



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - ICEB



Estudo da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas coronarianas dependentes de apolipoproteína-E

Relatório final referente ao período de julho de 2011 a julho de 2012, apresentado à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do programa de iniciação científica PIBITI/CNPq.

Aluno: Diógenes Coelho Júnior, bolsista CNPq desde julho de 2010, acadêmico do 6º período do curso de Medicina da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani, coordenador do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação dos Efeitos de Diferentes Cepas de *Trypanosoma cruzi* no Desenvolvimento e Progressão das Lesões na Aterosclerose em camundongos *Knockout* para alipolipoproteína E”.

Co-orientador: Me. Vivian Paulino Figueiredo

Ouro Preto - Minas Gerais - Brasil

Agosto de 2012

Estudo da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas aórticas dependentes de apolipoproteína-E

A resposta inflamatória desencadeada por alguns agentes infecciosos exerce efeitos pró-aterogênicos via produção e ação de mediadores inflamatórios sobre a parede vascular. É notório que tanto o *Trypanosoma cruzi* quanto a aterosclerose, uma doença crônico-degenerativa, estão envolvidos em eventos inflamatórios responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras manifestações clínicas. Sendo a apolipoproteína E (apoE) a principal glicoproteína responsável pelo transporte e metabolismo de colesterol e triglicérides, e uma constituinte das lipoproteínas VLDL, HDL e quilomícrons, neste estudo avaliamos a interferência da apoE no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas aórticas em camundongos C57BL/6 (n=28) e apoE *knockout*^{-/-} (n=28) infectados pelas cepas Berenice 78 (Be 78) e Colombiana do *T. cruzi*. Foram avaliados diariamente a parasitemia e semanalmente o peso dos animais. Antes e após 30 dias de infecção, coletou-se sangue para dosagens bioquímicas (colesterol total, colesterol HDL e triglicérides) e imunológicas (CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES). Após a eutanásia, o fígado e as fezes foram utilizados para extração e quantificação dos lipídeos totais, enquanto o arco aórtico e o tecido muscular cardíaco ainda serão utilizados para avaliações histopatológicas. Foi observado um menor período pré-patente nos animais selvagens (dia 9) em relação aos apoE^{-/-} (dia 12), sendo que nestes a parasitemia foi menor para ambas as cepas. Não houve diferença no peso entre os grupos, mas o colesterol total e os triglicérides plasmáticos mostraram-se elevados no grupo apoE^{-/-}. A cepa Be 78 nos animais apoE^{-/-} mostrou-se associada ao aumento dos lipídeos fecais, enquanto a cepa Colombiana neste mesmo grupo apresentou-se associada a níveis elevados de triglicérides plasmáticos. Na análise de quimiocinas, verificou-se elevada produção de CCL2 e CCL5 em todos os animais infectados, porém apenas com a cepa Be 78, avaliada em animais apoE^{-/-}, houve redução dos níveis séricos de CCL5. Estes dados sugerem que a infecção experimental pelo *T. cruzi* altera a produção de mediadores inflamatórios plasmáticos e de alguns tipos lipídios, podendo agravar o desenvolvimento da aterosclerose em camundongos apoE^{-/-}. A análise e compreensão da interferência da apoE no contexto aterosclerótico na patogênese da doença de Chagas constituirão importantes elementos para estudos futuros envolvendo a resposta inflamatória cardiovascular.

