UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

E ENGENHARIAS - CCAE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MAIARA BIANCHINI NARDE

IMPACTOS IMUNOMODULATÓRIOS DA ARGININA NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* NO MODELO MURINO

ALEGRE-ES

2017

MAIARA BIANCHINI NARDE

IMPACTOS IMUNOMODULATÓRIOS DA ARGININA NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi* NO MODELO MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias – CCAE da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª: Fabiane Matos dos Santos.
Co-Orientador: Prof. Dr.: Marcos Santos Zanini.

ALEGRE-ES
2017

MAIARA BIANCHINI NARDE

IMPACTOS IMUNOMODULATÓRIOS DA ARGININA NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* NO MODELO MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovada em 19 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.ª Dr.ª Fabiane Matos dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador

Prof. Dr. Francisco de Paula Careta
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.ª Dr.ª Fabiana Dayse Magalhães Siman
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades concedidas e por me capacitar a conseguir realiza-las.

À minha família, pelo apoio e incentivo constantes, em especial meus pais.

Aos meus amigos, de longe e de perto, por todos os momentos de parceria vividos e apoio incondicional nas horas difíceis.

Aos colegas de projeto Germano e Elisa, que se tornaram amigos da vida, por todos os momentos compartilhados e ajuda sem igual no laboratório, melhor equipe não poderia existir!

As Republicas Só Fadinhas e Bicho do Mato, por se tornarem meu lar longe de casa! Onde cultivei amizades para todo o sempre.

A minha orientadora Fabiane por todo conhecimento compartilhado e oportunidades concedidas.

Aos professores Maria Terezinha Bahia e Wanderson Geraldo de Lima, e demais membros de seus respectivos laboratórios, por terem me aberto a porta de seus laboratórios e me ensinado tanto!

A CAPES e FAPES por todo apoio financeiro concedido.

Alexandre Beck, 2015.

RESUMO

NARDE, MAIARA BIANCHINI. **Impactos imunomodulatórios da arginina na evolução da infecção experimental pelo** *Trypanosoma cruzi* **no modelo murino**.2017. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

A doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é considerada uma importante doença parasitária tropical negligenciada, caracterizada principalmente como uma infecção crônica e sistêmica. Não existe ainda nenhum fármaco adequado e eficaz para o seu tratamento. Os fármacos nitro-heterocíclicos nifurtimox e benznidazol são os medicamentos de primeira linha disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, porém, ambos apresentam grandes limitações. Neste sentido, um nutriente imunomodulador para melhorar o combate do *T. cruzi* pelo sistema imunológico do hospedeiro poderia ser útil em abordagens quimioterápicas da doença de Chagas. Assim, os efeitos da suplementação com arginina durante o estágio agudo da infecção foram avaliados em camundongos *Swiss* infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Um total de 24 camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: 6 animais infectados com *T. cruzi* e suplementados com arginina durante a fase aguda; 6 infectados e não foram suplementados; 6 animais controles não infectados e suplementados com arginina e 6 animais infectados e não suplementados. A eficácia da arginina foi diariamente avaliada pela detecção de parasitos no sangue durante todo o estágio agudo da infecção, que corresponde do 4º dia de infecção até 10 dias após a negativação (51º dia de infecção). Os efeitos da arginina sobre a resposta imune frente a infecção com *T. cruzi* foram avaliados quanto ao desfecho do dano ao tecido cardíaco e aos níveis séricos de óxido nítrico e fator de necrose tumoral-α. A arginina foi eficaz na redução do número de parasitos circulantes e na amenização da resposta inflamatória visualizada pelos níveis séricos mais baixos de fator de necrose tumoral-α em aproximadamente 10% a menos no grupo suplementado. A contagem de células inflamatórias miocárdicas foi maior entre os animais infectados, sendo que o grupo infectado e suplementado apresentou 3% menos células inflamatórias quando

comparado ao grupo não suplementado. Não houve diferenças nos níveis de óxido nítrico e de colágenos tipo I e III quantificados no miocárdio, embora os teores de óxido nítrico tenham sido correlacionados com os teores de colágeno III, ou colágeno novo. Entretanto, o grupo suplementado e infectado apresentou 127,5% mais colágeno do tipo III em detrimento aos demais grupos, que apresentaram mais colágeno tipo I. Esses achados sugerem os benefícios da arginina na resposta imune direcionada ao controle parasitário na infecção pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: Arginina. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

NARDE, MAIARA BIANCHINI. **Impactos imunomodulatórios da arginina na evolução da infecção experimental pelo** *Trypanosoma cruzi* **no modelo murino**.2017. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2017.

Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is considered an important neglected tropical parasitic disease, characterized mainly as a chronic and systemic infection. There is as yet no suitable and effective drug for its treatment. Nitro-heterocyclic drugs nifurtimox and benznidazole are the first-line drugs available for the treatment of Chagas disease, but both have great limitations. In this sense, an immunomodulatory nutrient to improve *T. cruzi* combat by the host immune system could be useful in chemotherapeutic approaches to Chagas' disease. Thus, the effects of arginine supplementation during the acute stage of infection were evaluated in *Swiss* mice infected with the *T. cruzi* strain Berenice-78. A total of 24 mice were divided into four experimental groups: 6 animals infected with *T. cruzi* and supplemented with arginine during the acute phase; 6 infected and were not supplemented; 6 uninfected control animals supplemented with arginine and 6 infected and non-supplemented animals. Arginine efficacy was evaluated daily by the detection of parasites in the blood during the acute stage of infection, which corresponds from the 4th day of infection to 10 days after the infection (51st day of infection). The effects of arginine on the immune response to infection with *T. cruzi* were evaluated for the outcome of cardiac tissue damage and serum levels of nitric oxide and tumor necrosis factor-α. Arginine was effective in reducing the number of circulating parasites and alleviating the inflammatory response visualized by the lower serum levels of tumor necrosis factor-α by approximately 10% less in the supplemented group. Myocardial inflammatory cell counts were higher among infected animals, and the infected and supplemented group presented 3% fewer inflammatory cells when compared to the non-supplemented group. There were no differences in levels of nitric oxide and type I and III collagen quantified in the myocardium, although nitric oxide levels were correlated with levels of collagen III, or

new collagen. However, the supplemented and infected group had 127.5% more type III collagen, in detriment to the other groups, which presented more type I collagen. These findings suggest the benefits of arginine in the immune response directed to parasitic control in *T. cruzi* infection.

Keywords: Arginine. Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas médias de parasitemia obtidas dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (Arginina) ou não suplementados com arginina durante a fase aguda da infecção (Não Suplementado).....422

Gráfico 2 - Áreas sob as curvas de parasitemias individuais obtidas dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns).....42

Gráfico 3 - Avaliação quantitativa dos níveis de óxido nítrico mensurados no soro obtido dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no soro extraído dos animais dos grupos controles não infectados suplementado com arginina (NI-Ar) e não suplementado (NI-Ns). Letras iguais indicam diferença não significativa entre os grupos (*p>0,05*).....43

Gráfico 4 - Avaliação quantitativa dos níveis de citocina TNF- alfa mensurados no soro obtido dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no soro extraído dos animais dos grupos controles não infectados suplementado com arginina (NI-Ar) e não suplementado (NI-Ns).....44

Gráfico 5 - Celularidade no miocárdio de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados que foram suplementados com arginina (NI-Ar) e não suplementados (NI-Ns).....45

Gráfico 6 - Quantificação das áreas de colágeno tipo I (antigo) e de colágeno tipo III (novo) no miocárdio de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns).....47

Gráfico 7 – Correlação entre níveis séricos de óxido nítrico e fibrose nos camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns).....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Envolvimento das citocinas e óxido nítrico na patogenia da doença de Chagas.....29

Figura 2 – Reação da síntese de Óxido Nítrico catalisada pela Óxido Nítrico sintase.....31

Figura 3 – Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados e suplementados (NI-Ar) ou não com arginina (NI-Ns). **A:** NI-Ar (animal não infectado e suplementado com arginina); **B:** NI-Ns (animal não infectado e não suplementado); **C:** IF- Ar (animal infectado e suplementado com arginina); **D:** IF-Ns (animal infectado e não suplementado com arginina).....46

Figura 4 – Fotomicrografias de colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde) corados por *Picrosirius red* em cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados e suplementados (NI-Ar) ou não com arginina (NI-Ns). **A:** NI-Ar (animal não infectado e suplementado com arginina); **B:** NI-Ns (animal não infectado e não suplementado); **C:** IF- Ar (animal infectado e suplementado com arginina); **D:** IF-Ns (animal infectado e não suplementado).....48

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

AS - Argininosuccinato

BZ - Benznidazol

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNDi - Iniciativa de Desenvolvimento dos Medicamentos para Doenças Negligenciadas

ECG - Eletrocardiograma

IF-Ar – Animais infectados suplementados com arginina

IF-Ns - Animais infectados não suplementados com arginina

IFN-γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

iONS ou ONS2- Óxido nítrico sintase induzível

LPS - Lipopolissacárido

NFX - Nifurtimox

NI-Ar - Animais não infectados e suplementados com arginina

NI-Ns – Animais não infectados e não suplementados com arginina

NO - Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

OMS - Organização Mundial da Saúde

P. lutzi - *Pastrongylus lutzi*

P. megistus - *Panstrongylus megistus*

PCDCh -Programa de Controle da Doença de Chagas

SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

T. infestans - *Triatoma infestans*

T. pseudomaculata - *Triatoma pseudomaculata*

T. sordida - *Triatoma sordida*

TNF-α - Fator de necrose tumoral-alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição dos padrões de avaliação de Óxido Nítrico 35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISAO DE LITERATURA 19

2.1 A DOENÇA DE CHAGAS 19
2.2 QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS 24
2.3 ÓXIDO NÍTRICO E ARGININA NA RESPOSTA IMUNE DA DOENÇA DE CHAGAS 29

3. MATERIAL E MÉTODOS 33

3.1 CEPA DO *TRYPANOSOMA CRUZI* 33
3.2 ANIMAIS, SUPLEMENTAÇÃO E INFECÇÃO 33
3.3 PARASITEMIA 34
3.4 AVALIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO 34
3.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO MUSCULAR CARDÍACO 36
3.5.1 Preparação das amostras e Confecção das lâminas histológicas 36
3.5.2 Coloração das lâminas histológicas 37
3.5.3 Montagem 37
3.5.4 Fotografia das lâminas 37
3.5.5 Contagem de células inflamatórias 38
3.5.6 Aferição do colágeno 38
3.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO CELULAR E INFLAMATÓRIO 39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 40

4. RESULTADOS 41

5. DISCUSSÕES 49

6. CONCLUSÕES 56

7. REFERÊNCIAS 57

ANEXO 64

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma protozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberto em 1909 pelo pesquisador Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). É caracterizada por ser uma infecção principalmente crônica e sistêmica, de ampla distribuição geográfica, que atinge milhões de pessoas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença de Chagas é classificada como uma doença negligenciada, apresentando-se como um importante problema social e econômico em diversos países da América Latina (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010; MARTINS-MELO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016).

É uma doença transmitida principalmente por meio de um vetor, insetos hematófagos da subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros. Essa transmissão ocorre quando as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito estão presentes nas fezes de triatomíneos infectados e alcançam o organismo do hospedeiro vertebrado através da pele desgastada na área da picada do triatomíneo, mucosas oral ou nasal, ou até mesmo na conjuntiva do hospedeiro mamífero (DÍAZ-ALBITER et al., 2016). O controle dos vetores é um dos principais métodos utilizados para evitar a transmissão do *T. cruzi*, uma vez que não há nenhuma vacina disponível para prevenir a infecção e os medicamentos disponíveis não são eficazes para a total cura da doença, principalmente na fase crônica (DIAS et al., 2016a).

Embora uma das principais e mais conhecida via de transmissão da doença de Chagas seja a vetorial, o *T. cruzi* também pode ser transmitido ao homem por mecanismos não vetoriais, como transfusão de sangue, transmissão vertical de mãe para filho, acidentes em laboratórios que lidam com parasitos vivos, além da ingestão de alimentos e líquidos contaminados, sendo esta considerada a principal forma de transmissão atual (BRASIL et al., 2016; DIAS et al., 2016b; DÍAZ-ALBITER et al., 2016).

A doença de Chagas vem ganhando destaque no cenário mundial, principalmente países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá, além de países europeus, como Espanha, França, Reino Unido, entre outros, isso devido a sua expansão associada principalmente à transmissão por transfusão de sangue

contaminado pelo *T. cruzi* originado de latino-americanos que migraram para outros continentes, sendo importante ressaltar que o tratamento para tal enfermidade se encontra ainda muito limitado (BRASIL et al., 2016). A quimioterapia para doença de Chagas é restrita a dois medicamentos, o benznidazol (BZ) e nifurtimox (NFX), ambos contêm um grupo nitro ligados, respectivamente, a um imidazol ou um anel furano. No Brasil, apenas o BZ é utilizado como fármaco tripanocida em uso clínico para esta patologia. Porém, tanto o BZ quanto o NFX não apresentam elevados níveis de cura no paciente tratado durante a fase crônica da infecção, além de ser comumente registrada a ocorrência de uma série de efeitos colaterais (SATHLER-AVELAR et al., 2012; TROCHINE et al., 2014). Na fase aguda da infecção, o tratamento com BZ é capaz de curar cerca de 60% dos pacientes, porém, durante a fase crônica esse número não excede 20 a 30%. Além disso, o tratamento é longo e relativamente ineficaz contra determinadas estirpes ou cepas do *T. cruzi* (SESTI-COSTA et al., 2014).

Esse quadro demonstra a necessidade de novos estudos para descoberta de fármacos mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas, de modo a possibilitar a ocorrência de completa cura parasitológica, ou pelo menos uma melhor evolução no prognóstico clínico, quando a total eliminação parasitológica ainda não for possível em todos os estágios da infecção.

Nesse contexto, observa-se que a arginina é um nutriente que pode ser considerado como imunomodulador por estar envolvida no processo de produção de óxido nítrico. O radical óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula que possui múltiplas atividades biológicas contra infecções por parasitos. Embora o papel do NO na doença de Chagas ainda necessite de maiores elucidações, alguns investigadores já demonstraram que os níveis de NO aumentam durante a fase aguda da infecção, como possível mecanismo efetor da resposta imune do hospedeiro vertebrado para a destruição do *T. cruzi* (GONZALEZ-MEJIA et al., 2014).

Diante disso, é interessante a busca por nutrientes imunomoduladores, que estimulariam a resposta imune do hospedeiro, melhorando o prognóstico do paciente na fase crônica, principalmente em casos de complicações cardíacas. Para tanto, procurou-se estudar os impactos da arginina sobre a infecção chagásica, avaliando seus efeitos imunomodulatórios na resposta imune do hospedeiro e sua possível utilização como um suplemento nutricional imunomodulador para estimular

a resposta imune à resolução ou à evolução de um melhor prognóstico cardíaco na infecção pelo *T. cruzi*.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma zoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberto em 1909 (CHAGAS, 1909). A doença de Chagas humana se caracteriza por ser uma infecção principalmente crônica e sistêmica, de ampla distribuição geográfica com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), alcançando uma taxa de mortalidade anual de cerca de 14.000 indivíduos. Estimativas recentes apontam para 2.000.000 a 3.000.000 de pessoas infectadas no Brasil, com cerca de 6.000 mortes por ano (MARTINS-MELO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016).

Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, a doença de Chagas tem sido um flagelo para a humanidade desde a antiguidade, e continua a ser um relevante problema social e econômico em muitos países da América Latina. Achados de paleoparasitologia, estudos em que se recuperaram DNA do *T. cruzi* em múmias humanas, revelaram que a doença de Chagas tem infligido o homem tão cedo quanto 9.000 anos atrás (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Desde a sua descoberta, a doença de Chagas tem sido claramente incriminada como uma doença transmitida por vetor. Ela é transmitida aos seres humanos e mais de 150 espécies de mamíferos domésticos (por exemplo, cães, gatos e cobaias) e mamíferos selvagens (por exemplo, roedores, marsupiais e tatus), principalmente por insetos hematófagos da subfamília Triatominae que contextualizam a existência de três ciclos sobrepostos: doméstico, peridoméstico e silvestre. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos já tenham sido identificadas, apenas uma parte são consideradas vetores competentes para o *T. cruzi* por apresentarem principalmente uma boa capacidade de domiciliação e preferências antropofílicas no ciclo doméstico e no peridomicílio. Dentre estes, historicamente o *Triatoma infestans* se destaca como o mais importante vetor, e o principal vetor nas regiões endêmicas sub-amazônicas, ao sul da América do Sul (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; DÍAZ-ALBITER et al., 2016).

O controle das populações de vetores é um dos métodos mais utilizados para evitar a transmissão do *T. cruzi*, uma vez que não existe nenhuma vacina disponível para prevenir a infecção e ainda não há medicamento eficaz para a cura da infecção, principalmente durante a fase crônica da doença de Chagas. Neste sentido, o principal método utilizado para combater a doença de Chagas no Brasil foi através da garantia de que o inseto não estaria presente nas residências. Esta orientação foi parte de uma campanha nacional lançada na década de 1950, que alcançou toda a área endêmica em meados da década de 1980 através do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), que foi coordenado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) (DIAS et al., 2016a). O PCDCh seguiu o modelo utilizado na Campanha de Erradicação da Malária que foi estruturado em três fases principais: identificar as áreas afetadas e obter informações sobre os insetos triatomíneos, a luta contra os insetos no ambiente residencial e implementação de vigilância e monitoramento da situação entomológica (DIAS et al., 2016a). O desenvolvimento de programas de controle do vetor também resultou em uma drástica redução de novos casos da transmissão vetorial do *T. cruzi* em países endêmicos do cone sul e entre esses o Brasil, que em 2006 conseguiu interromper a transmissão vetorial nos 16 estados endêmicos do país nos quais a incidência do *T. cruzi* podia ser associada à presença do *T. infestans* (MONCAYO, 2003; MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

No entanto, na última década uma série de eventos relevantes têm sido verificados, como re-infestações de casas anteriormente tratadas com inseticidas por populações de triatomíneos silvestres na Bolívia, Colômbia e Venezuela (DÍAZ-ALBITER et al., 2016). De modo similar, no Brasil os relatórios da presença de triatomíneos autóctones em domicílios de áreas urbanas têm aumentado nos últimos anos, com elevação da importância epidemiológica do *Triatoma sordida* por sua tendência a invadir casas, particularmente em áreas onde o *T. infestans* foi controlado (DIAS et al., 2016b; PESSOA et al., 2016). A existência de habitações cujas condições físicas podem favorecer à presença de triatomíneos, mantém o risco de domiciliação de espécies silvestres, aumentando assim o risco de infecção por transmissão vetorial (SILVEIRA et al., 2016). Espécies de triatomíneos nativos ou silvestres são continuamente observadas a invadir e colonizar ambientes artificiais. A expansão das áreas habitadas por seres humanos, incluindo cidades, pode perturbar locais onde os ciclos naturais do *T. cruzi* ocorrem, permitindo a

domiciliação de triatomíneos silvestres, e também a manutenção de reservatórios sinantrópicos perto de habitações. Neste contexto, atualmente no Brasil quatro espécies de triatomíneos merecem atenção especial na transmissão do *T. cruzi* aos seres humanos: *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (PESSOA et al., 2016).

Estudos realizados para melhor compreensão da distribuição geográfica das espécies vetoras no Brasil, revelam que no Rio Grande do Sul (localizado na parte sul do país), os triatomíneos mais comuns são o *Triatoma circummaculata* e o *Triatoma rubrovaria*; em Minas Gerais (localizada na região sudeste), o mais comum é o *P. megistus* e o *T. sordida* (SILVEIRA et al., 2016). Por sua vez, o nordeste brasileiro é uma região que precisa de atenção especial em relação à doença de Chagas e a presença de vetores no seu território. Já se sabe que o nordeste do Brasil é considerado a região mais importante para a tripanossomíase americana, onde espécies nativas de triatomíneos são muito difundidas, e particularmente no estado da Bahia encontra-se a maior diversidade de espécies de triatomíneos do país. No estado de Pernambuco, as espécies com maior incidência são *T. pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis* e o *Pastrongylus lutzi*. No Ceará as espécies encontradas são *P. lutzi*, *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis* e *Rhodnius nasutus*. Na Bahia, as espécies mais frequentes são o *T. sordida, Triatoma sherlocki, Triatoma lenti, Triatoma tibiamaculata, Pastrongylus geniculatus* e *T. pseudomaculata.* Em algumas regiões da Bahia pode ser ainda encontrado o *T. infestans*, um dos principais vetores da doença de Chagas (BARBOSA-SILVA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016).

Embora a erradicação de vetores seja pouco prática, programas de controle dos mesmos mostraram eficácia cada vez maior, e isso é representado pela diminuição do número de soroprevalência da doença de Chagas no Brasil ao longo dos anos. Em um estudo realizado entre 1975 (ano em que teve início o programa de controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no país) a 1981, observou-se soroprevalência de 8,8% nos estados do sul e sudeste, como o Rio Grande do Sul e Minas Gerais, e 5,4% na Bahia. Em outro estudo no Brasil, foi observada uma diminuição significativa no percentual de soroprevalência de 2001 a 2008 entre crianças na faixa etária de 0 a 5 anos de idade. Neste estudo os autores apontaram que a taxa de infecção atual, com incidência de novos casos de soroprevalência positiva, foi de 0,03% (SILVEIRA et al., 2016).

Embora a via de transmissão do *T. cruzi* vetorial seja considerada uma das principais, sendo a segunda maior responsável pelos casos de infecção humana no Brasil (DIAS et al., 2016b), a doença de Chagas pode ser transmitida ao homem por mecanismos não vetoriais, tais como transfusão de sangue e transmissão vertical de mãe para filho. O risco de aquisição da doença de Chagas, após transfusão de uma unidade de sangue a partir de um doador infectado é inferior a 10-20%, e depende de vários fatores, incluindo a concentração de parasitos no sangue do doador, o componente do sangue transfundido, e, talvez, a cepa do parasito (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Por sua vez, o risco de transmissão vertical apresenta ocorrência mais rara e tem sido em muito atribuído à genética do parasito pelas grandes divergências regionais verificadas em áreas endêmicas do continente americano (LUQUETTI et al., 2015).

A doença de Chagas está cada vez mais sob controle na América Latina, mas está se disseminando com a migração de latino-americanos. A carga criada pela infecção chagásica é atualmente similar ou superior à de outras doenças globalmente importantes. Vários países em que a doença de Chagas não foi considerada como sendo endêmica até a década de 1990, estão identificando casos positivos entre os imigrantes e transmissões pontuais principalmente mediante transfusões sanguíneas, sendo que transmissões até mesmo por transplantes de órgãos já foram notificadas (BRASIL et al., 2016).

Entre outros mecanismos de transmissão da doença de Chagas, encontra-se a ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com *T. cruzi*, e ainda mais raramente a transmissão a partir de acidentes em laboratórios que lidam com parasitos vivos. A doença de Chagas transmitida oralmente é geralmente responsável por surtos regionais de infecção aguda em áreas geralmente providas de domicílios com elevada presença de insetos vetores. Surtos em diferentes regiões do Brasil, Colômbia e Venezuela já foram atribuídos à infecção oral associada com o consumo de alimentos contaminados, principalmente de origem vegetal, como a cana-de-açúcar e frutas, como goiaba e açaí. Em 2008, em Ibipitanga-Paraná, Brasil, transmissões orais da doença de Chagas ocorreram a partir da ingestão de caldos de cana-de-açúcar preparados em uma usina de açúcar abandonada, onde espécimes de *T. sordida* contaminados com *T. cruzi* foram capturados. Ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana-de-açúcar, o suco da fruta açaí, ou carne crua são geralmente associados com infestação

parasitária maciça, resultando em manifestações clínicas mais graves e uma fase aguda de alta mortalidade (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; DÍAZ-ALBITER et al., 2016; PESSOA et al., 2016).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com vários estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no mamífero hospedeiro vertebrado. As formas típicas do parasito identificadas em hospedeiros mamíferos são as formas tripomastigotas não replicativas na corrente sanguínea e as formas amastigotas intracelulares replicativas, enquanto que formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas infectantes são as formas evolutivas verificadas no vetor triatomíneo (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Durante a fase aguda da doença de Chagas humana, todos os tipos de células nucleadas no hospedeiro humano são alvos potenciais para a infecção. Com o desenvolvimento da resposta imunitária, a parasitemia é reduzida e o número de parasitos nos tecidos também pode diminuir substancialmente, sinalizando o fim da fase aguda. Esta fase da infecção dura em média 4-8 semanas, e esta é seguida pela fase crônica ao longo do tempo de vida do hospedeiro. A fase aguda é geralmente assintomática ou pode apresentar-se como uma doença febril auto-limitada. Os sintomas, quando presentes, aparecem geralmente 1-2 semanas após a exposição aos triatomíneos infectados, ou até alguns meses após a transfusão de sangue infectado. Mais raramente na fase aguda, em menos de 5-10% dos casos sintomáticos, pode ser verificada a ocorrência de morte como um resultado de miocardite grave e/ou meningoencefalite. No entanto, uma vez que o parasito não é completamente eliminado, a infecção de tecidos específicos, tais como músculo ou gânglio entérico, persiste indefinidamente no decorrer da vida do hospedeiro (CANÇADO, 2002; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Em geral, as manifestações sintomatológicas da doença aguda, quando presentes evoluem para resolução espontânea em cerca de 90% dos indivíduos infectados, mesmo se a infecção não for tratada com fármacos tripanocidas específicos. Por sua vez, aproximadamente 60-70% dos pacientes assintomáticos na fase aguda nunca desenvolvem a doença clinicamente e na fase crônica apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas, que é caracterizada pela positividade para anticorpos contra *T. cruzi* em soro, mas eletrocardiogramas normais, e exames radiológicos do peito, do esôfago e do cólon normais. Os demais pacientes infectados, aproximadamente 30-40%, irão desenvolver, geralmente 10-30

anos após a infecção inicial, uma das formas determinadas características da fase crônica, ou seja, a forma cardíaca (evolução da cardiopatia chagásica crônica), a forma digestiva (evolução de megaesôfago e/ou megacólon) ou mais raramente a forma mista cardiodigestiva (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Aproximadamente 14.000 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* morrem anualmente e o envolvimento cardíaco na fase crônica da infecção representa a principal causa de mortalidade entre os pacientes chagásicos (SCHMUNIS; YADON, 2010; GUARIENTO et al., 2011). As anormalidades miocárdicas observadas na fase crônica são extremamente variáveis, sendo verificadas desde formas leves, como aneurismas apicais e anormalidades somente da função diastólica do ventrículo esquerdo, a dilatações significativas das câmaras cardíacas juntamente com grave disfunção sistólica (HSU et al., 2016; MARIN-NETO et al., 2009; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Os mecanismos imunopatológicos envolvidos nesse processo ainda necessitam ser mais bem elucidados e podem ser decisivos para melhor explicar as divergências na evolução clínica dos pacientes na fase crônica da infecção, inclusive aquelas diferenças verificadas em uma mesma forma determinada, como os diferentes achados clínicos da forma cardíaca.

2.2 Quimioterapia da doença de Chagas

A quimioterapia específica é recomendada para o tratamento da doença de Chagas principalmente quando o tratamento é iniciado mais cedo, pois na fase aguda da infecção são maiores as chances de cura parasitológica e consequentes benefícios clínicos para o hospedeiro. Desde 1970 até os dias atuais a quimioterapia para doença de Chagas é restrita a dois medicamentos, o benznidazol (BZ) e nifurtimox (NFX), os quais contêm um grupo nitro ligados respectivamente a um imidazol e a um anel furano. O BZ apresenta um melhor perfil de segurança e eficácia, e, portanto, é usado como tratamento de primeira linha (SATHLER-AVELAR et al., 2012; TROCHINE et al., 2014).

O NFX é encontrado na forma de comprimidos contendo 150 mg de princípio ativo. A dose recomendada é de 15 mg / kg / dia em crianças ou casos agudos, e 10 a 80 mg / kg / dia em adultos, durante 60 dias consecutivos de tratamento. A dose oral diária é dividida em três vezes (ANDRADE et al., 2011).

O BZ é encontrado como comprimidos de 100 mg de princípio ativo. A dose recomendada é de 10 mg / kg / dia em crianças ou casos agudos, e 05 mg / kg / dia em casos crônicos, durante 60 dias consecutivos, divididos em duas doses diárias. A dose diária máxima recomendada é de 300 mg. Para adultos com peso superior a 60 kg, a dose total esperada deve ser calculada, podendo o tempo de tratamento ser estendido para além de 60 dias. Assim, os pacientes com um peso de 65 kg podem receber 300 mg por dia durante 65 dias, e os pacientes com um peso de 70 kg recebem esta dose diária durante 70 dias, num máximo de 300 mg (ANDRADE et al., 2011).

No Brasil, o NFX encontra-se com utilização descontinuada, devido a suas taxas de curas menores e maior número de efeitos colaterais quando comparado ao BZ, sendo apenas este último, utilizado para o tratamento etiológico da doença de Chagas com maior proporção de eficácia tripanocida observada durante a fase aguda, na infecção congênita e na fase crônica recente. Apesar dos baixos níveis de cura observados na maioria dos pacientes submetidos ao tratamento durante a doença de Chagas crônica, alguns estudos têm sugerido que o tratamento com BZ deve ainda ser recomendado durante a doença de Chagas crônica, uma vez que poderá limitar a progressão da doença, independentemente da falta de depuração completa do parasito (SATHLER-AVELAR et al., 2012).

Um dos principais fatores que podem influenciar o potencial de depuração do parasito, bem como o controle da morbidade após o tratamento para a doença de Chagas, é a ação cooperativa entre os efeitos do fármaco e a resposta imunológica hospedeira (SATHLER-AVELAR et al., 2012). Estudos utilizando modelos experimentais de infecção aguda demonstraram que a atividade antiparasitária do BZ envolve a participação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interleucina (IL) -12, bem como modificações covalentes de macromoléculas por intermediários nitro redutores (estresse redutor) (GUEDES et al., 2010). Neste contexto, o efeito tripanocida do BZ tem sido relatado por envolver a redução de um grupo nitro a um ânion radical nitro que é capaz de se ligar covalentemente a várias macromoléculas do parasito, tal como o seu DNA, inibindo as suas funções (SESTI-COSTA et al., 2014).

