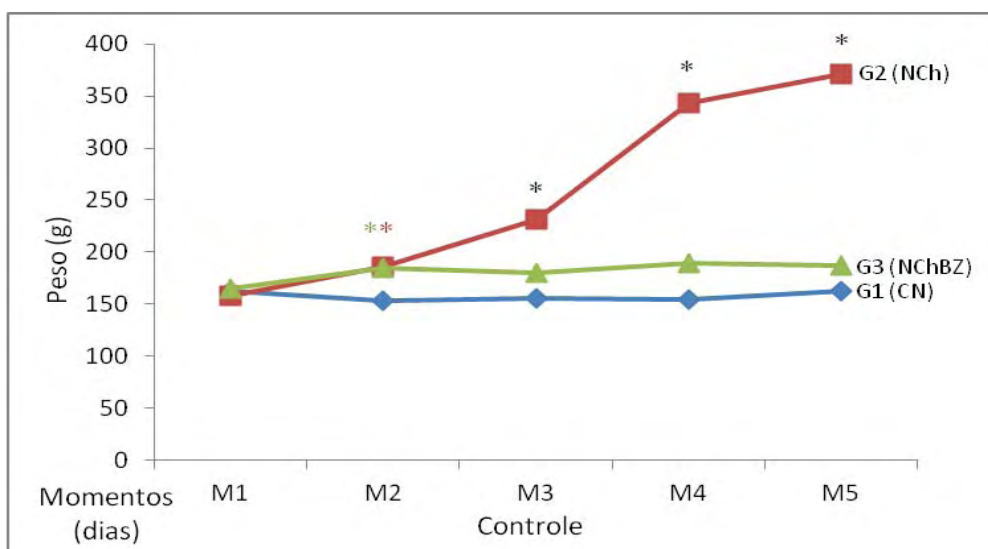
Em relação aos grupos com restrição dietética, observou-se que no grupo controle (G4) houve aumento significativo da variável somente no momento M5. No grupo infectado (G5), observou-se aumento progressivo significativo da IL-1 nos momentos M1, M2 e M3, progredindo até o momento M5. No grupo infectado e tratado (G6) houve elevação significativa da variável no momento M1, M2 e M3; com discreta redução nos momentos M4 e M5 (Figura 18).



**Figura 18.** Distribuição das médias dos valores de IL-1, de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p<0,05$ .

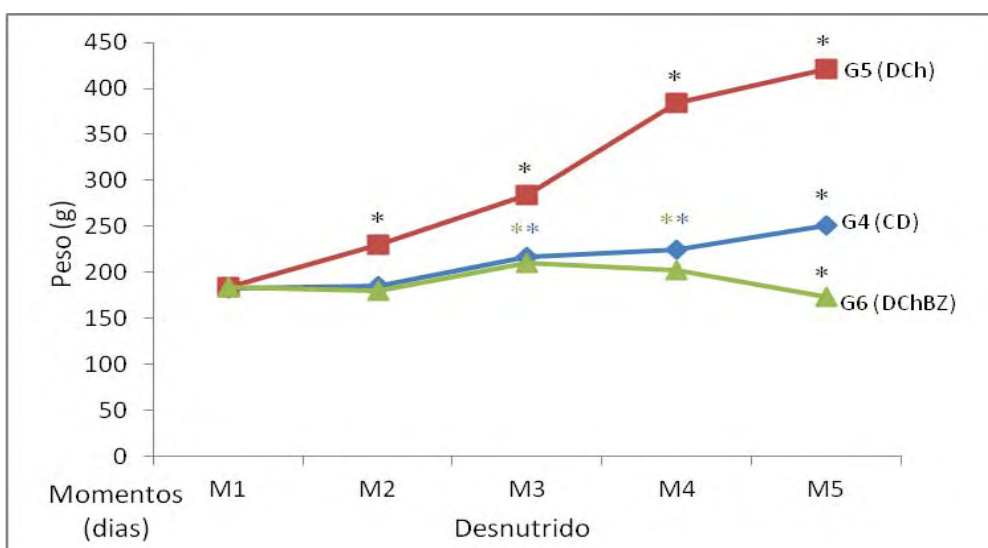
#### 4.2.2 Variação quanto a citocina IL-6

Em relação aos grupos que receberam dieta normal, no grupo controle (G1) não houve variação significativa da IL-6 durante os cinco momentos do estudo. Já no grupo infectado (G2), houve aumento significativo nos cinco momentos; e no grupo infectado e tratado (G3), houve aumento significativo da variável no momento M2, seguida de pouca variação significativa ao longo dos momentos M3, M4 e M5 (Figura 19).



**Figura 19.** Distribuição das médias dos valores de IL-6, de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal+ *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

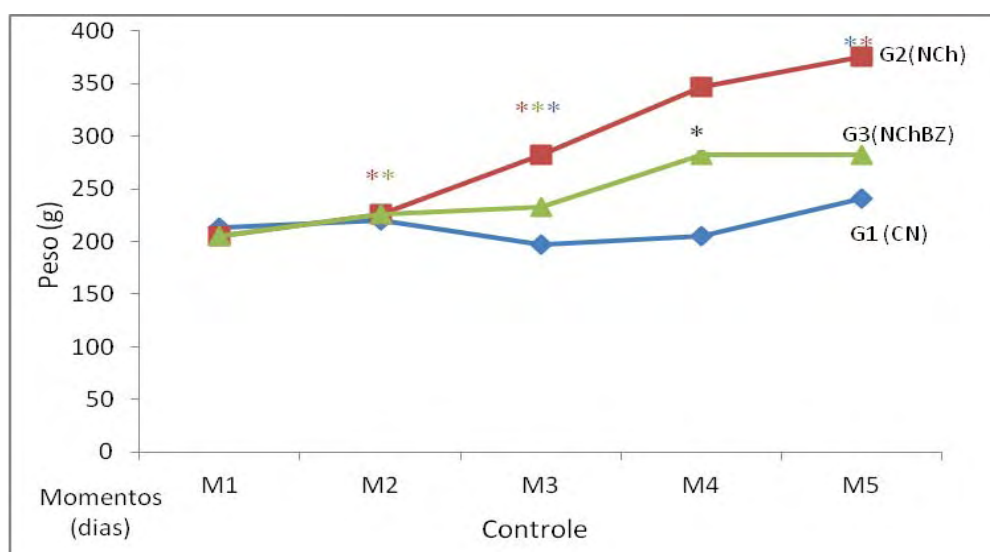
Em relação aos grupos com restrição dietética, observou-se no grupo controle (G4) aumento significativo nos momentos M3, M4 e M5. No grupo infectado (G5), observou-se elevação progressiva significativa nos cinco momentos do estudo; e no grupo infectado e tratado (G6), houve aumento significativo do momento M2 para M3; seguida de redução significativa nos momentos M4 e M5 (Figura 20).



**Figura 20.** Distribuição das médias dos valores de IL-6, de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido+*T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

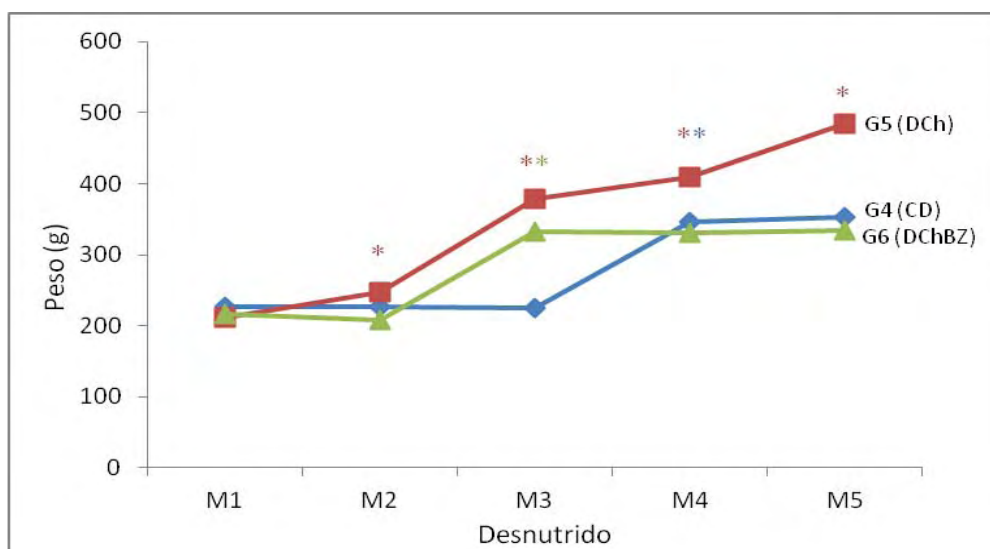
### 4.2.3 Variação quanto a citocina TNF- $\alpha$

Em relação aos grupos com dieta normal, observou-se que no grupo controle (G1) houve redução significativa do TNF- $\alpha$  no momento M3 e elevação significativa no momento M5. No grupo infectado (G2), foi observado aumento progressivo significativo do TNF- $\alpha$  durante os cinco momentos do estudo. No grupo infectado e tratado (G3), houve aumento significativo da variável nos momentos M1, M2, M3 e M4 (Figura 21).