André Talvani

Orientador

Vivian Paulino Figueiredo

Co-orientadora

Diógenes Coelho Júnior

Bolsista

Índice

1. Introdução.....	4
1.1. A doença de Chagas	4
1.2. O <i>Trypanosoma cruzi</i> : aspectos biológicos e infecção	4
1.3. Resposta inflamatória na doença de Chagas	5
1.4. A aterosclerose: aspectos gerais e caracterização	5
1.5. A aterosclerose na doença de Chagas	6
2. Objetivos	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. Materiais e Métodos	7
3.1. Animais	7
3.2. Infecção e parasitemia	8
3.3. Quantificação dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e HDL plasmáticos	8
3.4. Quantificação dos níveis de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos	8
3.5. Quantificação dos níveis de lipídeos totais e colesterol total das fezes.....	8
3.6. Ensaio imunoenzimático – ELISA.....	8
3.7. Histologia	9
3.7.1. Análise histopatológica e morfométrica do coração.....	9
3.7.2. Análise histopatológica e morfométrica das lesões aórticas	9
3.8. Análise estatística dos dados	9
4. Resultados e Discussão.....	9
4.1. Mortalidade e parasitemia	10
4.2. Variação do peso corporal	11
4.3. Relação entre o peso do fígado e o peso corporal.....	11
4.4. Dosagem de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos plasmáticos.	12
4.5. Dosagem de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos	14
4.6. Dosagem de lipídeos totais e colesterol total fecal.....	15
4.7. Dosagem plasmática de MCP-1 (CCL2) e RANTES (CCL5).....	15
5. Conclusão	17
6. Referências bibliográficas.....	17

1. Introdução

1.1. A doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) constitui um sério problema de saúde na América Latina, causando aproximadamente 10 mil mortes por ano. Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (WHO, 2010). A incidência tem reduzido devido às campanhas de saúde pública para erradicação do vetor e do melhor controle de qualidade das transfusões de sangue e derivados (Moncayo, 2003 e 2009). Atualmente a questão prioritária está voltada para o contingente de pessoas já infectadas (Medei *et al.*, 2008).

Após a infecção pelo parasito, inicia-se um período de fase aguda que vai de 2 a 4 meses, com mortalidade aproximada de 5% devido basicamente a episódios de miocardite ou meningoencefalite em crianças (Remme *et al.*, 2006). Durante a fase aguda a maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma resposta imune humoral e celular, responsável pela diminuição ou completa ausência dos parasitos no sangue (Prata, 2001). Após a fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* é conduzida para uma fase latente da doença, permanecendo sem manifestação clínica detectável por décadas ou pela vida toda. Por outro lado, alguns indivíduos podem, imediatamente após a fase aguda ou latente, desenvolver sintomas e sinais clássicos como taquiarritmias, bradiarritmias, alterações no sistema nervoso autonômico, alterações na motilidade esofágica e intestinal e eventos progressivos cardiovasculares que podem levar à cardiopatia chagásica crônica (Rocha *et al.*, 2007). Esta apresenta um caráter inflamatório progressivo, fibrosante e debilitante, afetando o arcabouço estrutural e a funcionalidade do coração.

1.2. O *Trypanosoma cruzi*: aspectos biológicos e infecção

O *T. cruzi*, agente etiológico da DC, está entre os mais bem sucedidos protozoários patogênicos devido à sua diversidade populacional, virulência e capacidade de infectar vários tipos celulares (Ramirez *et al.*, 1998). As características de cada cepa do *T. cruzi* podem ter influência no desenvolvimento da doença, visto que algumas penetram mais rapidamente nas células do hospedeiro e são mais susceptíveis aos mecanismos imunes, enquanto outras persistem por mais tempo no sangue periférico, sendo mais resistentes aos fatores imunológicos do hospedeiro (Brener, 1969).

O *T. cruzi* possui uma grande diversidade genética, sendo estudado por diversos marcadores. A interação do parasito com o hospedeiro, os processos de invasão e o desenvolvimento intracelular são importantes na determinação da colonização dos tecidos (Andrade *et al.*, 2010). Em estudos com camundongos inoculados com a cepa Berenice 78 foi observado predomínio de formas largas (Lana e Chiari, 1986), com tropismo para células

cardíacas e esqueléticas (Tafuri e Brener, 1966). Semelhantemente, a cepa Colombiana em camundongos (Federici *et al*, 1964) apresenta predomínio de formas largas ao longo da infecção, tropismo muscular cardíaco e esquelético e altos picos de parasitemia.