Por outro lado, o NFX age por redução do grupo nitro para formar radicais nitro de ânions instáveis, que reagem para produzir metabolitos de oxigênio reduzido altamente tóxicos, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogénio

(BUSCHINI et al., 2009; GUEDES et al., 2010). Outro possível mecanismo de ação tripanocida do NFX envolve a sua capacidade para formar um metabólito radical ânion nitro que reage com os ácidos nucleicos do parasito, causando uma quebra significativa no DNA (BUSCHINI et al., 2009).

Apesar dos esforços intensos para conseguir um método aperfeiçoado de quimioterapia para o tratamento da doença de Chagas aguda, NFX e BZ continuam a ser os únicos fármacos disponíveis por mais de 50 anos para o tratamento específico da infecção humana (SATHLER-AVELAR et al., 2012; SESTI-COSTA et al., 2014; TROCHINE et al., 2014). O tratamento com BZ durante a fase aguda da doença é capaz de curar cerca de 60% dos pacientes, entretanto, isso vai depender principalmente da genética do parasito, e desse modo prevenir ou não a evolução da infecção para as manifestações clínicas da fase crônica (CANÇADO, 2002; SESTI-COSTA et al., 2014). No entanto, as taxas de cura não excedem 20 a 30% quando o BZ é administrado na fase crônica. Além disso, o tratamento é longo e relativamente ineficaz contra determinadas estirpes ou cepas do *T. cruzi* (SESTI-COSTA et al., 2014). Outra limitação relevante é o teor de efeitos colaterais que podem acarretar na interrupção do tratamento, tais como anorexia, fadiga, cefaléias, intolerância digestiva, dermatite, hepatite tóxica, depressão da medula óssea e polineurite. Todas essas limitações de eficácia e tolerância incentivam a busca por novos alvos potenciais para o desenvolvimento de melhores e definitivas opções terapêuticas (SATHLER-AVELAR et al., 2012; LEPESHEVA, 2013; SESTI-COSTA et al., 2014; TROCHINE et al., 2014).

Os resultados verificados em recente estudo clínico de quimioterapia com BZ na fase crônica demonstraram que apesar do tratamento ter reduzido significativamente a detecção do parasito em pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas estabelecida, não houve redução da deterioração cardíaca após cinco anos do tratamento (MORILLO et al., 2015). Esses dados reforçam ainda mais a necessidade de novas opções terapêuticas, que possam realmente trazer benefícios ao prognóstico clínico dos indivíduos que se encontram na fase crônica da infecção. Entre as buscas por novas opções terapêuticas encontram-se os estudos com Inibidores da Biossíntese de Ergosterol (EBIs), amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas, tais como o itraconazol, albaconazol, posaconazol, ravuconazol e fexinidazol (LEPESHEVA, 2013).

Semelhante a fungos, o *T. cruzi* é completamente dependente dos esteróis produzidos endogenamente (ergosterol e seus derivados alquilados) que são vitais para os processos de síntese de membranas do parasito, divisão celular, crescimento e desenvolvimento. Portanto, a ideia de triagem dos agentes antifúngicos existentes como potenciais medicamentos para o tratamento etiológico específico da doença de Chagas é muito razoável, especialmente porque eles já estão no mercado e são muito mais seguros do que o BZ ou NFX (LEPESHEVA, 2013).

Itraconazol, um derivado de triazol de cetoconazol foi estudado, apresentando melhores resultados. O tratamento de ratos infectados com 120 mg de itraconazol / kg / dia durante 7 - 9 semanas resultou na cura parasitológica como determinado por hemoculturas negativas, apresentando sorologia negativa para *T. cruzi* e ausência de parasitos em cortes histológicos após a conclusão da terapia. Tratamento de seres humanos com doença de Chagas crônica com itraconazol produziu cura parasitológica em 53% e normalização do eletrocardiograma (ECG) em 48% dos pacientes após quatro anos de seguimento. Além disso, em 20 anos de acompanhamento, 54,3% dos pacientes foram negativos em todos os testes parasitológicos utilizados, e 60% destes casos tinham traços de ECG normal (LEPESHEVA, 2013). Contudo, quando comparado ao BZ, o itraconazol ainda apresenta uma taxa de cura bem menor, o que não justificaria seu uso como terapia de primeira linha.

Em 2012, teve início os ensaios clínicos do posaconazol (um derivado do itraconazol) e do ravuconazol (um derivado de voriconazol) para o tratamento da doença de Chagas na Espanha, Bolívia e Argentina. O ravuconazol requer otimização adicional, uma vez que só produz efeito supressor em modelos animais da doença de Chagas, provavelmente, em grande parte devido à sua farmacocinética, particularmente com baixa biodisponibilidade. O posaconazol, que tem sido extensivamente estudado como fármaco candidato à terapia tripanocida, foi provado ser altamente potente *in vivo* contra a infecção, incluindo várias cepas nitroderivados resistentes do *T. cruzi*, é, infelizmente, muito caro devido ao seu complexo e baixo rendimento de esquema sintético e pode apresentar limitações com relação à baixa biodisponibilidade. Embora o posaconazol tenha curado um paciente com doença de Chagas crônica, o custo do paciente para o hospital foi de 8.000 euros. Em adição, não foram verificados resultados promissores, onde em um

estudo de triagem clínica com posaconazol feito por Molina et al. (2014), resultou em uma significativamente maior percentagem de insucessos de tratamento quando comparados com o tratamento com benzonidazol, apresentando uma média de 85% de positividade para presença de DNA de *T. cruzi* no exame de PCR, contra apenas 6% no grupo tratado com BZ. Neste sentido, são ainda necessárias as buscas por outros agentes que apresentem elevada eficácia tripanocida e um menor custo potencial (LEPESHEVA, 2013; MOLINA et al., 2014).

Um novo derivado de triazol, o albaconazol, têm exibido atividades *in vitro* contra o *T. cruzi* comparáveis aos dos medicamentos mais potentes testados contra este organismo, e estudos bioquímicos detalhados indicaram que o seu mecanismo de ação é devido a uma interferência específica no esterol C-14α-desmetilase do parasito. No entanto, a eficácia *in vivo* contra o *T. cruzi* requer potentes atividades antiparasitárias intrínsecas e propriedades farmacocinéticas especiais (semi-vidas terminais longas e grandes volumes de distribuição) (GUEDES et al., 2004). Em estudo realizado por Guedes et al. (2004) foi verificada a resistência da cepa Berenice-78 ao albaconazol, no entanto para cepa Y do *T. cruzi* apresentou promissor resultado.

No início dos anos 1980, o nitroimidazol fexinidazol demonstrou ter atividade contra *T. cruzi*, Tricomonas, e *Entamoeba histolytica*. Mais recentemente, a molécula foi "redescoberta" e selecionada para a iniciativa de desenvolvimento dos Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DND i) na exploração de nitroimidazois novos e antigos, como fármaco potencial para a tripanossomíase africana e doença de Chagas. Fexinidazol foi descrito anteriormente em um modelo murino de infecção aguda do *T. cruzi* com uma eficácia superior ao BZ e NFX. Mais recentemente, os estudos confirmaram que o fexinidazol é eficaz na cura experimental em infecções do *T. cruzi* em modelos experimentais nas fases aguda e crônica da infecção, incluindo as infecções experimentais com cepas do *T. cruzi* resistentes ao BZ. Em doses mais elevadas, o tratamento com fexinidazol alcançou melhores taxas de cura e prevenção da inflamação cardíaca do que o BZ. A partir desses resultados promissores nos modelos experimentais, o fexinidazol está sendo amplamente estudado como fármaco tripanocida que pode ser um grande e potencial aliado no tratamento da doença de Chagas (BAHIA et al., 2014).

Mesmo com todos esses estudos e buscas de novos fármacos, ainda não existe uma opção terapêutica eficaz à elucidação completa do parasito em todos os

estágios da doença de Chagas e que acarrete em melhorias do prognóstico clínico na fase crônica. Diante a essa limitação, poderão ser relevantes as buscas por nutrientes imunomoduladores que conduzam a uma melhor resposta imune no hospedeiro com possíveis melhoras no prognóstico das formas clínicas sintomáticas na fase crônica, principalmente a forma cardíaca.

2.3 Óxido nítrico e arginina na resposta imune da doença de Chagas

O radical óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula que possui múltiplas atividades biológicas contra infecções por parasitos, tais como esquistossomose, leishmaniose, tripanossomíase e toxoplasmose. Embora o papel do NO na doença de Chagas ainda necessite de maiores elucidações, alguns investigadores demonstraram que os níveis de NO aumentam durante a fase aguda da infecção, inibindo a progressão da doença pela destruição do *T. cruzi* (GONZALEZ-MEJIA et al., 2014).

A eliminação do parasito tem mostrado ser dependente em grande parte da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon-gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral-alpha (TNF-α) e interleucina (IL) -12, uma vez que atuam de forma combinada para ativar macrófagos que vão eliminar os parasitos intracelulares por meio da produção de NO e os seus radicais derivados de azoto e de oxigênio (Figura 1) (GUEDES et al., 2010).

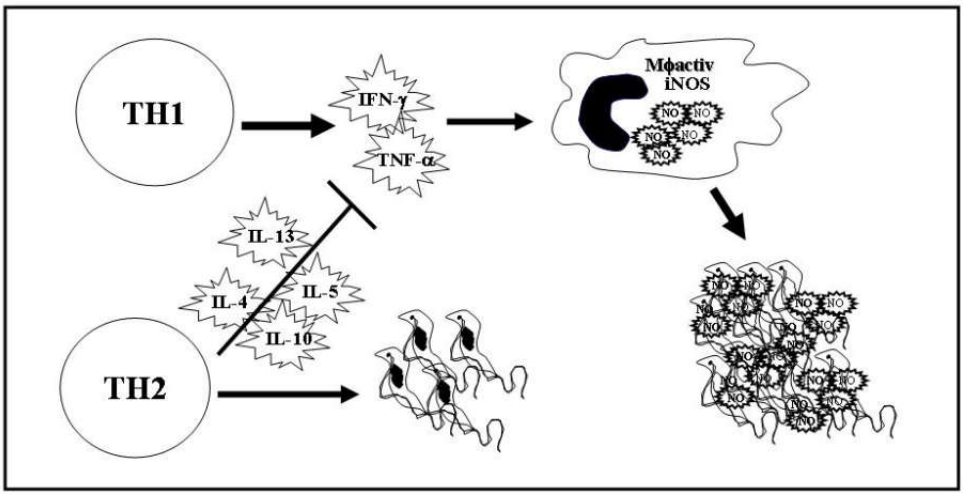

Figura 1 – Envolvimento das citocinas e óxido nítrico na patogenia da doença de Chagas.
FONTE: Pavanelli (2008).

Durante a fase aguda da doença de Chagas, o TNF-alpha isolado ou em associação com outras citocinas é proposto para o controle da replicação do parasito mediante liberação de NO por macrófagos e cardiomiócitos. No entanto, os níveis de TNF-alpha elevados em pacientes com doença de Chagas crônica podem contribuir para a lesão do tecido cardíaco e progressão da cardiomiopatia chagásica crônica. O NO é um importante fator citotóxico e citostático na imunidade mediada por células a agentes patogênicos intracelulares. No entanto, a produção excessiva de NO pode causar lesão no hospedeiro, incluindo uma redução na contractilidade do miocárdio (PEREIRA et al., 2014).

Doadores de NO mostram elevada atividade tripanocida em concentrações muito baixas, aumentando a sobrevivência de ratos tratados com BZ após infecção com *T. cruzi* (SESTI-COSTA et al., 2014).

O NO é uma molécula inicialmente caracterizada como um vasodilatador e é um produto da oxidação da L-arginina a L-citrulina por uma família de enzimas dependentes de NADPH, coletivamente conhecidas como NO sintases (NOS). A produção de NO por NOS induzível (iNOS ou NOS2) tem ações antimicrobianas, dependendo da sua concentração, e também pode interferir com a proliferação celular e a morte por apoptose. Na infecção aguda experimental com *T. cruzi*, citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ, TNF-α e vários quimioatraentes são sintetizados de forma que possam estar envolvidos indiretamente na elucidação do *T. cruzi* pela indução de iNOS. Contudo, maiores investigações sobre o papel do NO no contexto da infecção humana por *T. cruzi* ainda são necessárias. De modo semelhante, também existem dados experimentais na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos que são consistentemente sugestivos de um papel benéfico do NO para a resposta imune do hospedeiro, mas ainda não existem dados definitivos da infecção em humanos (MACHADO; TANOWITZ; TEIXEIRA, 2010).

Alguns estudos demonstraram que a resistência à infecção por *T. cruzi* está associada à capacidade dos linfócitos para gerar IFN-γ, que por sua vez podem ativar macrófagos para produzir NO, a principal molécula efetora que controla a multiplicação intracelular do *T. cruzi*. O NO é sintetizado por macrófagos que expressam a enzima NO sintase induzível (iNOS), que é induzida por IFN-γ, agindo sinergicamente com o TNF-α. Ambas citocinas consideradas pró-inflamatórias são sintetizadas durante a fase aguda da infecção pelo *T cruzi,* concomitantemente ao

aumento na concentração plasmática de nitrito, o produto final da ativação da via da L -arginina / NO (MACHADO et al., 2000).

A iNOS não é uma enzima expressa normalmente, ela é induzida por citocinas e/ou endotoxinas de várias células, principalmente do sistema imune, como os macrófagos e linfócitos T, outras células também induzem tal enzima, como as células endoteliais, condriócitos, neutrófilos, miócitos, plaquetas e hepatócitos. Sua produção pelo organismo continua indefinidamente até que seus co-fatores necessários para sua síntese, ou a L-arginina sejam completamente depletados do organismo, ou até mesmo ocorra a morte celular. A síntese de NO é dividida em duas etapas. Na primeira etapa, um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina sofre hidroxilação para formar a NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Provavelmente nesta reação o complexo heme da NOS está envolvido, onde há a utilização NADPH e oxigênio (O2). Na segunda etapa desta reação, pode-se observar a ocorrência da conversão da NHA em NO e citrulina. São utilizados como co-fatores da reação a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) (DUSSE, VIEIRA, CARVALHO, 2003).