**Figura 21.** Distribuição das médias dos valores de TNF- $\alpha$ , de camundongos Balb/c, com dieta controle (G1, G2 e G3) nos cinco momentos. G1=controle normal (CN), G2=normal + *T.cruzi* (NCh), G3=normal + *T.cruzi* + Benzonidazol (NChBZ),  $p < 0,05$ .

Em relação aos grupos com restrição dietética, observou-se no grupo controle (G4) aumento significativo do TNF- $\alpha$  do momento M3 para M4. No grupo infectado (G5), houve aumento progressivo significativo da variável nos cinco momentos do estudo. No grupo infectado e tratado (G6) ocorreu um aumento significativo do TNF- $\alpha$  do momento M2 para M3; permanecendo sem variação nos momentos M4 e M5 (Figura 22).

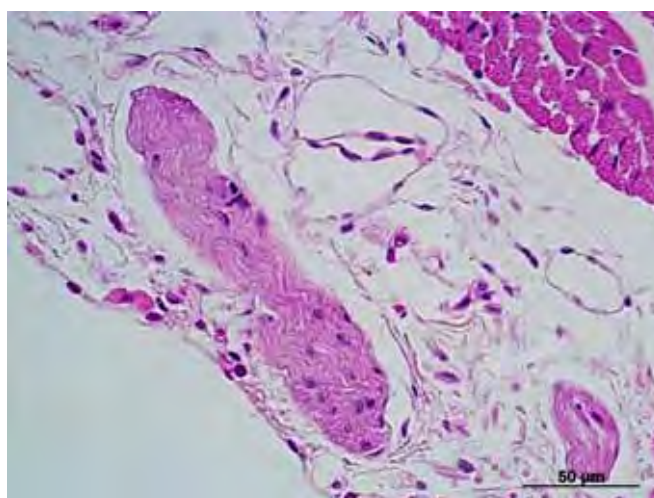


**Figura 22.** Distribuição das médias dos valores de peso, de camundongos Balb/c, com restrição dietética (G4, G5 e G6) nos cinco momentos. G4=controle desnutrido (CD), G5=desnutrido + *T.cruzi* (DCh), G6=desnutrido + *T.cruzi* + Benzonidazol (DChBZ),  $p < 0,05$ .

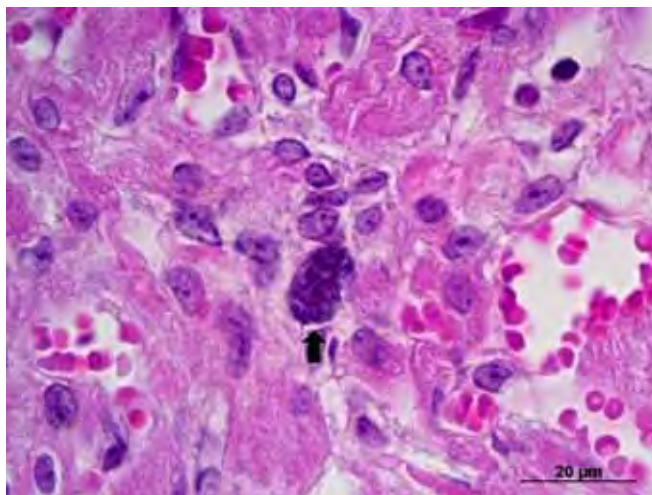
### 4.3 Avaliação histopatológica

#### 4.3.1 Coração

Os grupos controle normal (G1) e desnutrido (G4) não apresentaram alterações teciduais, mantendo o aspecto histopatológico normal (Figura 23). Já nos grupos infectado (G2) e infectado, desnutrido e tratado (G6) observou-se o surgimento de pseudocisto com protozoários a partir do 5º dia de infecção pelo *T.cruzi* (Figura 24).

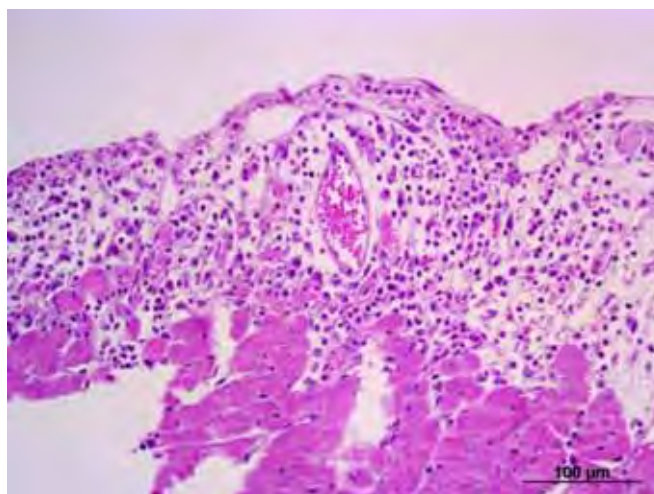


**Figura 23.** Corte histológico de coração – tecido sadio. Grupos G1 e G4.

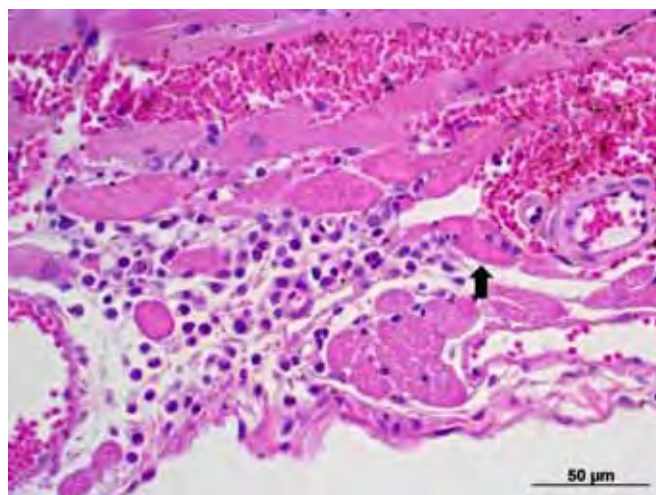


**Figura 24.** Grupos G2 e G6 – Corte histológico de coração (ápice). Pseudocisto com protozoários (seta). H&E, 400x.

No grupo infectado e desnutrido (G5) foi observado epicardite e miocardite supurativa e histocítica, onde o epicárdio e o miocárdio superficial encontram-se expandidos por exsudato misto (Figura 25). O grupo infectado e tratado (G3) apresentou epicardite e miocardite necrosupurativa, onde os cardiomiócitos necróticos mostraram um citoplasma eosinofílico forte e homogêneo (Figura 26).