1.3. Resposta inflamatória na doença de Chagas

A infecção pelo *T. cruzi* é acompanhada por uma intensa resposta imune, permitindo o controle do parasito e acarretando uma massiva infiltração de células mononucleares nos tecidos atingidos, especialmente no miocárdio, levando à produção local e sistêmica de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, tais como o óxido nítrico (NO) (Aliberti *et al*, 2001; Gazzinelli *et al*, 1998). Assim, a forte ativação de componentes celulares do sistema imune pelo *T. cruzi* pode também resultar em alguns efeitos colaterais (Brener & Gazzinelli, 1997), uma vez que a resposta imune desencadeada pelo parasito, parece ser responsável pelo dano tecidual e destruição neuronal no tecido cardíaco observado na fase aguda da DC (Talvani *et al*, 2000), contribuindo para uma característica marcante dessa: o processo de remodelamento inflamatório cardíaco, cuja fase inicial apresenta-se caracterizada por uma miocardite rica em células T e macrófagos, ausência virtual de parasitos, hipertrofia cardíaca e fibrose (Cunha-Neto *et al*, 2006).

Durante a fase aguda macrófagos e células dendríticas induzem uma forte resposta de células T e anticorpos contra antígenos do *T. cruzi*. Assim, geram-se células T específicas, produtoras de IFN- γ , que migram juntamente com outros leucócitos sanguíneos para o sítio da inflamação induzida pelo *T. cruzi* em resposta a quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 (Teixeira *et al*, 2002). Essa resposta inflamatória leva ao controle do parasitismo tecidual e sanguíneo, embora não ocorra destruição total de todos os parasitos. Já no estágio crônico da infecção, há continuidade da produção de citocinas inflamatórias por células mononucleares, levando a níveis aumentados de TNF- α e IFN- γ no plasma (Cunha-Neto *et al*, 2000; Talvani *et al*, 2004; Ribeirão *et al*, 2000).

1.4. A aterosclerose: aspectos gerais e caracterização

A aterosclerose é uma doença crônico-degenerativa de origem inflamatória que se caracteriza pela gradual diminuição da luz vascular, seguida por uma obstrução das artérias devido ao acúmulo de lipídeos em suas paredes, o que reduz ou impede o fluxo sanguíneo (Lefcovitz, 2001).

Os eventos da aterosclerose têm sido muito esclarecidos por estudos em modelos animais. A avaliação de camundongos deficientes nos receptores de apoE ou a lipoproteína de baixa densidade (LDL) nos permite observar o desenvolvimento de lesões até estágios avançados, sendo os modelos mais utilizados em estudos genéticos e fisiológicos (Ye *et al*,

2011; Rong *et al*, 2012). A apolipoproteína E (apoE) é a principal glicoproteína responsável pelo transporte de lipídeos no organismo, sendo uma constituinte das lipoproteínas VLDL, HDL e quilomícrons (Stryer L, 1995), e a sua regulação é importante no processo aterosclerótico. A primeira mudança identificada na parede da artéria é o acúmulo de partículas de lipoproteínas e seus agregados na íntima das artérias, em locais de predileção da lesão. Neste processo, os monócitos podem se aderir à superfície do endotélio e então migrar através da monocamada endotelial para a íntima, onde eles proliferam, se diferenciam em macrófagos e fagocitam principalmente o LDL oxidado, formando células espumosas. A morte dessas células pode levar a necrose e secreção de elementos fibrosos pelas células do músculo liso, placas oclusivas fibrosas podem se desenvolver e aumentar de tamanho. Inicialmente, as lesões crescem em direção à adventícia até que um ponto crítico é atingido, depois disso começam a se expandir e invadir o lúmen. As lesões continuam a crescer pela migração de novas células mononucleares do sangue, que é acompanhada por proliferação celular, produção de matriz extracelular e do acúmulo de lipídios extracelulares. A aterogênese pode ser vista como uma "resposta à lesão", com lipoproteínas, células inflamatórias e outros fatores de risco como agentes prejudiciais (Lusis, 2000).

1.5. A aterosclerose na doença de Chagas

Além de fatores já estabelecidos para a aterosclerose, como hiperlipidemia, tabagismo, hipertensão, o estilo de vida e a genética do indivíduo (Strocker *et al*, 2004), têm se demonstrado a importância de agravantes como infecções paralelas com acometimento vascular (Portugal *et al*, 2004). Os eventos inflamatórios e as infecções causadas por vírus, bactérias e/ou protozoários aparecem também como importantes fatores de risco para doença aterosclerótica (Portugal *et al*, 2004).