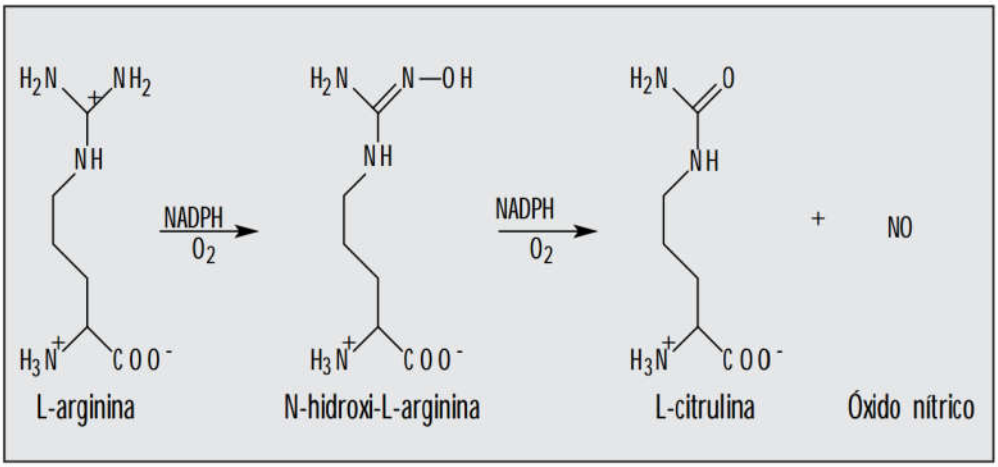

Figura 1 – Reação da síntese de óxido nítrico catalisada pela óxido nítrico sintase.
FONTE: Dusse, Vieira, Carvalho (2003).

A produção de NO ativada por macrófagos é o resultado de um aumento da expressão da isoforma indutível da óxido nítrico sintase (iNOS), a qual sintetiza NO e citrulina a partir da arginina. Uma vez que a iNOS é expressa, o nível da produção de NO é dependente, em parte, da concentração de arginina, a qual é o único doador de azoto fisiológico para a produção de NO. Alguns estudos demonstraram que níveis fisiológicos de arginina são limitantes na velocidade para a produção de

NO e que a citrulina, o subproduto da produção de NO, pode ser reciclado para arginina mediante a sintetase argininosuccinato (AS) e liase argininosuccinato, aumentando assim a arginina disponível para produção de NO por meio da expressão de iNOS. A enzima biossintética arginina sintetase e iNOS são co-induzidas após estimulação de um macrófago, células com IFN-γ ou lipopolissacárido (LPS), o que correlaciona com o aumento da atividade enzimática e produção de NO. Estes resultados analisados de forma conjunta sugerem que a produção de NO e a biossíntese de arginina são acoplados e que o aumento da arginina extracelular ou citrulina podem corroborar com o aumento da produção de NO em macrófagos (NORRIS et al., 1995). Neste sentido, a disponibilização de maior quantidade de substrato para síntese de NO, tal como a arginina, poderá acarretar em benefícios da resposta imune do hospedeiro no controle da replicação do *T. cruzi* e amenizar a evolução clínica na fase crônica da infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepa do *Trypanosoma cruzi*

A cepa Berenice-78 do *T. cruzi* que foi utilizada na infecção experimental dos animais na presente pesquisa, foi adquirida na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), no laboratório de doenças parasitárias. A cepa Berenice-78 foi isolada em amostras de sangue da paciente Berenice no Brasil em 1978 por meio de xenodiagnóstico com ninfas de *Dipetalogaster maximus*. Berenice é considerada o primeiro caso clínico de doença de Chagas humana descrito na literatura, e a cepa Berenice-78 é considerada sensível à quimioterapia com BZ. (LANA; CHIARI, 1986; VELOSO et al., 2001).

3.2 Animais, Suplementação e Infecção

Foram utilizados 24 camundongos *Swiss* fêmeas, com 21 dias de vida e peso aproximado de 20g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais: (1A) seis animais controles não infectados e suplementados com arginina; (1B) seis animais controles não infectados e não suplementados com arginina; (2A) seis animais infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e suplementados com arginina; (2B) seis animais infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e não suplementados com arginina. Os animais foram submetidos à suplementação com arginina na dose diária de 2% do valor calórico total diário, o que foi correspondente ao valor de 0,10g de arginina/dia ou 0,41 kcal provenientes da arginina (VIANA, 2010). A suplementação foi via oral aplicada por gavagem na fase aguda, do 7º ao 24º dia de infecção, em três esquemas de aplicações durante quatro dias consecutivos intercalados por três dias de intervalos entre os mesmos. O período de tempo descrito neste esquema de suplementação seguiu o modelo utilizado para imunossupressão com ciclofosfamida e consequente modulação da resposta imune descrito por Santos et al. (2008).

A infecção dos animais pelo *T. cruzi* foi realizada via intraperitoneal com um inoculo de 5×10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue.

Todos os procedimentos e protocolos foram realizados de acordo com a conduta preconizada pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foram previamente avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo nº 43/2015 (Anexo)).

3.3 Parasitemia

As formas tripomastigotas sanguíneas foram contabilizadas diariamente na fase aguda da infecção por meio da observação direta do sangue a fresco ao microscópio óptico a partir do 4º dia de infecção até 10 dias após a negativação da parasitemia para a determinação do período pré-patente, do período de patência e da curva de parasitemia. Por meio de um pequeno corte na cauda do animal, retirava-se 5μL de sangue e depositava-o sobre uma lâmina. Em seguida colocava-se uma lamínula 22x22mm por cima do sangue e procedia-se a leitura em objetiva de aumento de 40X. Percorria-se inicialmente toda a lâmina (aproximadamente 100 campos) até confirmação da infecção pelo *T. cruzi*. Uma vez confirmada a infecção, nos dias subsequentes a contagem da parasitemia seguia a técnica de Brener (1962), na qual eram mensurados 50 campos da lâmina. O valor de parasitos encontrados era posteriormente multiplicado pelo valor de correção do microscópio para determinação do total de tripomastigotas presentes em 0,1mL de sangue.

3.4 Avaliação do óxido nítrico

As amostras de soro coletadas pelo seio venoso retro-orbital aos 60 dias de infecção e armazenadas previamente em *freezer* -80°C. O kit utilizado foi o QuantiChromTM Nitric Oxide Assay Kit (D2NO-100) seguiu-se o protocolo do fabricante para sua realização (ANÔNIMO, 2010), sendo este um teste colorimétrico quantitativo de determinação de óxido nítrico.

As amostras foram homogeneizadas em PBS 1 x (PH 7,4). Centrifugou-se a 10.000 g ou superior, a 4°C. Procedeu-se então a desproteinização das amostras, misturou-se 150μL da amostra com 8μL de ZnSO4 em tubos de 1,5 mL. Agitou-se e depois adicionou-se 8μL NaOH, agitou-se novamente e centrifugou-se 10 min a 14.000 rpm. Transferiu-se 100 uL do sobrenadante claro para um tubo limpo.

Preparou-se 500 uL de uma pré-mistura a 100 uM, por meio da mistura de 50 uL de 1,0 mM de padrão e 450 mL de água destilada. Diluiu-se os padrões em tubos de centrífuga de 1,5 mL, tal como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Diluição dos padrões de avaliação de Óxido Nítrico

Número	Premix + H_2O	Nitrito (μM)
1	250 μL + 0 μL	100
2	150 μL + 100 μL	60
3	75 μL + 175 μL	30
4	0 μL + 250 μL	0

Adicionou-se 100 uL de cada amostra em microtubos rotulados. Adicionou-se 200 ul de reagente de trabalho a cada amostra e padrão do tubo e incubou-se durante 10 min a 60°C. Centrifugou-se os tubos de reação para sedimentar qualquer condensação e transferiu-se 250 uL de cada reação de separação para uma placa de 96 poços. Procedeu-se a leitura da densidade óptica em 500-570nm (pico de 540 nm).

Por meio dos padrões preparados procedeu-se a realização da curva padrão de óxido nítrico, onde, subtraiu-se a densidade óptica do branco (Nº 4) a partir dos valores de padrão e traçou-se a densidade óptica contra concentrações-padrão. Determinou-se a inclinação da reta usando regressão linear. A concentração de NO da amostra era então calculada pela da fórmula:

$$[\text{Óxido Nítrico}] = \frac{DO_{AMOSTRA} - DO_{BRANCO}}{\text{Inclinação da curva}} \quad (\mu M)$$

Sendo, $DO_{AMOSTRA}$ o valor da densidade óptica da amostra e DO_{BRANCO} o valor da densidade óptica do branco, respectivamente.

3.5 Análise morfométrica do tecido muscular cardíaco

Fragmentos do coração foram obtidos aos 90 dias de infecção, após eutanásia e necropsia dos animais. Os fragmentos do coração foram conservados em formalina 10% e processados para avaliação histológica convencional mediante as seguintes colorações: (I) Hematoxilina e Eosina para avaliação morfológica do infiltrado inflamatório e (II) Picrosirius red para o estudo de áreas de fibrose e diferenciação dos tipos de colágeno.

3.5.1 Preparação das amostras e Confecção das lâminas histológicas

O material foi colocado em álcool 70%, 80%, 90%, absoluto I (100%) e absoluto II (100%), permanecendo 40 minutos em cada, nessa respectiva ordem; posteriormente o material entrou em contato com xilol para facilitar a penetração de parafina no tecido durante o processo de inclusão. O material desidratado, então, seguiu para a fase de clareamento, onde, ficou em contato com xilol I e xilol II por 30 minutos em cada, nesta respectiva ordem. O material já clareado foi colocado em parafina líquida à temperatura de aproximadamente 60° C, onde permaneceu de um dia para o outro. No outro dia, retirou-se o material da parafina e deixou-o escorrer para retirada do excesso de parafina. Cada peça então foi colocada em um molde com parafina líquida dentro, sendo que a peça deveria ficar no centro do molde, encostando-se ao fundo do mesmo. Era sempre importante observar o lado da amostra que era colocado para baixo, pois este que viria aparecer no corte. Após isso esperava-se a parafina esfriar e consequentemente endurecer, para então desenformar a peça, que assim estava pronta para o corte.

O bloco de parafina ficou armazenado em congelador por alguns minutos, para adquirir uma consistência mais rígida, facilitando o corte. Primeiramente, o bloco deveria ser posicionado no micrótomo e era realizado o desbaste para retirar a camada superficial de parafina do bloco e alcançar o material, este corte era feito a 40µm. Posteriormente, realizou-se o corte propriamente dito. Para as lâminas foi utilizado espessura de corte de 4µm. A lasca de parafina cortada foi para a água a temperatura ambiente, onde ela se “abriu”, posteriormente foi passada para a água quente, onde a parafina se distendeu. Então, com uma lâmina coberta com clara de

ovo, já seca, “pescou-se” a lasca de parafina e a posicionou sobre a mesma. Depois desse procedimento, as lâminas foram para a estufa (60° C), onde permaneceram de um dia para o outro, para o derretimento da parafina.

3.5.2 Coloração das lâminas histológicas

Primeiramente a lâmina passava por xilol I e xilol II, por 30 minutos em cada, nessa respectiva ordem, para a retida de parafina dos tecidos. Posteriormente a lâmina passava por um processo de hidratação, onde foi colocada em álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70% e por fim água, permanecendo em cada um por 5 minutos, seguindo a ordem anteriormente descrita. Posteriormente iniciava-se a coloração.

3.5.2.1 Hematoxilina e Eosina

A lâmina permanecia em hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos, posteriormente era lavada em água corrente por 30 minutos. Após lavada a lâmina ficava em eosina por 40 segundos, seguida de nova lavagem em água para a retirada do excesso de eosina e posteriormente deixada para secar ao ar livre.

3.5.2.2 Picrosirius red

A lâmina permanecia em corante picrosirius red por uma hora, onde posteriormente era lavada em água para retirada do excesso de corante e em seguida deixada ao ar livre para secar.

3.5.3 Montagem

Com as lâminas secas e coradas, acrescentava-se uma gota de resina ao lado de cada corte a ser observado e posicionava-se a lamínula sobre a lâmina, pressionando-a, para que ocorresse o espalhamento da resina e fixação da lamínula à lâmina. Posteriormente, deixava-se a lâmina a temperatura ambiente para sua secagem e enfim o material estava pronto para ser analisado.

3.5.4 Fotografia das lâminas

Retirou-se 20 fotos de cada lâmina no aumento de 40x, no caso de células inflamatórias; para colágeno retirou-se 10 fotos de cada lâmina no aumento de 10x. Esse procedimento foi executado no microscópio Leica DM 5000 com auxílio do programa LAS (Leica Application Suite). Estas fotos foram salvas em mídias de DVD para posterior análise.

3.5.5 Contagem de células inflamatórias

Uma das análises realizadas nas fotos foi a contagem de células inflamatórias por meio do programa Leica Qwin Plus, em que 20 fotos de cada lâmina foram analisadas para estabelecimento da média de células no corte de tecido avaliado. O processo inflamatório foi avaliado com base no número de núcleos celulares quantificados no músculo miocárdico de animais não infectados e infectados. A análise seguiu os mesmos parâmetros de Santos et al. (2016), onde considerou-se que os animais infectados tinham um processo inflamatório relevante quando o número de núcleos celulares fosse maior do que o valor mediano mais um desvio padrão (DP) quantificado no Grupo não infectado.

3.5.6 Aferição do colágeno

Com diferenciação em tipo I e III, a aferição e quantificação diferenciada dos tipos de colágeno também foi realizada no programa Leica Qwin Plus, sendo analisadas 10 fotos de cada lâmina. Nas lâminas coradas pelo método de Picrosirius, é possível a evidenciação e diferenciação das fibras de colágeno por meio da microscopia de luz polarizada. As alterações nas colorações das fibras colágenas, se deve a diferença em sua birrefringência, devido a espessura e densidade das fibras de colágeno. Sendo que as fibras que se apresentam mais finas e dissociadas, representam um colágeno menos denso e mais recente, características típicas do colágeno tipo III, de coloração esverdeada, por outro lado, as fibras mais grossas, indicam um colágeno mais antigo, correspondendo ao colágeno tipo I que emite cores como vermelho e amarelo. A fibrogênese e os isotipos de colágeno I, II e IV foram examinados com luz óptica de campo brilhante (CAMARGOS, 2015; GONÇALVES, 2014). Todos os pixels com tons verdes,

amarelos e vermelhos nas secções coradas a vermelho de Picrosirius foram selecionados e a área total respectivamente ocupada por tecido conjuntivo novo, intermediário e antigo em animais não infectados e infectados com *T. cruzi* foi subsequentemente medida para calcular a quantidade de colagênos tipo I e III, ou tecidos conjuntivos antigos e novos.

Considerou-se que os camundongos infectados tinham uma área de fibrose quando a área de fibrogênio indicada principalmente por pixels verdes eram superiores ao valor mediano mais um desvio padrão (DP) quantificado no grupo não infectado. Seguindo os mesmos parâmetros de Santos et al. (2016).

3.6 Ensaio imunoenzimático celular e inflamatório

O ensaio imunoenzimático para TNF-alfa foi realizado utilizando-se o soro proveniente de cada animal provenientes de coletas de sangue previamente realizadas pelo seio venoso retro-orbital após 90 dias da infecção pelo *T. cruzi*.