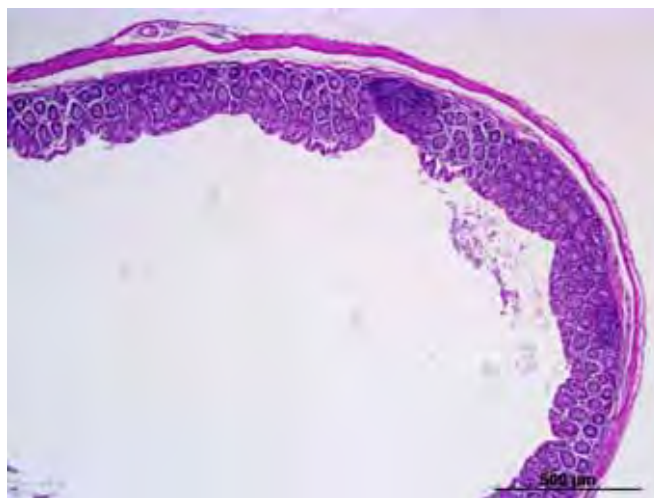
**Figura 25.** Grupo G5 – Corte histológico de coração (ápice). Epicardite e miocardite supurativa e histiocítica. H&E, 400x.



**Figura 26.** Grupo G3 – Corte histológico de coração (ápice). Epicardite e miocardite necrosupurativa (setas). H&E, 400x.

#### **4.3.2 Intestino**

Nos grupos controle normal (G1) e desnutrido (G4) não foi observada alteração tecidual, apresentando aspecto histopatológico normal (Figura 27).



**Figura 27.** G1 e G4 – Corte histológico de intestino – tecido sadio. H&E, 400x.

Nos grupos, infectado (G2) e infectado e tratado (G3) observou-se hiperplasia de nódulo linfoglandular a partir do 3º dia de infecção pelo *T.cruzi* (Figura 28).



**Figura 28.** Grupos G2 e G3. Corte histológico de intestino (côlon). Hiperplasia do nódulo linfoglandular. H&E, 200x.

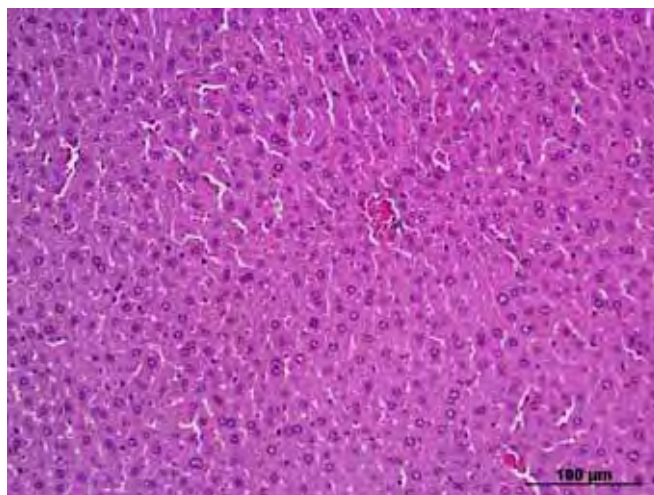
Nos grupos, infectado e desnutrido (G5) e infectado, desnutrido e tratado (G6) verificou-se um edema de lâmina própria submucosa partir do 5º dia de infecção pelo *T.cruzi* (Figura 29).



**Figura 29.** Grupos G5 e G6 – Corte histológico de intestino (côlon). Edema de lâmina própria-submucosa (seta). H&E, 400x.

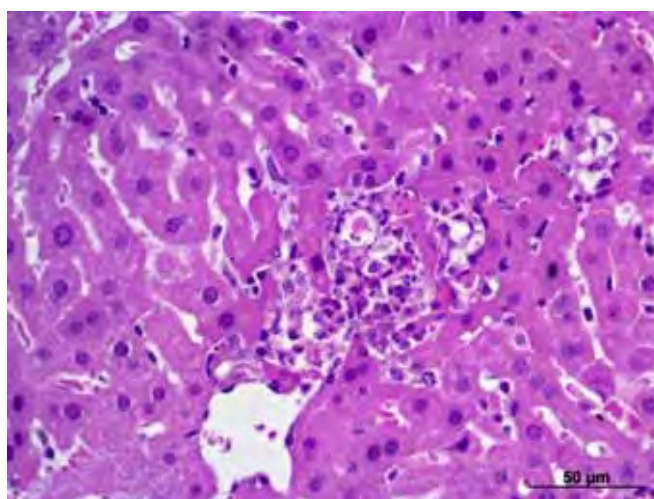
### 4.3.3 Fígado

Nos grupos controle normal (G1) e desnutrido (G4) não foram observadas alterações teciduais, mantendo o aspecto histopatológico normal (Figura 30).

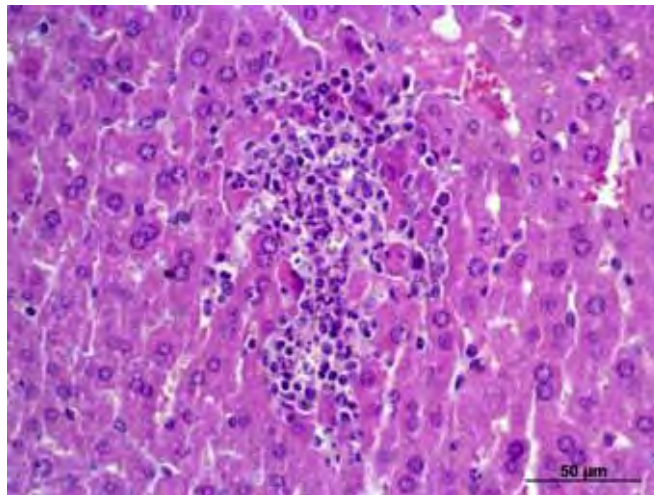


**Figura 30.** Grupos G1 e G4. Corte histológico do Fígado – tecido sadio. H&E.

Nos grupos, infectado (G2), infectado e tratado (G3), infectado e desnutrido (G5) e infectado, desnutrido e tratado (G6) observou-se hepatite aguda com necrose hepatocelular a partir do 7º dia de infecção pelo T.cruzi (Figuras 31 e 32).



**Figura 31.** Grupos G2 e G3 – Corte histológico do fígado. Hepatite aguda com necrose hepatocelular. H&E, 400x.



**Figura 32.** Grupos G5 e G6 – Corte histológico do fígado. Hepatite aguda com necrose hepatocelular. H&E, 400x.

## 5 DISCUSSÃO

A desnutrição protéico-energética é considerada causa comum de imunodeficiência secundária e susceptibilidade a infecções em humanos no mundo. Do ponto de vista de saúde pública, a desnutrição representa um fator de risco para infecções crônicas e agudas e pode contribuir para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade [72,43].

Atualmente, tem sido amplamente aceito, que a imunidade ou a susceptibilidade a diversas doenças infecto-parasitárias estão diretamente relacionadas ao estado nutricional dos indivíduos [35]. Podemos salientar que os nutrientes possuem importante papel na manutenção da resposta imune adequada; e que, alterações nutricionais podem ter efeito negativo no sistema imune atuando no crescimento e no potencial patogênico de agentes infecciosos de diversas patologias, como a infecção pelo *T.cruzi* [61,62,72].

Estudos envolvendo modelos experimentais e humanos têm observado a relação entre deficiência protéica e infecção chagásica na fase crônica. Essa restrição protéica, quando severa, pode ocasionar redução da resistência à infecção pelo *T.cruzi*, resultando em alta parasitemia e mortalidade [73-77]. Apesar dos poucos estudos, há relatos de que a deficiência protéica afeta aspectos imunológicos gerais que, juntos, podem interferir em pacientes chagásicos desnutridos e na interação hospedeiro-parasita [72]. No entanto, não há referências sobre a imunossupressão causada pela desnutrição ou de sua repercussão na infecção pelo *T.cruzi* na fase aguda.

Outra importante consequência da desnutrição é a perda de peso, que pode evoluir para caquexia; caracterizada por uma “síndrome de fome”, resultado de grande privação calórica. Geralmente, os indivíduos que apresentam esse quadro possuem maior perda de tecido adiposo do que massa magra. Embora muitas doenças têm sido associadas com caquexia, os mecanismos envolvidos nessa patogênese continuam ainda obscuros [78-80].