Estudos que caracterizaram o infiltrado celular e a associação da produção de citocinas no coração na infecção experimental pelo *T. cruzi* demonstraram mudanças endoteliais aórticas, como elevada expressão de ICAM-1, IL-6 e TNF-alfa, com um infiltrado inflamatório na adventícia, composto principalmente por células CD4+, células CD8+ e macrófagos (Sunnemark *et al*, 1996). Neste contexto, os paralelos entre a resposta inflamatória descrita durante a infecção pelo *T. cruzi* e a resposta inflamatória envolvida na patogênese da aterosclerose geraram questionamentos sobre a interferência do parasito no desenvolvimento e progressão das lesões arteriais em chagásicos.

Levando em conta tais fatos, além de ampliar o entendimento sobre como a infecção pelo *T. cruzi* pode interferir no perfil patológico da aterosclerose, este estudo também busca compreender a interferência da variabilidade genética do parasito junto a seu hospedeiro,

elementos essenciais para estudos futuros envolvendo a resposta inflamatória cardiovascular e o tratamento farmacológico da DC.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a interferência de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas aórticas em camundongos selvagens e *knockout*^(-/-) para apolipoproteína E.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a interferência da apoE na infecção pelo *T. cruzi*, mortalidade e a variação do peso dos animais;
- Verificar os níveis hepáticos de lipídeos totais e de colesterol, após a infecção pelo *T. cruzi* em animais apoE^{-/-} e selvagens.
- Verificar os níveis de lipídeos totais e de colesterol presentes no conteúdo fecal dos camundongos apoE^{-/-} e selvagens após a infecção pelo *T. cruzi*;
- Determinar os níveis sanguíneos de colesterol total, triglicerídeos e colesterol HDL, em camundongos apoE^{-/-} e selvagens por meio da dosagem enzimática;
- Avaliar, por ensaio imunoenzimático, as quimiocinas CCL2 e CCL5 em associação com a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos apoE^{-/-} e selvagem;
- Avaliar histologicamente os parâmetros inflamatórios e de remodelamento no coração e no arco aórtico.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 56 camundongos machos e fêmeas C57BL/6, com 10 semanas de idade e com peso aproximado de 21g. Destes, 28 animais eram apoE^{-/-} e 28 selvagens. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da UFV. Durante todo o período experimental a alimentação dos animais foi através de ração comercial para camundongos e água *ad libitum*. Observaram-se a mortalidade, o peso e a relação entre o peso do fígado e o do animal.

Todos os procedimentos realizados nesse experimento estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFV, protocolo número 08/2011.

3.2. Infecção e parasitemia

Os camundongos foram separados nos seguintes grupos experimentais: (I) 10 animais apoE^{-/-} infectados com a cepa Berenice 78 do *T. cruzi*, (II) 10 animais selvagens infectados com a cepa Berenice 78, (III) 10 animais apoE^{-/-} infectados com a cepa Colombiana, (IV) 10 animais selvagens infectados com a cepa Colombiana, (V) 8 animais apoE^{-/-} não infectados e (VI) 8 animais selvagens não infectados. Apenas os grupos infectados foram inoculadas, por via intraperitoneal, 100 formas tripomastigotas das determinadas cepas. Após confirmação da infecção dos animais foi realizada parasitemia, através da coleta de sangue e contagem direta dos parasitos circulantes, de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

3.3. Quantificação dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e HDL plasmáticos

Foram dosados os níveis de colesterol total, triglicerídeos (TG) e HDL do plasma dos animais antes e 30 dias após a infecção. As determinações de colesterol total, TG e HDL foram realizadas baseando no método enzimático colorimétrico utilizando os Kits enzimáticos colesterol total, TG e HDL (Liquiform, Labtest – Belo Horizonte).

3.4. Quantificação dos níveis de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos

Durante a eutanásia o fígado dos animais foi removido e mantido a -80°C até a realização das dosagens. Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de Folch *et al.* (1957). Os níveis de colesterol e derivados, assim como os do plasma, foram determinados através do método enzimático colorimétrico utilizando os Kits enzimáticos específicos (Liquiform, Labtest – Belo Horizonte).