De acordo com o protocolo experimental seguido, primeiramente cobriu-se a placa de ELISA com 100 µL/poço do anticorpo de captura diluído 1x em *coating buffer*. A placa foi então incubada *overnight* a 4°C. Após esse procedimento, aspirou-se os poços e lavou-os 3 vezes com >250 µL/poço de tampão de lavagem. Seguiu-se diluição 1 parte de 5x ELISA/ELISPOT diluente em 4 partes de água deionizada e posterior bloqueio dos poços com 200 µL/poço do diluente 1X ELISA/ELISPOT. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 1h e posteriormente aspirou-se e seguiu-se nova lavagem, pelo menos uma vez com tampão de lavagem. Usando o diluente 1X ELISA / ELISPOT, procedeu-se diluição dos padrões e adicionou-se 100 µL /poço da concentração padrão *top* nos poços adequados. Foram realizadas diluições seriadas (2x) das concentrações top do padrão para fazer a curva padrão com um total de 8 pontos. Foram adicionados 100 µL/poço das amostras aos poços apropriados, selada a placa e em seguida incubada à temperatura ambiente durante 2 horas (ou durante a noite a 4 ° C na sensibilidade máxima). Seguiu-se nova aspiração e lavagem conforme procedimento anterior (repetir 3-5 vezes). Foram adicionados 100 µL /poço do anticorpo de detecção ELISA diluído no diluente 1X / ELISPOT. Novamente a placa foi selada e em seguida incubada à mesma temperatura ambiente durante 1 h. Aspiração e

lavagem como feito anteriormente (repetir 3-5 vezes). Adição de 100 µL /poço de Avidina-HRP diluída no diluente 1X ELISA / ELISPOT. Novamente a placa foi selada e seguiu-se a incubação da mesma à temperatura ambiente durante 30 minutos. Aspiração e lavagem como feito anteriormente. Os poços foram deixados de molho em tampão de lavagem durante 1-2 min, antes da aspiração. Foram repetidas 3-5 lavagens. Posteriormente adicionou-se 100 µL / poço de solução 1X de TMB a cada poço e se incubou a placa à temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram adicionadas 50 µL de solução *stop* a cada poço e procedidas as leituras da placa a 450nm e em seguida a 570nm. Por fim, serão subtraídos os valores de 570nm dos de 450nm e foram realizadas as análises dos dados.

3.7 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram representados pelas médias de seus valores e respectivos erros padrão da média ou então, pelos valores absolutos com respectivas médias (gráficos de dispersão). Foi realizada uma análise de variância e quando a mesma se apresentou significativa foi seguida por um pós teste para comparação múltipla das médias de Tukey-Kramer e/ou Benferroni. A análise das áreas sob as curvas de parasitemia foi realizada pelo cálculo individual da área da curva média de parasitemia de cada camundongo individualmente, seguido pelo teste T não-pareado para comparação entre os grupos. Todas as análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism, e os testes empregados nas comparações dos grupos foram realizados ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

A infecção de todos os 12 animais inoculados com o *T. cruzi* foi confirmada por exame de sangue à fresco. Em seguida, a avaliação da influência da suplementação com arginina realizada do 7º ao 24º dia de infecção foi sendo paralelamente monitorada pela quantificação diária da parasitemia durante toda a fase aguda da infecção. O Gráfico 1 demonstra as curvas de parasitemia das médias diárias dos parasitos detectados nos grupos de animais infectados IF-Ar e IF-Ns, os quais foram submetidos ou não a suplementação com arginina. Períodos pré-patentes similares de quatro a seis dias foram respectivamente observados nos grupos IF-Ar e IF-Ns. De modo similar, períodos patentes semelhantes foram visualizados com 36 dias no grupo IF-Ar e 38 dias no grupo IF-Ns. Observou-se uma curva bastante plana mostrando níveis de parasitemia com dois picos distintos entre os animais suplementados com arginina (IF-Ar), com valores médios de 40833,3 e 57500 tripomastigotas/0,1mL de sangue no 11º e no 17º dia de infecção, respectivamente. No grupo IF-Ns foram verificados três picos distintos de parasitemia com valores médios de 60000, 86666,6 e 93333,3 tripomastigotas/0,1mL de sangue respectivamente no 11º, 22º e 23º dias de infecção. Contudo, não houve diferença estatística entre as médias diárias de tripomastigotas sanguíneos e áreas sobre as curvas médias de parasitemia observadas no Gráfico 2 entre ambos os grupos infectados, apesar do resultado promissor ($p = 0,0586$), entretanto, com um valor amostral maior, tal diferença seria possivelmente identificada, devido ao valor de p observado.

A avaliação dos efeitos da suplementação com arginina na presença ou ausência da infecção pelo *T. cruzi* sobre os níveis de produção de óxido nítrico, foi realizada pela quantificação de óxido nas amostras de soro coletados de todos os grupos de animais aos 60 dias de infecção.

Como pode ser observado nos resultados apresentados no Gráfico 3, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos. Contudo, foi possível observar que os grupos de animais suplementados com arginina apresentaram níveis séricos médios de NO iguais a 64,85±6,62 e 70,47±3,49, respectivamente nos grupos NI-Ar e IF-Ar. Por sua vez, o nível sérico médio de NO nos grupos não

suplementados com arginina, NI-Ns e IF-Ns, foi de respectivamente 63,26±6,71 e 61,99±12,20.

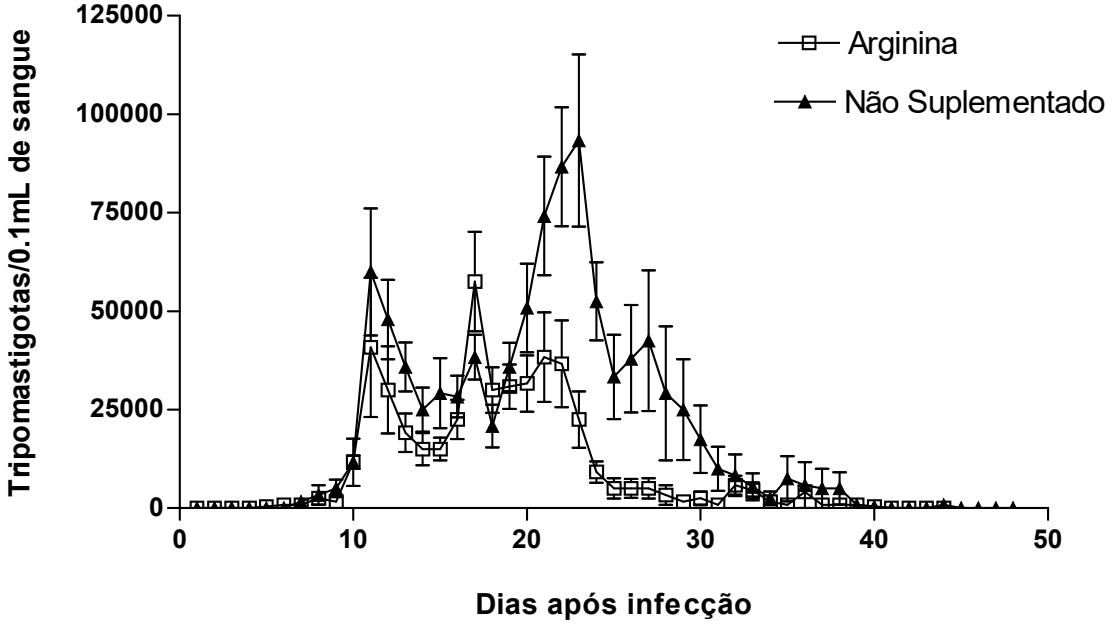

Gráfico 1 - Curvas médias de parasitemia obtidas dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (Arginina) ou não suplementados com arginina durante a fase aguda da infecção (Não Suplementado). Teste estatístico utilizado: Teste T.

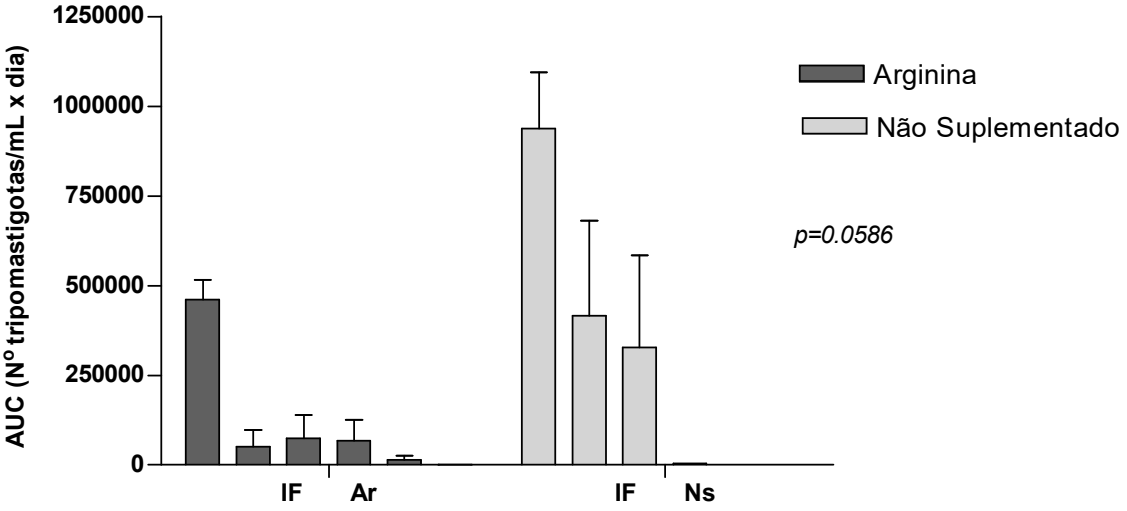

Gráfico 2 - Áreas sob as curvas de parasitemias individuais obtidas dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Utilizando Teste T não-pareado como teste estatístico.

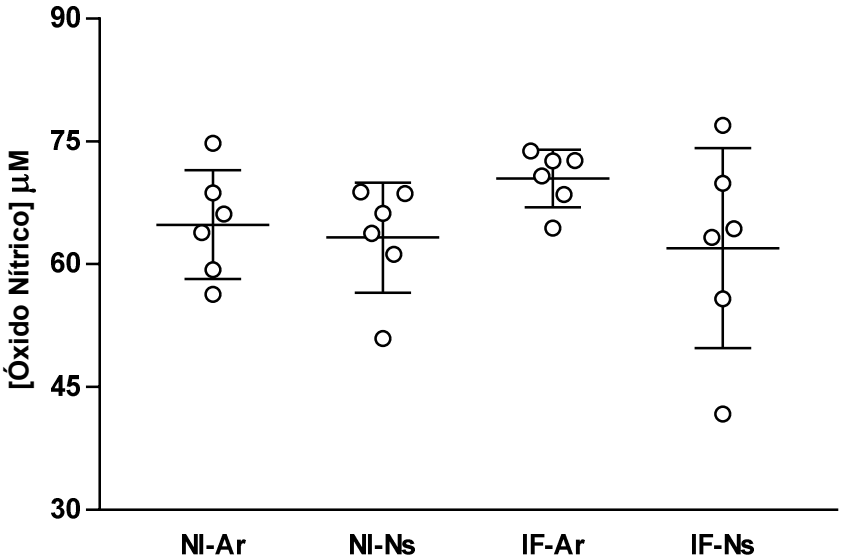

Gráfico 3 - Avaliação quantitativa dos níveis de óxido nítrico mensurados no soro obtido dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no soro extraído dos animais dos grupos controles não infectados suplementado com arginina (NI-Ar) e não suplementado (NI-Ns). Estatística realizada por meio de ANOVA, teste Brown-Forsythe, seguido do teste de Tukey para comparação múltiplas das médias.

O TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida em diversos processos inflamatórios do organismo, principalmente na fase aguda, pois os macrófagos estimulados por ela, irão produzir metabólitos tóxicos para combater os micro-organismos e parasitos, sendo um desses metabólitos, o óxido nítrico, este, é uma molécula vinculada diretamente a arginina, pois esta é a única molécula precursora de sua síntese (NORRIS et al., 1995; PAVANELLI, 2008).

No Gráfico 4 são demonstrados os níveis de citocina TNF-alfa, no qual percebe-se diferença significativa entre os grupos infectados e não infectados ($p < 0,05$), comparando-se os grupos infectados entre si, nota-se leve diminuição no grupo suplementado com arginina. Essas observações sugerem que a infecção por *T. cruzi* elevou os níveis de TNF-alfa, quando comparados aos grupos não infectados, e a suplementação com arginina melhora esse perfil imune inflamatório.

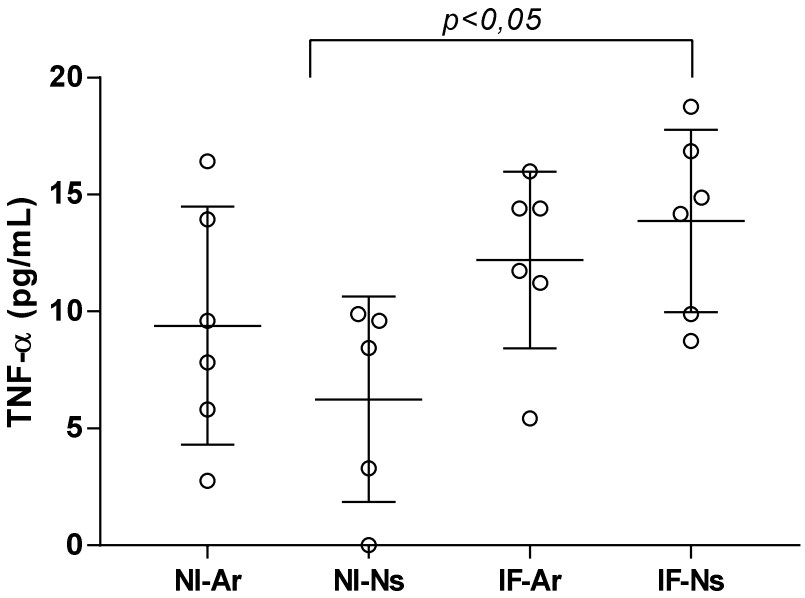

Gráfico 4 – Avaliação quantitativa dos níveis de citocina TNF- alfa mensurados no soro obtido dos animais inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no soro extraído dos animais dos grupos controles não infectados suplementado com arginina (NI-Ar) e não suplementado (NI-Ns). Estatística realizada por meio de ANOVA.

A contagem de células inflamatórias no coração dos animais, por meio de coloração de Hematoxilina e Eosina, foi realizada pelas imagens computadorizadas (microscópio Leica DM 5000) com contagem automática do número de células presentes nos tecidos dos animais pelas análises morfométricas computadorizadas (Leica Aplications Suíte/ Leica Q-win plus).

Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os grupos infectados (IF-Ar e IF-Ns) e os grupos não infectados (NI-Ar e NI-Ns), independente da presença ou ausência de suplementação com arginina ($p<0,001$) (gráfico 5). No entanto, nos animais infectados suplementados com arginina (IF-Ar), foram detectadas aproximadamente 3% menos células inflamatórias mononucleares em relação ao grupo não suplementado e infectado (IF-Ns). Por outro lado, mesmo na inexistência de diferenças significativas com relação à suplementação ou não com arginina dentro dos grupos não infectados e infectados ($p>0,05$), foi possível verificar níveis médios de células iguais a 286,8±17,37 e 279,3±11,36 nos grupos IF-Ns e IF-Ar, respectivamente.