Sabe-se que o sistema inflamatório mediado através de injúria celular ou ativação do sistema imune leva a uma resposta inflamatória aguda, causando produção e liberação excessiva de citocinas. Essas citocinas possuem papel

fundamental na imunomodulação e têm sido associadas com a etiologia da anorexia, perda de peso, disfunção cognitiva, anemia e fragilidade. A produção e liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, interferon-gama e TNF- $\alpha$ , tem sido associadas com a evolução para caquexia, observada em pacientes com infecção aguda [78, 81-86]. Todos esses processos resultam em balanço energético negativo e perda de peso. Notadamente, a evolução da infecção também está atribuída aos efeitos periféricos e centrais de mediadores de citocinas no sistema nervoso; podendo causar sintomas como mal-estar, apatia, fraqueza, que podem comprometer a ingestão energética. Há evidências destacando a importância da função das citocinas na caquexia assim como o uso de antagonistas de citocinas como opção terapêutica [78,86].

Frente a estas considerações, justifica-se a avaliação da resposta inflamatória e suas possíveis associações com a desnutrição e a forma aguda da doença de Chagas.

O comprometimento do estado nutricional avaliado pelo peso corporal dos animais mostrou alterações significativas nos seis grupos ao longo dos cinco momentos. Observou-se que a infecção influenciou na variação de peso dos animais que receberam dieta normal, quando comparados nos diferentes momentos. O grupo G3 (dieta normal, infectados e tratados com benzonidazol) apresentou a mesma variação de peso corporal do que grupo G1 (controle normal), mostrando que o tratamento específico e precoce foi eficaz, o que permitiu manutenção do peso semelhante ao controle.

Nos grupos com desnutrição prévia e infectados pelo *T. cruzi* (G5 e G6) observou-se variação de peso nos animais no momento M4, considerado o pico da parasitemia, revelando assim a maior ação do parasita no hospedeiro. Muitos estudos têm revelado que o processo infeccioso é acompanhado de hipercatabolismo, com grande perda de reservas energéticas corporais [48,86].

Dessa forma, quando analisamos o peso corporal, a infecção atuou como fator agravante do quadro nutricional nos camundongos desnutridos.

Segundo Kotler e colaboradores, o peso corporal é um importante marcador na avaliação do estado nutricional e as deficiências nutricionais

primárias podem ser ocasionadas por problemas sociais, como pobreza e consumo inadequado de alimentos em humanos <sup>[86,87]</sup>. Considerando-se que a população infectada pelo *T.cruzi* apresenta, muitas vezes, condições sócio-econômicas precárias, isso pode comprometer o estado nutricional.

O peso corporal é caracterizado pela soma de todos os compartimentos do corpo e reflete o equilíbrio protéico-energético do indivíduo, que juntamente com a avaliação da composição corporal permite diagnosticar possíveis anormalidades nutricionais, proporcionando maior eficiência nas intervenções nutricionais <sup>[67]</sup>. Portanto, como observado no presente estudo, o peso corporal apresentou grande importância na evolução e prognóstico dessa doença.

As infecções agudas ocasionam respostas ao estresse causado no organismo, desencadeando alterações metabólicas com a finalidade de preparar o hospedeiro para combater o agente agressor. O hipercatabolismo e aumento da demanda energética juntamente com ingestão inadequada de nutrientes agravam o processo infeccioso <sup>[93]</sup>. Portanto, a desnutrição foi fator importante nos resultados.

Segundo Schaible & Kaufmann e Scrimshaw e colaboradores, o próprio quadro infeccioso pode contribuir para causar a desnutrição, como por exemplo: infecções gastrointestinais que ocasionam diarreia; infecções crônicas como Aids/HIV, tuberculose que podem causar caquexia e parasitas intestinais que podem causar anemia e depleção de nutrientes. A estimulação da resposta imune pela infecção aumenta a demanda metabólica por energia, levando a um ciclo vicioso sinérgico da desnutrição e aumento da susceptibilidade a infecções <sup>[48,61]</sup>.

Na fase aguda da infecção chagásica o número de parasitas circulantes é elevado e infecta diversos tecidos do hospedeiro, onde se multiplicam rapidamente e causam a ruptura das células <sup>[2]</sup>. Nessa fase, os parasitas desempenham papel fundamental na gênese e desenvolvimentos de lesões de órgãos, induzindo resposta inflamatória, lesões celulares e teciduais, e fibrose <sup>[72,88]</sup>.

De acordo com Sherlock & Dooley, Kierszenbaum e colaboradores, a extensão da inflamação em vários órgãos vitais, como o coração, varia durante o curso da doença e tende a ser leve e transitória na maioria dos pacientes agudos. Alguns estudos experimentais mostram que a necrose tecidual e a fibrose são processos que também podem ocorrer com a restrição protéica; comprometendo o fígado, coração e outros órgãos em doenças consumptivas [89,90].

No presente estudo, foi avaliado o peso dos órgãos no sentido de investigar a repercussão nutricional na fase aguda da doença de Chagas. Em relação ao peso do coração, todos os grupos apresentaram redução significativa no pico de maior parasitemia (M4), ou seja, a infecção pelo *T.cruzi* afetou o peso do órgão nesse momento. Quanto ao peso do intestino, houve variação, porém sem relação com a infecção pelo *T.cruzi*, podendo ser explicado pelo curto espaço de tempo de experimento, o que poderia ser diferente na fase crônica. Já em relação ao peso do fígado foi observado que ambos os grupos dieta normal infectados, tratados ou não (G2 e G3) houve aumento do peso após momento M3. O mesmo ocorreu nos grupos desnutridos, tratados ou não (G5 e G6) após momento M4. Talvez o maior número de parasitas possa ter contribuído para uma resposta inflamatória desse órgão, levando ao aumento do peso. A infecção foi fator importante na determinação do peso do coração e fígado, principalmente no momento M4 e o tratamento específico não influenciou nessa variação.

A resposta inflamatória avaliada pelas citocinas, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , na infecção pelo *T.cruzi* apresentou resultados relevantes associados à desnutrição e à infecção [91]. Vários autores, tais como Coelho-Castelo e colaboradores, relatam que a resposta imune é fundamental para o controle das infecções parasitárias [64].

Os níveis séricos de IL-1 elevados, apresentaram importante papel frente à infecção pelo *T.cruzi*, tanto nos camundongos que receberam dieta normal quanto nos desnutridos. Resultados semelhantes foram encontrados com o TNF- $\alpha$ . Os animais infectados apresentaram altos níveis séricos de IL-1, que foram aumentando no decorrer dos momentos. Já nos animais infectados

e tratados, observou-se que houve aumento da IL-1, porém em níveis menores que nos animais infectados, mostrando que o tratamento com benzonidazol teve influência no controle da infecção pelo *T.cruzi* e na resposta inflamatória. Nos animais controle e desnutridos, observou-se que a desnutrição influenciou na resposta imune, com elevação dos níveis séricos dessa citocina durante os cinco momentos, ressaltando a importância da perda de peso como fator determinante na resposta inflamatória avaliada por essa citocina. Quando foi introduzida a variável infecção no grupo dos animais desnutridos, houve maior resposta desta citocina ao longo dos cinco momentos, mostrando que além da desnutrição, a infecção pelo *T.cruzi* exacerbou ainda mais o processo inflamatório agudo. Quando tratados com benzonidazol, observou-se redução nos níveis séricos da IL-1, mostrando que o tratamento prévio e específico reduz a resposta inflamatória e da carga antigênica. Portanto, a elaboração excessiva da IL-1, bem como de TNF- $\alpha$  (feedback de auto-regulação), deve ter sido fator crítico na indução da perda de peso e na atividade inflamatória, e a redução da carga antigênica com o tratamento contribui para menor liberação dessa citocina pró-inflamatória e controle de peso.

Em relação a IL-6, a infecção pelo *T.cruzi* estimulou o aumento dos níveis dessa citocina nos cinco momentos do estudo. Por outro lado, o tratamento com benzonidazol reduziu os níveis da mesma nos animais infectados. Quando os animais controle foram submetidos à desnutrição prévia, houve aumento dos níveis de IL-6. Porém, com a infecção pelo *T.cruzi*, houve exacerbação dos níveis dessa citocina, mostrando um aumento progressivo no decorrer dos cinco momentos. Com a introdução do benzonidazol, a IL-6 se comportou de maneira semelhante ao grupo controle desnutrido, mostrando a ação do tratamento no controle da carga antigênica e resposta inflamatória. A desnutrição, a infecção pelo *T.cruzi* e o tratamento específico foram fatores importantes para o comportamento da IL-6, mostrando que a desnutrição interfere no seu estímulo, que associado com a infecção desencadeia impacto negativo nos seus níveis séricos.

Outra citocina pró-inflamatória importante na tríade desnutrição, infecção pelo *T.cruzi* e resposta imune foi o TNF- $\alpha$ . Essa citocina, antigamente chamada de caquexina, foi inicialmente descrita em Trypanosomíase africana que

contribuiu para níveis séricos elevados de lipídeos no hospedeiro e perda de peso associada com essa infecção. Outras doenças, como a malária, confirmam a atividade desta citocina <sup>[92]</sup>.

A infecção chagásica teve papel importante no aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  nos animais controle que receberam dieta normal e nos desnutridos. Pode-se observar que a maior parasitemia foi um estímulo importante na ativação de macrófagos, com produção de TNF- $\alpha$ . Esses resultados concordam com Tarleton que relata correlação positiva entre a parasitemia e o nível de TNF- $\alpha$  circulante <sup>[94]</sup>. Outros autores relatam que a infecção pelo *T.cruzi* induz a produção desta citocina, tendo como consequência, perda de peso severa na fase aguda, como foi observado no atual estudo <sup>[95,96-104]</sup>.

Com a introdução do tratamento com benzonidazol, houve redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , aproximando-se dos grupos controles (dieta normal e restrição dietética). Quando os animais foram submetidos à desnutrição, podemos observar que mesmo na ausência da infecção houve elevação dos níveis séricos dessa citocina. Por outro lado, com a infecção chagásica esses níveis séricos foram exacerbados, mostrando sua participação na atividade inflamatória. O tratamento atuou reduzindo a carga parasitária e consequentemente, com menor estímulo da atividade pró-inflamatória. Essa variável apresentou maior sensibilidade na avaliação da interação desnutrição, infecção e imunidade.

Em relação à análise histopatológica, o coração, o intestino e o fígado mostraram alterações em todos os animais infectados, desnutridos ou não, com e sem tratamento.

O miocárdio apresentou alterações após 5º dia de contato com o parasita, caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório e de pseudocistos com protozoários. Nesta fase também se observou importantes alterações estruturais no miocárdio como a desorganização das fibras musculares e reação inflamatória. A miocardite chagásica é diferenciada pela presença de parasitas nas fibras musculares e infiltrado inflamatório constituído

por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos. De acordo com Brener e colaboradores, o coração é o órgão que mais apresenta lesões inflamatórias, tanto na fase aguda quanto crônica, variando o grau e nível de parasitismo do órgão <sup>[105]</sup>. Vários estudos experimentais têm relatado a ocorrência dessas alterações no pico da parasitemia durante a fase aguda em animais eutróficos; coincidindo parcialmente com os nossos resultados, já que as alterações começaram a ocorrer dois dias antes do pico de parasitemia da cepa utilizada <sup>[105, 106]</sup>. Quanto aos animais desnutridos não houve diferença no comportamento da infecção pelo *T.cruzi*, podendo ser explicado pelo curto espaço de tempo e por se tratar de infecção aguda.

A forma digestiva da doença de Chagas compreende alterações estruturais e fisiológicas na fase crônica, como o megacólon, considerado uma das manifestações viscerais mais frequentes <sup>[107]</sup>. Vários estudos realizados em humanos têm demonstrado que a infecção pelo *T.cruzi* na fase crônica causa destruição de células ganglionares nervosas, especialmente do complexo mio-entérico, que são responsáveis pelo surgimento do megacólon e megaesôfago <sup>[108,109]</sup>. No estudo experimental realizado com camundongos infectados pelo *T.cruzi* e eutanasiados na fase aguda da doença, foram encontradas alterações degenerativas de células ganglionares nervosas do plexo de Auerbach do intestino grosso, que possui correlação direta com a presença de reação inflamatória provocada pelo parasita <sup>[108]</sup>. Nos linfonodos observou-se hiperplasia linfóide reacional de padrão misto <sup>[110]</sup>. Esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual é citada a ocorrência de hiperplasia linfóide, sem formação de infiltrado inflamatório, o que pode ser explicado por ser uma doença avaliada na fase aguda e pelo curto espaço de tempo de experimento.

Quanto ao fígado, estudos experimentais realizados com diferentes linhagens de camundongos cronicamente infectados pelo *T.cruzi* relatam a presença de infiltrado inflamatório nesse órgão. O padrão mais comum nele encontrado incluiu vários graus de hepatite e lesões inflamatórias do músculo estriado em camundongos de diferentes linhagens como Balb/c, A/J e C57BL/6. A inflamação mononuclear multifocal também foi observada em todo o tecido hepático de camundongos A/J infectados, com menos intensidade em camundongos Balb/c. Os resultados encontrados na literatura corroboram com

esses estudos, com a ocorrência de hepatite aguda em grau mais avançado pela presença de necrose hepatocelular <sup>[111]</sup>.

As alterações histopatológicas resultantes, particularmente no coração, foram mais evidentes com o aumento da parasitemia (a partir do 5º dia de infecção pelo *T.cruzi*) momento no qual as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL- 1 e IL-6) apresentaram níveis séricos elevados, tanto nos animais normais quanto nos desnutridos. Cabe salientar que o coração, o intestino e o fígado apresentaram processos inflamatórios importantes com presença de níveis séricos de citocinas mais elevados nos animais desnutridos, o que sugere que a desnutrição é um fator agravante para a doença na fase aguda.

## 6 CONCLUSÃO

- A infecção com *T.cruzi* desempenhou um importante papel na alteração de peso corporal dos animais desnutridos, contribuindo ainda mais para redução dessa variável e, portanto, influenciando o quadro de desnutrição. Quando tratados com benzonidazol, foi possível observar uma recuperação dos animais com aumento do peso corporal até o final do experimento.

- Em relação ao peso do coração, observou-se que a infecção chagásica contribuiu para redução dessa variável tanto no grupo dos animais com dieta normal quanto no grupo dos desnutridos. Quanto ao fígado, a infecção atuou reduzindo o peso desse órgão no grupo dos animais desnutridos. O tratamento específico e prévio não influenciou na recuperação ou ganho de peso desses órgãos. Esses resultados são justificados por ser uma doença aguda e com poucos dias de segmento.

- As citocinas pró-inflamatórias foram utilizadas como marcadores precoces na avaliação da desnutrição e do processo infeccioso causado pelo *T.cruzi*. O TNF- $\alpha$  foi a citocina de maior expressão para essa avaliação.

- Nos animais tratados com benzonidazol observou-se redução da parasitemia e consequente queda da liberação das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  em ambos os grupos, mostrando que o tratamento prévio e específico na fase aguda da infecção pelo *T.cruzi* é importante para minimizar os efeitos do processo infeccioso e da resposta inflamatória.

- Esses achados permitem sugerir forte participação das citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , na interação entre desnutrição, processo infeccioso agudo, causado pelo *T.cruzi*, e resposta imune.

- As alterações histopatológicas observadas nos órgãos (coração, intestino e fígado) foram mais evidentes com o aumento da parasitemia, ocorrido a partir do 5º dia de infecção pelo *T.cruzi*, quando os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) começam a aumentar.