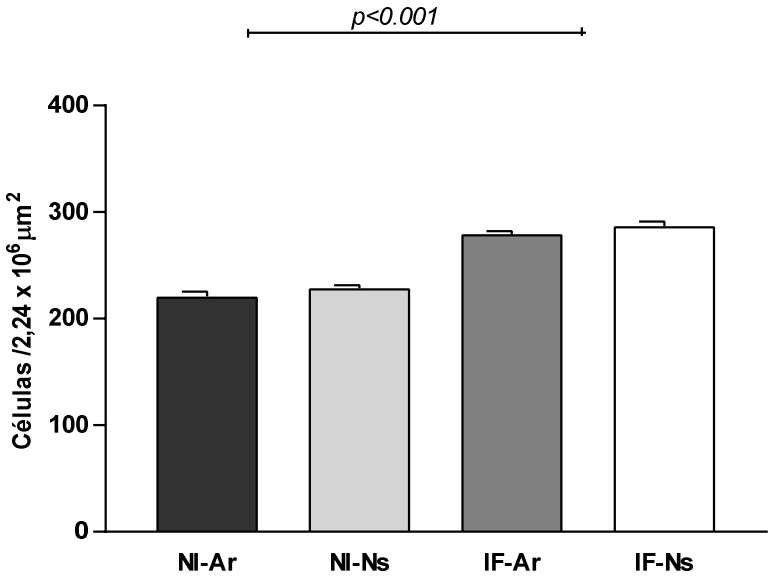

Gráfico 5 - Celularidade no miocárdio de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados que foram suplementados com arginina (NI-Ar) e não suplementados (NI-Ns). Estatística realizada por meio de ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

Na Figura 3, podem ser visualizadas a presença de células inflamatórias em um padrão de inflamação focal (indicado pelas setas pretas presentes na figura) na existência da infecção pelo *T. cruzi* (C e D), comparativamente à ausência desse perfil de inflamação na ausência da infecção pelo parasito (A e B).

A avaliação do colágeno foi realizada por meio de análises morfométricas computadorizadas utilizando o aplicativo Leica Aplications Suíte para retirada de fotos e Leica Q-win plus para quantificação das áreas ocupadas por músculo cardíaco e por colágeno.

Como observado no gráfico 6, a avaliação do perfil de fibrose mostrou que níveis semelhantes de fibrogênese foram detectados em todos os grupos de animais infectados e não infectados, suplementados ou não suplementados com arginina durante o estágio agudo da infecção. Os níveis de colágeno tipo I e colágeno tipo III foram semelhantes entre todos os grupos, entretanto, apenas os animais infectados e suplementados com arginina (IF-Ar) diferiram desse perfil, apresentando 127,5% mais colágeno tipo III do que o colágeno tipo I. Os animais não infectados (NI-Ar e NI- Ns) e os não suplementados e infectados (IF-Ns) apresentaram respectivamente 33,9%, 37,3% e 26,6% menos quantidade de colágeno tipo III em relação ao

colágeno tipo I (gráfico 6). Esses dados sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* juntamente com maior disponibilidade de arginina, pode exercer um efeito potencialmente induzível à fibrogênese no tecido do músculo cardíaco.

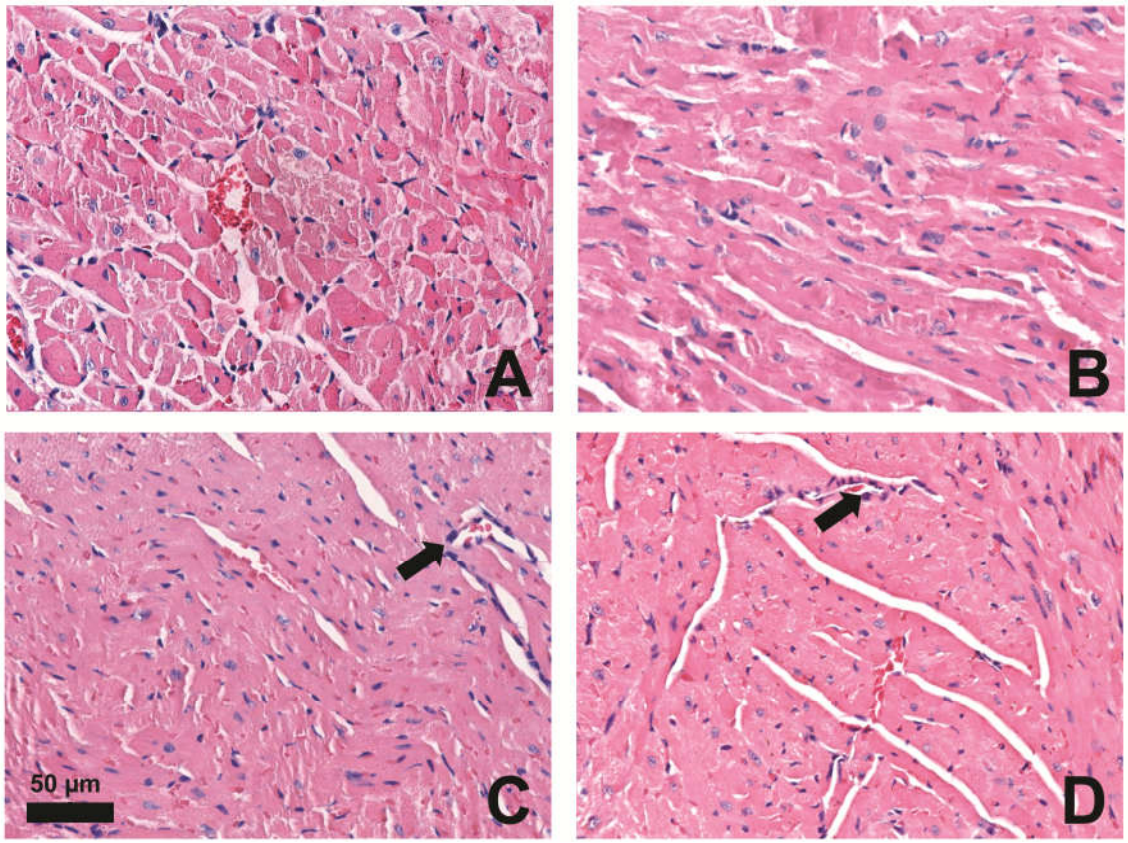

Figura 3 – Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados e suplementados (NI-Ar) ou não com arginina (NI-Ns). **A:** NI-Ar (animal não infectado e suplementado com arginina); **B:** NI-Ns (animal não infectado e não suplementado); **C:** IF- Ar (animal infectado e suplementado com arginina); **D:** IF-Ns (animal infectado e não suplementado com arginina). As setas indicam focos inflamatórios.

Na tentativa de confirmar se a síntese de colágeno regenerativo (tipo III) poderia ser estimulada pela maior biodisponibilidade da arginina na presença de infecção pelo *T. cruzi* e considerando que o NO é sintetizado por oxidação da L-arginina, as quantidades de colágeno tipo III quantificadas no miocárdio, foram correlacionadas com os níveis de NO encontrados no soro de cada animal. Conforme indicado no Gráfico 7, os níveis de colágeno tipo III e NO foram positivamente correlacionados (p=0,0358), sugerindo o papel da arginina no

processo de cicatrização, provavelmente necessário após o foco inflamatório desencadeado pelo parasita no tecido do músculo cardíaco.

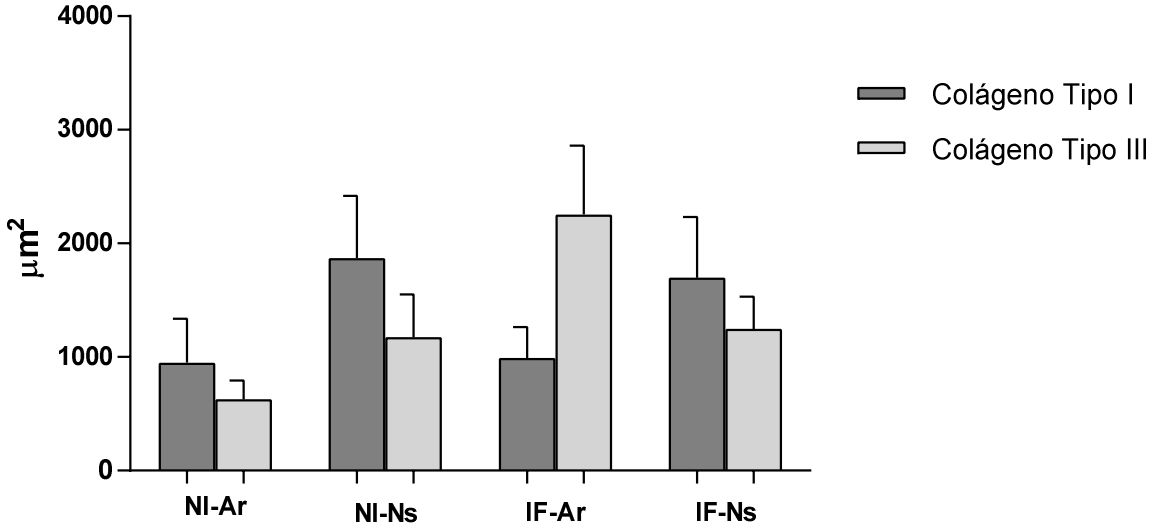

Gráfico 6 - Quantificação das áreas de colágeno tipo I (antigo) e de colágeno tipo III (novo) no miocárdio de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Estatística realizada por meio de ANOVA.

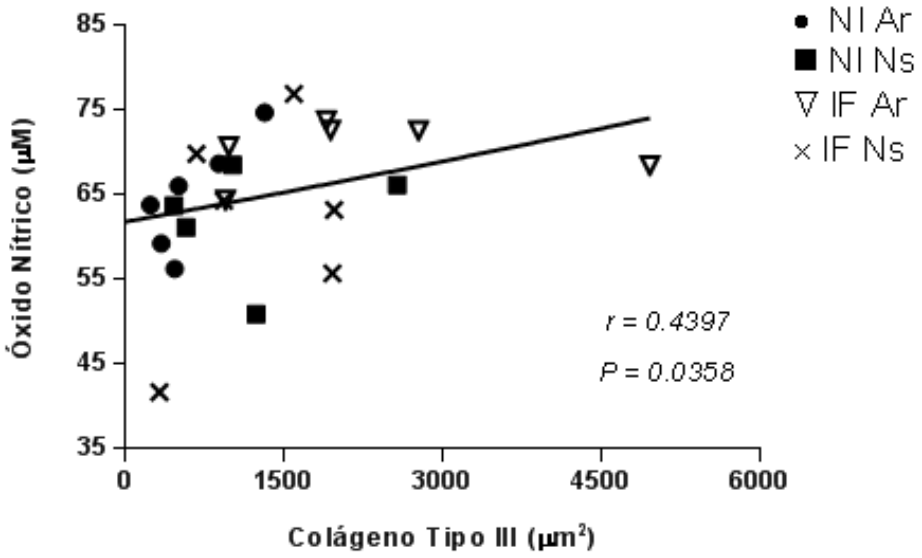

Gráfico 7 – Correlação entre níveis séricos de óxido nítrico e colágeno tipo III nos camundongos *Swiss* inoculados ou não com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (NI Ar = Não infectado e suplementado; NI Ns= Não infectado e não suplementado; IF Ar= Infectado e suplementado; IF Ns= Infectado e não suplementado). Estatística realizada por meio do coeficiente de correlação.

A Figura 4 ilustra os resultados da quantificação de colágeno no miocárdio dos animais. A área de colágeno regenerativo provindo da biossíntese de colágeno tipo III foi verificada principalmente em ambos os grupos de animais infectados pelo *T. cruzi*, o que pode ser consequente ao processo inflamatório desencadeado pela presença do parasito no coração.

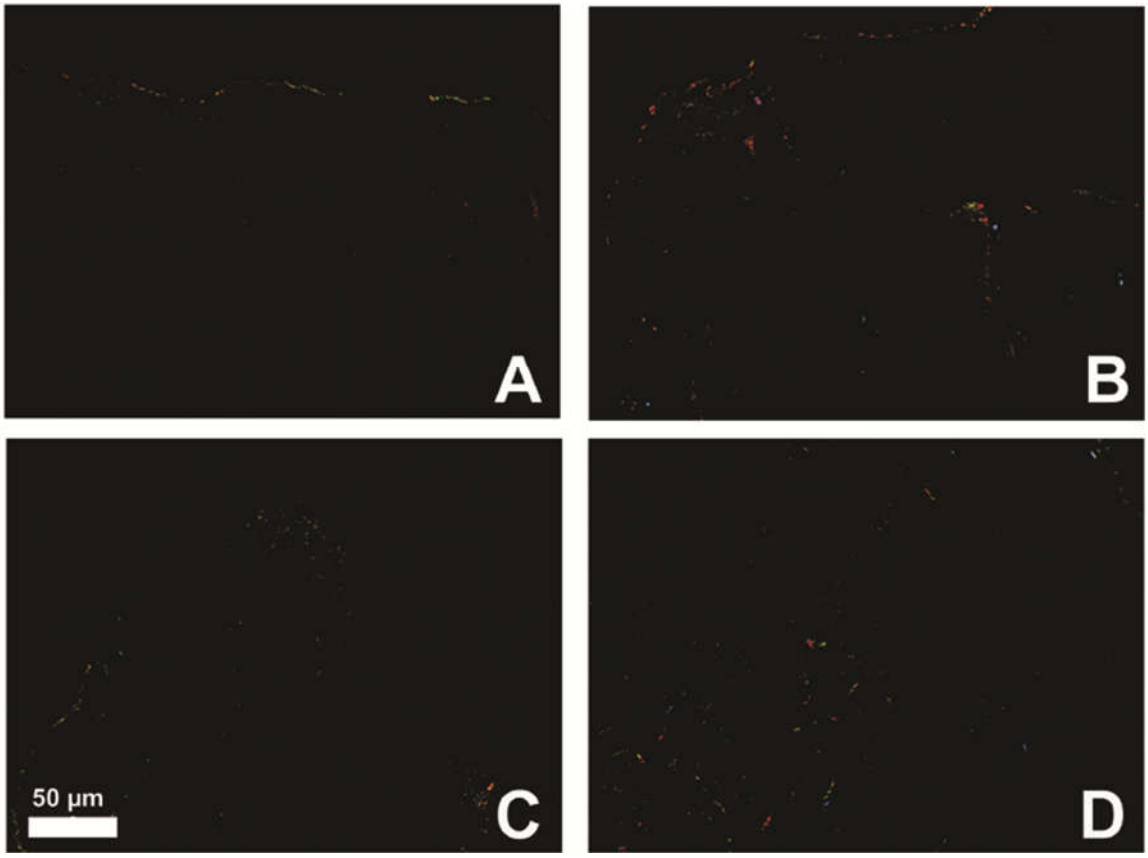

Figura 4 – Fotomicrografias de colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde) corados por *Picrosirius* em cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos *Swiss* inoculados com 5 × 10^3 tripomastigotas/0,1mL de sangue, via intraperitoneal, da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e suplementados com arginina (IF-Ar) ou não suplementados com arginina na fase aguda da infecção (IF-Ns). Quantificações similares foram realizadas no tecido muscular cardíaco dos animais dos grupos controles não infectados e suplementados (NI-Ar) ou não com arginina (NI-Ns). **A**: NI-Ar (animal não infectado e suplementado com arginina); **B**: NI-Ns (animal não infectado e não suplementado); **C**: IF- Ar (animal infectado e suplementado com arginina); **D**: IF-Ns (animal infectado e não suplementado).

Em adição, a realização de outros futuros e complementares estudos poderão ser convenientes, uma vez que a arginina apresentou uma interessante resposta imunomodulatória indicativa de benefícios tripanocidas. Estudos de suplementações de arginina em associações com fármacos tripanocidas a serem administrados principalmente na fase crônica da infecção sugerem ser promissores.

5. DISCUSSÕES

Um dos principais obstáculos para o tratamento e prevenção de doenças parasitárias em seres humanos, principalmente a doença de Chagas, é a presença de muitos efeitos colaterais e a baixa taxa de cura, além do fato da resistência de várias cepas aos medicamentos usuais (SATHLER-AVELAR et al., 2012; SESTI-COSTA et al., 2014; TROCHINE et al., 2014). Dada a falta de opções terapêuticas para a cardiomiopatia de Chagas e a necessidade de uma melhor elucidação de seus mecanismos patogênicos (BAHIA et al., 2014; MARIN-NETO et al., 2009), os efeitos da adição de arginina durante o estágio agudo da infecção pelo *T. cruzi* foram avaliados na presente investigação.

Considerando que a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* foi previamente classificada como suscetível ao tratamento com benznidazol no estágio agudo da infecção (TOLEDO et al., 1995), neste estudo avaliamos a habilidade da arginina para induzir o controle de parasitos circulantes no estágio agudo da infecção e, mais tarde, sob sua atividade no processo inflamatório crônico mensurado no tecido muscular cardíaco de camundongos *Swiss* infectados experimentalmente com tripomastigotas sanguíneos da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*.

Como pode ser observado nos resultados, pode-se dizer que a suplementação com arginina induziu uma redução na média da área de parasitemia entre os grupos infectados (p=0,0586). Verificamos que a arginina promoveu uma curva de parasitemia bastante plana com apenas dois picos distintos e pequenos de 40833 e 57500 tripomastigotas / 0,1 mL de sangue. Estudos anteriores sugeriram que a arginina possui uma boa atividade tripanocida, provavelmente relacionada ao papel desta molécula na promoção da síntese de NO, confiando na capacidade do NO para induzir a lise do parasito (MACHADO, TANOWITZ e TEIXEIRA, 2010).

Esta hipótese também está em consonância com outro estudo que mostrou que a arginina fornecida a uma dose de 21 mg / kg / dia durante 15 dias para ratas *Wistar* prenhas infectadas com a cepa Y do *T. cruzi,* induziu a diminuição dos níveis de parasitemia e cargas de amastigotas no tecido cardíaco, embora apresentassem parasitismo placentário semelhante (COSTA et al., 2014). Com base nos resultados de Costa et al. (2014) e os do presente trabalho, a maior depuração da parasitemia induzida pela arginina detectada por animais infectados com a cepa Y em

comparação com os animais infectados com a cepa Berenice-78 pode ser atribuída às diferenças encontradas anteriormente no padrão de virulência entre essas duas cepas do *T. cruzi* (GUEDES et al., 2007).

A cepa Y se apresentou mais virulenta comparada à cepa Berenice-78, inclusive demonstrou uma maior infectividade *in vitro* de células Vero e também, maior dano cardíaco em cães *Beagle* em estudo realizado por Guedes et al. (2007). Estas diferenças podem ser explicadas devido a alterações genéticas entre as cepas, o que pode influenciar diretamente na sobrevida do hospedeiro e principalmente, na resposta ao tratamento (CANÇADO, 2002).

A utilização da arginina como um imunonutriente é tão interessante, que em um estudo Lewis e Langkamp-Henken (2000) demonstraram que com a suplementação de arginina camundongos jovens, adultos e senescentes apresentaram uma melhora da resposta imunológica. Isso indica que a maior oferta de arginina possibilitaria ao organismo obter uma melhor resposta imune que contribua positivamente para o combate de infecções (COSTA et al., 2014).

Entretanto, é necessário destacar, que a infecção presente nos animais pode ter desencadeado um aumento na necessidade energética. Segundo Pereira e Meira (1991), o hipercatabolismo e consequente aumento da demanda energética são alterações metabólicas que ocorrem com a finalidade de preparar o hospedeiro para combater o agente agressor. O que interfere na disponibilidade de arginina para produção de NO, pois ela acaba sendo mobilizada para suprir a demanda energética do organismo.

Diante da necessidade de descoberta de novas alternativas ao tratamento da doença de Chagas, a arginina pode ser uma alternativa a ser melhor investigada, por estar envolvida diretamente em várias rotas de produção de metabólitos, como óxido nítrico e poliaminas, que vão estar intimamente ligadas à cura ou cronicidade dos processos infecciosos, principalmente os relacionados a micro-organismos e parasitos, como o *T. cruzi* (PELUFFO et al., 2004). A arginina é considerada a principal fonte de nitrogênio para a produção fisiológica de NO pelos macrófagos, estes, apresentam um efeito tóxico em muitos micro-organismos, podendo ser considerado como um fator chave na resposta imune, o que vai ajudar a manter a homeostase do sistema imunológico. A diminuição da oferta de arginina no corpo interfere no processo de produção de NO, elevando assim, a vulnerabilidade do organismo a infecções causadas por patógenos (COSTA et al., 2014).

Quando macrófagos contendo iNOS realizam fagocitose, a difusão transmembrana de NO é facilitada, o que favorece a reação com superóxido produzindo peroxinitrito, que tem uma atividade tripanocida *in vitro*. O NO é uma molécula efetora do sistema imune sendo capaz de causar citotoxicidade a agentes patogênicos diretamente ou após a reação controlada por difusão com superóxido para produzir peroxinitrito (PELUFFO et al., 2004). Devido a sua alta reatividade, o NO é considerado um componente altamente tóxico para vários tipos de micro-organismos e células, portanto, se apresenta como um componente essencial na resposta imune inata (COSTA et al., 2014).

Ignarro et al. (1987) e Hibbs et al. (1988), respectivamente, identificaram em células endoteliais e em macrófagos, a produção de NO a partir da arginina, sendo que ela é o único substrato para a síntese de NO. A enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), quando estimulada por macrófagos, pode desencadear a gênese de NO em grande quantidade, e desde que isso ocorra em condições consideradas fisiológicas, o NO vai exercer uma atribuição notável ao combate e lise de parasitos, bactérias, vírus, células cancerígenas, e também vai estimular o processo de vasodilatação (COSTA et al., 2014).

Além dos efeitos da arginina em parasitos circulantes durante o estágio agudo da infecção, também investigamos os níveis séricos de NO no 60º dia após a infecção, o que corresponde ao 36º dia após a suplementação com arginina. Embora não tenham sido observadas diferenças nos níveis de NO entre todos os grupos infectados e não infectados, os grupos infectados apresentaram médias de 70,47 ± 3,49 mM e 61,99±6,62 mM de NO detectados no soro de animais suplementados com arginina e animais não suplementados respectivamente. O grande desvio padrão nos níveis de NO detectados entre os animais infectados não suplementados impediram a detecção de diferenças significativas entre animais infectados não suplementados e suplementados com arginina, mas os níveis médios de NO detectados no soro de animais infectados e suplementados com arginina indicam uma tendência ao benefício da arginina em promover a síntese de NO desencadeada pela infecção parasitária. De acordo com Costa et al. (2014), animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* suplementados com arginina apresentaram valores significativamente mais elevados de NO, embora no estudo em questão a cepa do *T. cruzi* utilizada no modelo de infecção experimental e a metodologia empregada na detecção dos valores de ON foram diferentes.

De acordo com Gonzalez-Mejia et al. (2014) vários estudos demonstraram que durante a fase aguda da doença de Chagas há um aumento na produção de ON pelo hospedeiro. Porém, deve-se atentar com a questão de que durante a fase crônica da infecção, tal substância pode exercer efeito contrário, pois, há um aumento de radicais livres que contribuem para o estresse oxidativo e podem consequentemente corroborar com os danos aos órgãos dos indivíduos infectados, principalmente o coração (GONZALEZ-MEJIA et al., 2014).

Em estudo, Borges (2008) comprovou que animais deficientes na produção de óxido nítrico apresentaram níveis parasitários maiores no tecido muscular cardíaco, quando infectados com a cepa colombiana, o que comprova que o óxido nítrico está estritamente envolvido no combate do parasito na infecção chagásica.

De acordo com Machado, Tanowitz e Teixeira (2010), a produção de NO pela molécula NO sintase induzíveil (iNOS ou NOS2) tem ações antimicrobianas, dependendo da sua concentração, e também pode interferir com a proliferação celular e a morte por apoptose. Também foi demonstrado que as citocinas IFN-gama, TNF-alfa e vários quimioatraentes são produzidos e considerados relevantes para a indução de iNOS e o combate do *T. cruzi* pelo ON na fase aguda da infecção em modelo experimental (MACHADO et al., 2000; MACHADO et al., 2005). A citocina TNF-alfa tem sido verificada como estritamente relacionada ao processo de liberação de óxido nítrico por macrófagos no processo de combate a infecção. Juntamente com o INF- gama, a citocina TNF-alfa pode induzir a produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que vai desencadear o processo de produção e liberação de NO pelo macrófago (PAVANELLI, 2008).

Em paralelo, avaliamos os efeitos da arginina sob os níveis séricos de citocinas TNF-alfa produzidas durante o estágio crônico da infecção experimental do *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram que a suplementação de arginina durante o estágio agudo da infecção por *T. cruzi* apresentou uma tendência em reduzir os níveis da citocina inflamatória TNF-alfa entre os animais infectados e tratados com arginina. Os níveis mais altos de TNF-alfa foram detectados entre animais infectados não suplementados, sugerindo um pior prognóstico para a evolução crônica da infecção pelo *T. cruzi* na ausência de arginina fornecida no estágio agudo da doença. Embora até hoje em dia a patogênese da fase crônica não seja totalmente compreendida, os níveis elevados de TNF-alfa demonstraram estar envolvidos na morbidade cardíaca na doença de Chagas (CHAVES et al., 2016; MEDEIROS et al.,

2017; SOUSA et al 2014). De acordo com Santos et al. (2012), o aumento do TNF-alfa mediou a gênese da disfunção sistólica cardíaca em cachorros mestiços infectados cronicamente com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*.

Para avaliar se a parasitemia mais baixa e a tendente redução dos níveis séricos de TNF-alfa induzidos pelo fornecimento de arginina afetariam o desfecho do processo inflamatório miocárdico, o número de células inflamatórias mononucleares e a análise da fibrinogênese foram verificados no tecido do músculo cardíaco. O suplemento de arginina não impediu o miocárdio danificado relacionado à cardiomegalia na doença de Chagas, embora 3% menos células inflamatórias mononucleares tenham sido detectadas entre os animais infectados com *T. cruzi* e suplementados com arginina em comparação com aqueles infectados e não suplementados. Como esperado, os grupos infectados apresentaram um perfil inflamatório no miocárdio bem mais acentuado do que os grupos não infectados, indicando o papel da infecção parasitária para desencadear cronicamente o dano inflamatório miocárdico em camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi*. Outros estudos experimentais com modelo cão de infecção por *T. cruzi* demonstraram os efeitos do parasito em dano cardíaco de longo prazo, com altos níveis de células inflamatórias mononucleares que provocam fibrose miocárdica extensa que apresentou correlação positiva com a gravidade da doença (CALDAS et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

Os resultados observados na análise do tecido muscular cardíaco, indicam claramente como a presença do parasito no tecido induz a uma maior presença de células inflamatórias. Por sua vez, a suplementação com arginina não apresentou resultados significativos, apesar da ação tripanocida do NO, que é um produto da arginina. Essa atividade tripanocida do NO encontra-se descrita por vários autores, tais como Gonzalez-Mejia et al. (2014), Machado et al. (2000), Pereira et al. (2014) e Sesti-Costa et al. (2014).

É interessante salientar que uma sobrecarga de arginina pode acabar sendo prejudicial ao hospedeiro, visto que altas concentrações de NO podem corroborar com as lesões teciduais no paciente, podendo inclusive piorar o prognóstico principalmente na fase crônica da infecção chagásica, incluindo uma redução na contratilidade do miocárdio (PEREIRA et al., 2014).

Neste sentido, o combate de parasitos circulantes induzidos pela arginina e NO e consequente melhoria do processo inflamatório do coração ainda precisa ser

melhor compreendido, uma vez que a arginina também é precursora da ornitina, a qual está envolvida no processo de cicatrização e regeneração tecidual, desempenhando assim, um papel crucial na proliferação celular e fibrinogênese (COSTA et al., 2014; CHOW e BARBUL, 2012).

Dentre as principais apresentações clínicas da doença de Chagas, destaca-se a cardiopatia chagásica, que engloba desde falência cardíaca, até fibrilações. Contudo, ainda não estão devidamente esclarecidos quais fatores desencadeiam as lesões teciduais na fase crônica. Acredita-se que a agressão direta do parasito ao tecido e sua permanência no mesmo, seja a principal causa da inflamação e lesão tecidual (GONÇALVES, 2014; SANTOS, 2010). Estas lesões teciduais ocorrem devido a destruição das fibras cardíacas e a intensa fibrose para recuperação do tecido afetado e consequente substituição das células lesadas, o que acaba culminando com a diminuição da massa muscular miocárdica e hipertrofia dos cardiomiócitos (GONÇALVES, 2014; SANTOS, 2010). Sabe-se que a fibrose do miocárdio constitui um dos principais problemas na doença de Chagas crônica, pois compromete a contratilidade do tecido muscular cardíaco. Isto ocorre, devido a substituição do tecido muscular lesado por fibras de colágeno, que acredita-se que tenha a função de preenchimento de tais lesões. Este processo culmina em desencadear a perda de tecido contrátil, o que acaba levando a um processo de insuficiência cardíaca congestiva (BORGES, 2008).

No presente estudo não houve diferenças entre os grupos infectados e não infectados com relação aos teores dos diferentes tipos de colágeno detectados no miocárdio dos animais, contudo foi verificada a correlação positiva dos teores de colágeno novo com os níveis de óxido nítrico, indicando que a síntese de colágeno pode ser estimulada pela maior disponibilidade de arginina na infecção pelo *T. cruzi*. Desta forma, essa correlação pode ser justificada pelo papel da arginina como estimuladora da produção de colágeno e consequente auxílio no processo de cicatrização de feridas (CHOW; BARBUL, 2012).

Uma análise global de nossos resultados mostrou que a arginina apresenta efeitos imunomoduladores na infecção experimental pelo *T. cruzi*, melhorando a depuração de parasitas circulantes e o perfil inflamatório da resposta imune do hospedeiro. No entanto, o ajuste adequado da dose e o período de administração da arginina são essenciais para evitar a exacerbação da fibrinogênese cardíaca que pode ser prejudicial para o paciente, especialmente na fase crônica da infecção. As

abordagens futuras com arginina combinada com drogas tripanocidas podem ser desenvolvidas para encontrar novas perspectivas para a cura e controle da doença de Chagas, devido aos limites de eficácia das drogas em uso clínico.

6. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos dados obtidos neste estudo possibilitou concluir que a arginina apresenta um efeito potencialmente benéfico à resposta imune do hospedeiro num quadro de doença de Chagas. Todavia é indispensável o ajuste adequado da dose e período de administração da arginina, sobretudo na fase crônica da infecção. Estudos complementares devem ser realizados para compreensão dos efeitos da suplementação de arginina durante a fase crônica da infecção.

Os resultados também permitiram delinear perspectivas futuras interessantes, tais como ensaios de imunoterapaia com a associação de suplementação com arginina e utilização de fármacos tripanocidas que poderão ser alternativas promissoras à diminuição da dose dos fármacos usuais. Tais associações poderão contribuir tanto para elevação da eficácia tripanocida do fármaco, como para a diminuição dos efeitos adversos que impactam em grandes limitações na continuidade do tratamento.

7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. P. DE; NETO, J. A. M.; PAOLA, A. A. V. DE; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; ALMEIDA, D. R.; FILHO, A. A. F.; MOREIRA, M. C. V.; XAVIER, S. S.; JUNIOR, W. A. O.; DIAS, J. C. P. I latin american guidelines for the diagnosis and treatment of chagas' heart disease. Executive summary. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 6, 2011.

ANÔNIMO. QuantiChromTM Nitric Oxide Assay Kit (D2NO-100): determinação colorimétrica quantitativa de óxido nítrico a 540nm. 2010. Disponível em: <http://www.bioassaysys.com/file_ dir / D2NO.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2017.

BAHIA, M. T.; NASCIMENTO, A. F. S.; MAZZETI, A. L.; MARQUES, L. F.; GONÇALVES, K. R.; MOTA, L. W. R.; DINIZ, L. DE F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; SHACKLEFORD, D. M.; KOLTUN, M.; SAUNDERS, J.; WHITE, K. L.; SCANDALE, I.; CHARMAN, S. A.; CHATELAIN, ERIC. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 58, n. 8, p. 4362–4370, 2014.

BARBOSA-SILVA, A. N.; CÂMARA, A. C. J.; MARTINS, K.; NUNES, D. F.; OLIVEIRA, P. I. C.; AZEVEDO, P. R. M.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C. Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.1, 2016.

BORGES, C. R. B. **Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo** *Trypanosoma cruzi*. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2008.

BRASIL, P. E. A. A. DO; XAVIER, S. S.; HOLANDA, M. T.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; BRAGA, J. U. Does my patient have chronic Chagas disease? Development and temporal validation of a diagnostic risk score. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.3. 2016.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical,** v. 4, p. 389-396, 1962.

BUSCHINI, A.; FERRARINI, L.; FRANZONI, S.; GALATI, S.; LAZZARETTI, M.; MUSSI, F.; ALBUQUERQUE, C. N. DE; ZUCCHI, T. M. A. D.; POLI, P. Genotoxicity revaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. **Journal of Parasitology Research**, v. 2009, 2009.

CALDAS, I. S.; GUEDES, P. M. M.; SANTOS, F. M.; DINIZ, L. F.; MARTINS, T. A. F.; NASCIMENTO, A. F. S.; AZEVEDO, M. A.; LIMA, W. G.; NETO, R. M. N.; TORRES, R. M.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T. Myocardial scars correlate with eletrocardiographic

changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with benznidazole. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 1, p. 75–84, 2013.

CAMARGOS, L. R. **Descrição morfoquantitativa de lesões cutâneas em cães com leishmaniose visceral canina**. 2015. 16f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Saúde Animal, Brasília, 2015.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas'disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical,** v. 44, p. 29-37, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. *gen*., n. sp., ajente etiolójico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CHAVES, A. T.; ESTANISLAU, J. A. S. G.; FIUZA, J. A.; CARVALHO, A.T.; FERREIRA, K. S.; FARES, R.C.G.; GUIMARÃES, P. H. G.; FAGUNDES, S. E. M.; MORATO, M. J.; FUJIWARA, R. T.; ROCHA, M. O. C.; OLIVEIRA, R. C. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC Infectious Diseases**, v.16, n.191, 2016.

CHOW, O.; BARBUL, A. Immunonutrition: role in wound healing and tissue regeneration**. Advances in Wound Care**, v. 3, n. 1, 2012.

COSTA, C.M.B.; FREITAS, M.R.B.; BRAZÃO, V.; SANTOS, C.D.; SALA, M.A.; PRADO JÚNIOR, J.C.; ABRAHÃO, A.A.C. Doesl-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of *Trypanosoma cruzi* infected and pregnant Wistar rats? **Experimental Parasitology**, v.142, p.59-66, 2014.

DIAS, J. V. L.; QUEIROZ, D. R. M.; DIOTAIUTI, L.; PIRES, H. H. R. Knowledge of triatomine insects and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n.7, 2016.

DIAS, J. V. L.; QUEIROZ, D. R. M.; MARTINS, H. R.; GORLA, D. E.; PIRES, H. H. R.; DIOTAIUTI, L. Spatial distribution of triatomines in domiciles of an urban area of the brazilian southeast region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1,p. 43–50, 2016.

DIAS, J. C. P.; RAMOS JR, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; TORRES, R. M.; MELO, J. R. DA C.; ALMEIDA, E. A.; OLIVEIRA JR, W.; SILVEIRA, A. C.; REZENDE, J. M.; PINTO, F. S.; FERREIRA, A. W.; RASSI, A.; FRAGATA FILHO, A. A.; SOUSA, A. S.; CORREIA FILHO, D.; JANSEN, A. M.; ANDRADE, G. M. Q.; BRITTO, C. F. P. C.; PINTO, A. Y. N.; RASSI JR, A.; CAMPOS, D. E.; ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S. E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; MOREIRA, E. F.; MARQUES, D. S. O.; SILVA, E. L.; MARIN-NETO, J. A.; GALVÃO, L. M. C.; XAVIER, S. S.; VALENTE, S. A. S.; CARVALHO, N. B.; CARDOSO, A. V.; SILVA, R. A.; COSTA, V. M.; VIVALDINI, S. M.; OLIVEIRA, S. M.; VALENTE, V. C.; LIMA, M. M.; ALVES, R. V. II Consenso

Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.25, n. esp, 2016.

DÍAZ-ALBITER, H. M.;FERREIRA, T. N.;COSTA, S. G.;RIVAS, G. B.;GUMIEL, M.;CAVALCANTE, D. R.;PAVAN, M. G.;GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. DE;DILLON, V. M.;BRUNO, R. V. DE;GARCIA, E. DE S.;LIMA, M. M.;CASTRO, D. P. DE;DILLON, R. J.; AZAMBUJA, P. DE; GENTA, F. A. Everybodyloves sugar: firstreportofplantfeeding in triatomines. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 114, 2016.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

GONÇALVES, K. R. **Alterações funcionais e histopatológicas induzidas pela sinvastatina na cardiopatia chagásica em modelo canino**. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de pesquisas em ciências biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Ouro Preto, 2014.

GONZALEZ-MEJIA, M. E.; TORRES-RASGADO, E.; PORCHIA, L. M.; SALGADO, H. R.; TOTOLHUA, J. L.; ORTEGA, A.; HERNÁNDEZ-KELLY, L. C. R.; RUIZ-VIVANCO, G.; BÁEZ -DUARTE, B. G.; PÉREZ-FUENTES, R. Metallothionein-1 and nitric oxide expression are inversely correlated in a murine model of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 174–181, 2014.

GUARIENTO, M.E., CARRIJO, C.M., ALMEIDA, E.A., MAGNA, L.A. Perfil clínico de idosos portadores de doença de Chagas atendidos em serviço de referência. **Revista Brasileira de Clínica Medica,** v. 9, n. 1, p. 20–24, 2011.

GUEDES, P. M. M.; OLIVEIRA, F. S.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA, G. K. DA; RODRIGUES, G. J.; BENDHACK, L. M.; FRANCO, D. W.; MATTA, M. A. DO V.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, R. S. DA; SILVA, J. S. Nitric oxide donor trans-[RuCl([15]aneN4)NO]2+ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 270–282, 2010.

GUEDES, P. M. M.; URBINA, J. A.; LANA, M. DE; AFONSO, L. C. C.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum*) cruzi in dog hosts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 48, n. 11, p. 4286–4292, 2004.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.; CALIARI, M.V.; CARNEIRO, C.M.; SOUZA, S.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T.; GALVÃO, L.M.C. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.2, p. 149-147, 2007.

HSU, R. C.; BURAK, J.; TIWARI, S.; CHAKRABORTI, C.; SANDER, G. E. Chagas cardiomyopathy in new orleans and the southeastern United States. **Ochsner Journal**, v. 16, n. 3, p. 304–308, 2016.

HIBBS, M.; MARLLETA, A.; POKSYN, S.; YOON, R.I.D.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry,** v.27, n.24, p.8706–8711, 1988.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endotheliumderived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v.84, p.265–9269, 1987.

LANA, M.; CHIARI, C.A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 247-253, 1986.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **HHS Author Manuscripts,** v. 8, n. 12, 2013.

LEWIS, B.; LANGKAMP-HENKEN, B. Arginine enhances in vivo immune responses in young, adult and aged mice. **Journal of Nutrition**, v.130, n.7, p. 1827-1830, 2000.

LUQUETTI, A. O.; TAVARES, S. B. DO N.; SIRIANO, L. DA R.; OLIVEIRA, R. A. DE; CAMPOS, D. E.; MORAIS, C. A. DE; OLIVEIRA, E. C. DE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369-376, 2015.

MACHADO, F. S.; KOYAMA, N. S.; CARREGARO, V.; FERREIRA, B. R.; MILANEZI, C.M.; TEIXEIRA, M. M. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis,** 191, p.627–636, 2005.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. P.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*–infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide–dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, 2000.

MACHADO, F. S.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, M. M. New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. **British Journal of Pharmacology,** v. 160, n. 2, p. 258–259, 2010.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; AVEZUM JR, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A.; The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v**.** 104, n. 1, p. 319-324, 2009.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACHA, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014.

MEDEIROS, N. I.; TARIFAS, R. C. G.; FRANCO, E. P.; SOUSA, G. R.; MATTOS, R. T.; CHAVES, A. T.; NUNES, M. C. P.; DUTRA, W. O.; OLIVEIRA, R. C.; ROCHA, M.

O. C.; GOMES, J. A. S. Differential expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and cytokines by neutrophils and monocytes in the clinical forms of Chagas disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v.11, n.1, 2017.

MOLINA, I.; PRAT, J. G. I; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **The new england journal of medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899- 1908, 2014.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v**.** 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 17-30, 2009.

MORILLO, C.A.; MARIN-NETO, J.A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. JR., ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S.J.; YUSUF, S. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E.; FLYNN, J. L.; MORRIS JR, S. M. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi.* **Infection and Immunity,** v. 63, n. 7, p. 2793–2796, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Doença de Chagas (tripanossomíase americana): Epidemiologia. Disponível em: < http:// http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>. Acesso em: 18 mai. 2017.

PAVANELLI, W.R. Citocinas e óxido nítrico na doença de Chagas. **Biosaúde**, v.10 n.2 p.147-146, 2008.

PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M.N.; RADI, R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **TRENDS in Parasitology**, v.20, n.8, p.363-369, 2004.

PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; SILVA, A. A. DA; LANNES-VIEIRA, J. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 109, n. 3, p. 289–298, 2014.

PEREIRA, P. C. M; MEIRA, D. A. Nutrição e Infecção. In: INTERLIVROS (Ed.). **Clínica de Doenças Tropicais e Infecciosas**. Rio de Janeiro, p.29-32, 1991.

PESSOA, G. C. D.; SOUSA, T. N. DE; SONODA, I. V.; DIOTAIUTI, L. Assessingthemitochondrial DNA diversityofthe Chagas disease vector *Triatomasordida* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 322–329, 2016.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

SANTOS, F.M. **Evolução da cardiomiopatia chagásica em cães tratados com benznidazol na fase crônica da infecção experimental pelo** *Trypanossoma cruzi***.** 2010. 126f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Núcleo de pesquisas em ciências biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Ouro Preto, 2010.

SANTOS, F. M.; CALDAS, S.; CÁU, S. B. A.; CREPALDE, G. P.; LANAA, M. DE; MACHADO-COELHO, G. L.L.; VELOSO, V. M.; BAHIA, M. T. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistancein vivo and its modulation byin vitro culturing and mice infection. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 2008, p. 385–390, 2008.

SANTOS, F.M., LIMA, W.G., GRAVEL, A.S., MARTINS, T.A.F., TALVANI, A., TORRES, R.M., BAHIA, M.T. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 67, n. 8, p. 1987–1995, 2012.

SANTOS, F.M.; MAZZETI, A. L.; CALDAS, S.; GONÇALVES, K. R.; LIMA, W. G.; TORRES, R. M.; BAHIA, M. T. Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 161, p. 44–54, 2016.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; ELÓI-SANTOS, S. M.; GONTIJO, E. D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *trypanosoma cruzi* antigens. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, 2012.

SCHMUNIS, G.A., YADON, Z.E. Chagas' disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14-21, 2010.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; SILVA, R. S. DA; SILVA, J. S. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

SILVEIRA, E. A. DA; RIBEIRO, I. S.; AMORIM, M. S.; ROCHA, D. V.; COUTINHO, H. S.; FREITAS, L. M. DE; TOMAZI, L.; SILVA, R. A.A. DA. Correlation between infection rate of triatominies and Chagas disease in southwest of Bahia, Brazil: a warning sign?.**Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2016.

SOUSA, G. R.; GOMES, J. A. S.; FARES, R. C. G.; DAMÁSIO, M. P. S.; CHAVES, A. T.; FERREIRA, K. S.; NUNES, M. C. P.; MEDEIROS, N. I.; VALENTE, V. A. A.; OLIVEIRA, R. C.; ROCHA, M. O. C. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **Plos One**, v. 9, n.3, 2014.

TOLEDO, M. J. O.; GASPERI, M. V.; ARAÚJO, S. M.; LANA, M. Berenice-62 and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benznidazole. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 201, 1995.

TROCHINE, A.; CREEK, D. J.; FARAL-TELLO, P.; BARRETT, M. P.; ROBELLO, C. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases,** v. 8, n. 5, 2014.

VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 1005-1011, 2001.

VIANA, M. L. **Arginina no processo de translocação bacteriana:** Permeabilidade intestinal, vias de ação e resposta imunológica em modelo de obstrução intestinal. 2010. 74f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte, 2010.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado" Avaliação dos impactos da obesidade e da arginina na evolução da cardiopatia chagástica em camundongos infectados experimentalmente pelo Trypanosoma cruzi. ",Protocolo nº43/2015, sob a responsabilidade de Fabiane Matos dos Santos que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em reunião de 07/08/2015.

Vigência do Projeto	Início: Agosto/2015 Término:Agosto/2017
Espécie/Linhagem	Ratos Swiss
Nº de Animais	Experimento Píloto:16 M Protocolo Experimental:48 F Total:64
Peso/Idade	Peso: 20g Idade: 30 dias
Sexo	Ambos
Origem	Mamíferos(Pertencentes a ordem dos roedores)

Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA / UFES

Vitória (ES), 7 de agosto 2015.