- Novos estudos devem ser realizados, não só na infecção aguda como também na crônica de doença de Chagas, para auxiliar na compreensão

dos complexos mecanismos envolvidos na interação entre doença de Chagas, desnutrição e imunidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Ministério da Saúde (Brasil). Portal da Saúde - Doença de Chagas. 2011. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/> >. Acesso em: 15/07/2011
- 2 Clayton J. Chagas disease 101. *Nature*. 2010; 465:S4-5.
- 3 Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol*. 2005; 21(12):581-7.
- 4 Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5):577-91.
- 5 World Health Organization (US). Control of Chagas disease. In: (Ed.). Control of Chagas disease-Second report of the WHO Expert Committee. 2002; p.109
- 6 Leiby DA, Read EJ, Lenes BA et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors. *J Infect Dis*. 1997; 176(4):1047-52.
- 7 Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5): 603-12.
- 8 Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003; 19(11):495-501.
- 9 Ministério da Saúde (Brasil). Epidemiologia de Doença de Chagas. 2007-2010. Acesso em: 15/07/2011.
- 10 Navarro EC, Goto RL., Ricobini IS, Henriques RMS, et al. Soroprevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no homecentro de Botucatu. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011 Ago 24-27; São Paulo-SP. Goiânia-GO: Revista de Patologia Tropical; 2011.

- 11 Ministério da Saúde (Brasil). Doença de Chagas. In: MS, E. (Ed.). Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição. Brasília-DF, 2005.
- 12 Schmunis GA. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991; 31(6):547-57.
- 13 Vinhaes MC, Dias JC. Chagas disease in Brazil. 2000; 16(2):7-12.
- 14 Dias JC. Chagas disease, environment, participation, and the state. 2001; 17:165-9.
- 15 Alarcon de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. 2010; 201(9):1308-15.
- 16 Cimermam S, Cimermam B. Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas). In: Condutas em Infectologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.628.
- 17 Veronesi R, Focaccia R. Doença de Chagas. In: Tratado de Infectologia. 2ª edição. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Editora atheneu, 2002.
- 18 Macedo VO. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. p.135-152.
- 19 Laranja FS, Dias E, Nóbrega MD, Miranda A. Chagas disease: a clinical, epidemiologic and pathological study. Circulation. 1956; 14:1035-1060.
- 20 Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003, 98(3):407-11.
- 21 Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. 2002; 97(1):3-24.

- 22 Boyce HW, Bakneet MR. Sialorrhea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(2):89-97.
- 23 de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996; 348(9039):1407-13.
- 24 Rassi A. Etiological treatment of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 1982; 38(4):277-81.
- 25 Pereira PCM, Meira DA. Nutrição e Infecção. In: INTERLIVROS (Ed.). *Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas*. Rio de Janeiro. 1991, p.29-32.
- 26 Beisel WR. Nutrition in pediatric HIV infection: setting the research agenda. Nutrition and immune function: overview. *J Nutr*. 1996 ; 126(10): 2611S-2615S.
- 27 Grimble RF. Malnutrition and the immune response. 2. Impact of nutrients on cytokine biology in infection. 1994; 88(6):615-9.
- 28 Filteau SM, Tomkins AM. Micronutrients and tropical infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88(1):1-3, 26.
- 29 de Pontes VMO, de Souza AS Jr, Cruz FMT, et al. Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceara. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(2):182-7.
- 30 Ministério da Saúde (Brasil). Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health. *Rev Saude Publica*. 2010; 44(1):200-2.
- 31 Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. *BMJ*, v. 325, n. 7357, p. 176-7, 2002.
- 32 World Health Organization (US). *Neglected tropical diseases*, hidden successes, emerging opportunities. In: (Ed.). Geneva: WHO, 2009.

- 33 Trouiller P, Oliaro O, Torreele E, et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*. 2002; 359(9324):2188-94.
- 34 Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66(2):464S-477S.
- 35 Malafaia G. Protein-energy malnutrition as an aggravating condition for the health of hospitalized patients *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 2009; 34:101-107.
- 36 Ambrus JL Sr, Ambrus JL Jr. Nutrition and infectious diseases in developing countries and problems of acquired immunodeficiency syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229(6):464-72.
- 37 Blossner M, de Onis M, et al. Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels. In: *Environmental Burden of Disease Series*. Geneva. 2005; v.12.
- 38 Sawaya AL. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. In: *Estudos avançados*. 2006; 20:147-158.
- 39 Schaible EU, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*. 2007; 4(5):e115.
- 40 Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56:S46-S49.
- 41 Grover Z, Ee LC. Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin North Am*. 2009; 56(5):1055-68.
- 42 Akuyam AS. A review of some metabolic changes in protein-energy malnutrition. *Niger Postgrad Med J*. 2007, 14(2):155-62.
- 43 Allen L, Benoist B, Dary O, et al. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization. Geneva 2006.

- 44 Fraker PJ, Caruso R, Kierszenbaum F. Alteration of the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Nutr*. 1982; 112(6):1224-9.
- 45 Brazão V, Del Vecchio Filipin M, Caetano LC, et al. *Trypanosoma cruzi*: the effects of zinc supplementation during experimental infection. *Exp Parasitol*. 2008; 118(4):549-54.
- 46 Katona P; Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(10):1582-8.
- 47 Macallan D. Malnutrition and Infection. In: *Defence Against Infection*. Medicine Publishing. 2005; 33:14-16.
- 48 Schaible EU, Kaufmann SH. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. *PLoS Medicine*. 2001; 4(5):e115.
- 49 Solomons NW. Malnutrition and infection: an update. *Br J Nutr*. 2007; 98(1):S5-10.
- 50 Rakotoarimanana R. Nutrition and infection. *Rev Med Suisse*. 2009; 5(220):1975-8.
- 51 Koethe JR, Heimburger DC. Nutritional aspects of HIV-associated wasting in sub-Saharan Africa. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(4):1138S-1142S.
- 52 Gupta KB, gupta R, Atreja A, et al. Tuberculosis and nutrition. *Lung India*. 2009; 26(1):9-16.
- 53 World Health Organization (US). "Malaria and Malnutrition" - WHO/RBM Consultation - Best practices and lessons learnt from implementing malaria control in complex emergencies in Africa 2000–04. 2005.
- 54 Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*. 2001; 69(8):4709-18.

- 55 Malafaia G, Serafim TD, Silva ME, Pedrosa ML, et al. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2009; 31(1):41-9.
- 56 Machado PRL, Carvalho L. Mecanismos de resposta imune à infecções. *An bras Dermatol.* 2004; 79(6):647-664.
- 57 Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 1996; 64(6):1961-7.
- 58 Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun.* 1999; 67(8):3864-71.
- 59 Silva JS, Aliberti LCS, Martins MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J \med Biol Res.* 1998; 31:111-5.
- 60 Keusch GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr.* 2003; 133(1):336S-340S.
- 61 Scrimshaw NS, Taylos CE. Interactions of nutrition and infection. Monograph Series. World Health Organization. 1968; 57: 3-329.
- 62 Malafaia G. Efeitos das deficiências de ferro e zinco no sistema imune. *Revista de Pesquisa e Pós-graduação.* 2007; 8: 5-9.
- 63 Field CJ, Johnson IR, Schley PD. Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol.* 2002; 71(1):16-32.
- 64 Coelho-Castelo AAM, Trombone APF, Rocha CD, Lorenzi JCC. Immune response to infectious diseases. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2009; 42(2):127-42.
- 65 Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, et al. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in

experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998; 152(4):925-34.

66 Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000; 102(24):3003-8.

67 Cuppari, L. *Nutrição Clínica no Adulto.* 2º edição. São Paulo: 2006.

68 Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.* 1986; 320(6063):584-8.

69 Pissetti CW, Correia D, Braga TT, et al. Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(4):425-30.

70 Werneck GL, Hasselmann MH, Gouvêa TG. An overview of studies on nutrition and neglected diseases in Brazil. *Cien Saude Colet.* 2011; 16(1):39-62.

71 Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, et al. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase Trypanosoma cruzi Infection. *Journal of Immunology.* 2010; 185(2):1150-1157.

72 Malafaia G, Talvani A. Nutritional Status Driving Infection by Trypanosoma cruzi: Lessons from Experimental Animals. *J Trop Med.* 2011; 2011:981879.

73 De Andrade AI, Zicker F. Chronic malnutrition and Trypanosoma cruzi infection in children. *J Trop Pediatr.* 1995; 41(2):112-5.

74 Machado CR, Moraes-Santos T, Machado AB. Cardiac noradrenalin in relation to protein malnutrition in chronic experimental Chagas' disease in the rat. *Am J Trop Med Hyg.* 1984; 33(5):835-8.

75 Gomes NG, Pereira FE, Domingues GC, Alves JR. Effects of severe protein restriction in levels of parasitemia and in mortality of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994; 27(1):19-24.

76 Carlomagno M, Leer G, Esteva M, Hansen D, Segura EL. Role of Protein Deficiency on the Course of *Trypanosoma cruzi* Infection and on the Degree of Protection Conferred by a Flagellar Fraction. *Journal of Nutritional Immunology*. 2008; 4(4):37-45.

77 Cintra IP, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Afonso C, et al. Influence of dietary protein content on *Trypanosoma cruzi* infection in germfree and conventional mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 1998; 40(6):355-62.

78 Morley JE, Thomas DR, Wilson MM. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(4):735-43.

79 Thomas DR. Distinguishing starvation from cachexia. *Clin Geriatr Med*. 2002; 18(4):883-91.

80 Roubenoff R, Heymsfield SB, Kehayias JJ, et al. Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66(1):192-6.

81 Roubenoff R, Parise H, Payette HA, Abad LW, et al. Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med*. 2003; 115(6):429-35.

82 Ferrucci L, Penninx BW, Volpato S, Harris TB, et al. Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J Am Geriatr Soc*. 2002; 50(12):1947-54.

83 Morley JE.. Anorexia, sarcopenia, and aging. *Nutrition*. 2001; 17(7):660-663.

84 Morley JE, Baumgartner RN. Cytokine related aging process. *J Gerontol Med*. 2004; 59(9):M924-M929.

- 85 Wilkinson TJ, Warren MR. What is the prognosis of mild normocytic anaemia in older people? *Intern Med J.* 2003; 33(1-2):14-7.
- 86 Kotler DP. Cachexia. *Annals of Internal Medicine.* 2000; 133(8):622-634.
- 87 Waitzberg D. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica.* 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2009.
- 88 Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100(8):663-77.
- 89 Sherlock S, Dooley J. Nutrition and metabolic liver diseases. In: *Diseases of the liver and biliary system.* 11ª edição: Oxford: Blackwell Sci Pub, 1993. p.408-13
- 90 Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica.* 2007; 52(1):1-12..
- 91 Araujo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, et al. CD8+-T- cell-dependent control *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun.* 2005; 73(9):6017-25.
- 92 Tarleton RL. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 1988; 73(2):186-90
- 93 Pereira, P.C.M. *Interação entre infecção, nutrição e imunidade na medicina tropical.* In: *Condutas em infectologia.* São Paulo: Editora Atheneu. 2003, p.655-60.
- 94 Tarleton RL. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 1991; 73(1):106-9.
- 95 Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, et al.. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 1997; 65(2):457-65.

- 96 Russo M, Starobinas N, Ribeiro-Dos-Santos R, et al. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1989; 11(4):385-95.
- 97 Santos Lima EC, Minoprio P. Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells. *Infect Immun.* 1996; 64(1):215-21.
- 98 Lima EC, Garcia I, Vicentelli MH, et al.. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 1997; 65(2):457-65.
- 99 Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 1995; 63(12):4862-7.
- 100 Soboslay PT, Dreweck CM, Hoffmann WH, Lüder CG, et al. Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clin Exp Immunol.* 1992; 89(3):407-13.
- 101 Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol.* 1991; 142(2):117-22.
- 102 Stefani MM, Takehara HA, Mota I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol Lett.* 1983; 7(2):91-7.
- 103 Stenger S, Solbach W, Rölinghoff M, Bogdan C. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. II. Endogenous tumor necrosis factor-alpha production by macrophages is induced by the synergistic action of interferon (IFN)-gamma and interleukin (IL) 4 and accounts for the antiparasitic effect mediated by IFN-gamma and IL 4. *Eur J Immunol.* 1991; 21(7):1669-75.

- 104 Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1990; 144(2):717-24.
- 105 Brener Z, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1979:463.
- 106 De Oliveira AM, Borges P, Pons AH, Babinski MA, et al. Análise histopatológica e estereológica do coração de camundongos na fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Acta Scientiae Medica*. 2008; 1(1):10-18.
- 107 Santos JCM Jr. Megacólon - Parte II: Doença de Chagas. *Rev Bras Coloproctol*. 2002; (4):266-277.
- 108 Andrade SG, Andrade ZA. Doença de Chagas e alterações neurais no plexo de Auerbach. *Rev Inst Med trop*. 1966; 8(5):219-224.
- 109 Okumura M, De Brito T, Da Silva LHP, et al. The Pathology of Experimental Chagas's Disease in Mice: I. Digestive Tract Changes, with a reference to Necrotizing Arteritis. *Rev Inst Med trop*. 1960; 2(1):17-28.
- 110 Santos MR, Sobrado CW Jr, Damião AOMC, et al. Megaíleo chagásico. Descrição de um caso. *Rev Inst Med trop*. 1988; 30(4):293-296.
- 111 Marinho CR, Bucci DZ, Dagli ML, Bastos KR, et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun*. 2004; 72(4):2350-7.

8 ANEXOS

8.1 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso corporal de camundongos balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos

| GRUPO            | MOMENTOS     |              |              |              | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
|                  | M1           | M2           | M3           | M4           | M5             |
|                  | MÉDIA/DP     | MÉDIA/DP     | MÉDIA/DP     | MÉDIA/DP     | MÉDIA/DP       |
| G1 (CN)          | 31,2 ± 0,62  | 29,73 ± 1,79 | 29,73 ± 1,71 | 33,63 ± 1,22 | 31,3 ± 1,42    |
| G2 (NCh)         | 28,77 ± 1,45 | 28,07 ± 1,53 | 28,57 ± 0,6  | 29,13 ± 1,64 | 30,33 ± 1,24   |
| G3 (NChBZ)       | 28,37 ± 1,01 | 28,2 ± 1,01  | 28,93 ± 1,96 | 32,47 ± 4,76 | 28,7 ± 0,98    |
| G4 (CD)          | 22,07 ± 0,98 | 26,97 ± 1,27 | 27,37 ± 1,26 | 25,7 ± 2,43  | 27,3 ± 0,61    |
| G5 (DCh)         | 24,87 ± 1,59 | 24,93 ± 1,44 | 26,53 ± 1,65 | 24,43 ± 2,43 | 27,4 ± 0,61    |
| G6 (DChBNZ)      | 22,30 ± 1,65 | 25,3 ± 0,35  | 25,8 ± 0,46  | 23,57 ± 0,55 | 26,0 ± 0,5     |
| MÉDIA DO MOMENTO | 26,26        | 27,20        | 27,82        | 28,15        | 28,50          |

8.2 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do coração, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos

| GRUPO            | MOMENTOS    |             |             |             | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                  | M1          | M2          | M3          | M4          | M5             |
|                  | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP       |
| G1 (CN)          | 0,19 ± 0,01 | 0,20 ± 0,04 | 0,21 ± 0,04 | 0,20 ± 0,07 | 0,25 ± 0,04    |
| G2 (NCh)         | 0,16 ± 0,01 | 0,22 ± 0,07 | 0,23 ± 0,05 | 0,15 ± 0,01 | 0,22 ± 0,07    |
| G3 (NChBZ)       | 0,25 ± 0,16 | 0,24 ± 0,06 | 0,25 ± 0,04 | 0,17 ± 0,04 | 0,24 ± 0,03    |
| G4 (CD)          | 0,18 ± 0,04 | 0,21 ± 0,04 | 0,22 ± 0,05 | 0,17 ± 0,03 | 0,24 ± 0,04    |
| G5 (DCh)         | 0,15 ± 0,03 | 0,20 ± 0,07 | 0,19 ± 0,06 | 0,14 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03    |
| G6 (DChBZ)       | 0,15 ± 0,02 | 0,26 ± 0,06 | 0,20 ± 0,09 | 0,14 ± 0,03 | 0,12 ± 0,03    |
| MÉDIA DO MOMENTO | 0,18        | 0,22        | 0,21        | 0,16        | 0,22           |

8.3 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do intestino, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos

| GRUPO            | MOMENTOS    |             |             |             |             | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                  | M1          | M2          | M3          | M4          | M5          |                |
|                  | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    |                |
| G1 (CN)          | 0,15 ± 0,04 | 0,15 ± 0,07 | 0,14 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,22 ± 0,02 | 0,16           |
| G2 (NCh)         | 0,14 ± 0,04 | 0,15 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,18 ± 0,07 | 0,15           |
| G3 (NChBZ)       | 0,18 ± 0,01 | 0,14 ± 0,02 | 0,19 ± 0,08 | 0,12 ± 0,02 | 0,14 ± 0,05 | 0,15           |
| G4 (CD)          | 0,13 ± 0,02 | 0,11 ± 0,04 | 0,15 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,17 ± 0,05 | 0,14           |
| G5 (DCh)         | 0,15 ± 0,02 | 0,14 ± 0,04 | 0,11 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 | 0,12           |
| G6 (DChBZ)       | 0,16 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 | 0,11 ± 0,01 | 0,15 ± 0,08 | 0,13           |
| MÉDIA DO MOMENTO | 0,18        | 0,22        | 0,22        | 0,16        | 0,22        |                |

**8.4 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de peso do fígado, em gramas, de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos**

| GRUPO            | MOMENTOS    |             |             |             |             | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
|                  | M1          | M2          | M3          | M4          | M5          |                |
|                  | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    | MÉDIA/DP    |                |
| G1 (CN)          | 1,32 ± 0,07 | 1,32 ± 0,12 | 1,15 ± 0,16 | 1,38 ± 0,07 | 1,32 ± 0,09 | 1,30           |
| G2 (NCh)         | 1,18 ± 0,05 | 1,18 ± 0,05 | 1,27 ± 0,17 | 1,34 ± 0,23 | 1,56 ± 0,13 | 1,29           |
| G3 (NChBZ)       | 1,22 ± 0,02 | 1,42 ± 0,16 | 1,38 ± 0,07 | 1,70 ± 0,01 | 1,67 ± 0,04 | 1,48           |
| G4 (CD)          | 1,33 ± 0,45 | 1,37 ± 0,35 | 1,24 ± 0,07 | 1,12 ± 0,12 | 1,31 ± 0,10 | 1,30           |
| G5 (DCh)         | 1,06 ± 0,16 | 1,14 ± 0,05 | 1,21 ± 0,08 | 1,14 ± 0,22 | 1,64 ± 0,05 | 1,24           |
| G6 (DChBZ)       | 1,04 ± 0,23 | 1,30 ± 0,20 | 1,23 ± 0,21 | 1,17 ± 0,06 | 1,42 ± 0,14 | 1,23           |
| MÉDIA DO MOMENTO | 0,19        | 1,29        | 1,25        | 1,30        | 1,49        |                |

**8.5 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Interleucina – 1 (IL-1), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos**

| GRUPO            | MOMENTOS       |                |                |                | MÉDIA DO GRUPO |        |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|
|                  | M1             | M2             | M3             | M4             | M5             |        |
|                  | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       |        |
| G1 (CN)          | 132,00 ± 9,17  | 127,00 ± 6,56  | 125,33 ± 7,02  | 128,33 ± 4,51  | 131,67 ± 4,73  | 128,86 |
| G2 (NCh)         | 130,33 ± 11,68 | 126,00 ± 9,17  | 177,67 ± 4,73  | 205,67 ± 22,37 | 239,33 ± 3,06  | 175,80 |
| G3 (NChBZ)       | 135,00 ± 11,79 | 128,67 ± 6,03  | 137,00 ± 13,00 | 194,33 ± 28,36 | 219,33 ± 25,32 | 162,86 |
| G4 (CD)          | 142,67 ± 6,51  | 142,00 ± 9,54  | 155,33 ± 7,02  | 167,00 ± 10,54 | 193,00 ± 7,21  | 160,00 |
| G5 (DCh)         | 133,33 ± 4,04  | 168,33 ± 7,57  | 276,33 ± 5,03  | 300,67 ± 9,50  | 312,33 ± 6,81  | 238,19 |
| G6 (DChBZ)       | 129,67 ± 3,06  | 189,00 ± 18,36 | 250,00 ± 17,35 | 249,67 ± 16,20 | 242,67 ± 25,32 | 212,20 |
| MÉDIA DO MOMENTO | 133,33         | 146,83         | 186,94         | 207,61         | 223,05         |        |

**8.6 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Interleucina – 6 (IL-6), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos**

| GRUPO            | MOMENTOS       |                |                |                |                | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                  | M1             | M2             | M3             | M4             | M5             |                |
|                  | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       |                |
| G1 (CN)          | 162,33 ± 11,24 | 153,67 ± 2,08  | 156,00 ± 7,21  | 154,67 ± 6,43  | 162,67 ± 5,03  | 157,86         |
| G2 (NCh)         | 157,67 ± 3,79  | 186,33 ± 4,04  | 231,33 ± 4,51  | 342,67 ± 7,02  | 371,00 ± 9,54  | 257,80         |
| G3 (NChBZ)       | 165,33 ± 7,02  | 185,33 ± 7,57  | 179,67 ± 6,03  | 189,67 ± 15,18 | 187,00 ± 13,53 | 181,40         |
| G4 (CD)          | 183,00 ± 5,57  | 184,67 ± 4,51  | 216,33 ± 15,01 | 224,67 ± 6,81  | 251,33 ± 13,43 | 212,00         |
| G5 (DCh)         | 184,33 ± 6,66  | 230,00 ± 12,00 | 284,33 ± 6,51  | 384,00 ± 8,89  | 421,67 ± 5,51  | 300,86         |
| G6 (DChBZ)       | 183,33 ± 3,06  | 180,00 ± 3,61  | 209,67 ± 10,50 | 201,67 ± 11,93 | 173,00 ± 9,85  | 189,53         |
| MÉDIA DO MOMENTO | 172,66         | 186,66         | 212,88         | 249,55         | 261,11         |                |

8.7 Tabela com distribuição das médias e desvios padrões dos valores de Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), de camundongos Balb/c, de acordo com os seis grupos de estudo e momentos

| GRUPO            | MOMENTOS       |                |                |                |                | MÉDIA DO GRUPO |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                  | M1             | M2             | M3             | M4             | M5             |                |
|                  | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       | MÉDIA/DP       |                |
| G1 (CN)          | 213,00 ± 6,08  | 220,00 ± 9,17  | 197,00 ± 11,79 | 204,67 ± 6,11  | 240,33 ± 42,19 | 215,00         |
| G2 (NCh)         | 204,67 ± 16,65 | 225,67 ± 7,09  | 282,00 ± 12,29 | 346,67 ± 6,11  | 375,33 ± 13,05 | 286,86         |
| G3 (NChBZ)       | 205,00 ± 6,56  | 225,67 ± 17,04 | 233,33 ± 7,77  | 282,33 ± 11,06 | 282,67 ± 6,43  | 245,80         |
| G4 (CD)          | 226,00 ± 8,19  | 226,33 ± 12,74 | 225,67 ± 13,05 | 345,67 ± 17,62 | 353,00 ± 9,85  | 275,33         |
| G5 (DCh)         | 210,67 ± 3,06  | 247,33 ± 4,73  | 378,33 ± 3,79  | 409,00 ± 7,00  | 484,67 ± 7,77  | 346,00         |
| G6 (DChBZ)       | 216,00 ± 8,19  | 208,00 ± 2,65  | 332,33 ± 6,81  | 331,33 ± 6,81  | 333,33 ± 6,81  | 284,19         |
| MÉDIA DO MOMENTO | 212,55         | 225,50         | 274,77         | 319,94         | 344,88         |                |