3.5. Quantificação dos níveis de lipídeos totais e colesterol total das fezes

Durante a eutanásia as fezes foram retiradas do ceco dos animais e foi armazenada em freezer -80°C até a realização das dosagens. A quantificação dos lipídeos fecais foi realizada pelo método de Folch *et al.* (1957) e os níveis de colesterol foram determinados através do método enzimático colorimétrico utilizando os Kits enzimáticos específicos (Liquiform, Labtest – Belo Horizonte).

3.6. Ensaio imunoenzimático – ELISA

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando-se plasma dos animais. Para o ensaio foram utilizados kits para detecção das quimiocinas CCL2 e CCL5 (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA). A quantificação das citocinas presentes nas amostras foi determinada utilizando a densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas das

citocinas seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente foram analisadas pelo *software SOFTmax PRO 4.0*.

3.7. Histologia

Durante a eutanásia os corações, juntamente com as aortas, foram removidos e preservados em formol tamponado 10%. Os corações fixados foram processados e incluídos em parafina. Estes ainda serão cortados e corados.

3.7.1. Análise histopatológica e morfométrica do coração

Para a quantificação da inflamação na área cardíaca e da área dos ninhos de amastigota do *T. cruzi*, o tecido cardíaco será avaliado através de histologia convencional. Secções com 4µm de espessura serão corados através da técnica de Hematoxilina & Eosina e Tricrômico de Gomori e submetidos a análise em microscopia óptica.

3.7.2. Análise histopatológica e morfométrica das lesões aórticas

Os corações já fixados foram cortados transversalmente sob visão estereoscópica, ao nível da borda atrial inferior direita, de modo a obter um fragmento contendo a porção proximal do coração e a raiz da aorta. Posteriormente este fragmento foi separado em três partes, tomando-se como referência a porção proximal do coração. Estas partes foram processadas e incluídas em parafina, mas ainda serão feitos cortes que serão submetidos à coloração com Hematoxilina & Eosina e à análise em microscopia óptica. Além disso, o colágeno extracelular presente nas lesões ateroscleróticas será visualizado utilizando-se de cortes histológicos corados Tricrômico de Gomori. Assim, depois de submetidos à análise em microscopia óptica, buscar-se-á tentar quantificar o colágeno através da porcentagem de colágeno/área de lesão.

3.8. Análise estatística dos dados

Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5.0b* e os dados foram analisados pelo teste OneWay ANOVA para múltiplas comparações (Tukey test). As diferenças foram consideradas significativas se o p foi igual ou menor que 0,05.

4. Resultados e Discussão

O camundongo apoE *knockout* (-/-) é um modelo animal muito utilizado nos estudos de aterosclerose e hiperlipidemia (Portugal *et al*, 2004; Peluzio *et al*, 2001). Este animal apresenta uma disfunção endotelial inata, apresentando altos níveis de colesterol circulante e formação de placa ateromatosa. Tais fatos fazem com que este modelo animal tenha propensão à formação de placas ateromatosas, já que a apolipoproteína E (apoE) é um

importante componente estrutural de algumas lipoproteínas, desempenhando um papel funcional no clearance das lipoproteínas plasmáticas e afetando a homeostase do colesterol (Meir *et al*, 2004). Algumas doenças crônicas e/ou infecções que predisõem lesões vasculares encontram nesse modelo animal um potencial campo de estudo, a citar as alterações microvasculares desencadeadas após a infecção pelo *T. cruzi*.

Como alterações patológicas que caracterizaram o primeiro registro de comprometimento microvascular na doença de Chagas, temos alterações na permeabilidade dos capilares cardíacos, congestão, estase, infiltração por células mononucleares e vasoconstricção. Pequenos e grandes vasos podem ser afetados e microscopicamente associados a uma resposta inflamatória predominantemente mononuclear, observando-se focos de necrose e degeneração miocárdica com concomitante fibrose intersticial (Rossi *et al*, 2010; Prado *et al*, 2011). Neste contexto, nosso trabalho demonstra pela primeira vez o estudo da relação entre a infecção experimental pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento de lesões vasculares ateroscleróticas em camundongos apoE^{-/-}.

4.1. Mortalidade e parasitemia

Ao se avaliar a cepa Be 78 inoculada nos animais selvagens e apoE^{-/-}, estes apresentaram menores níveis de parasitemia em relação à cepa Colombiana (figura 1) na última semana do estudo. Além disso, nos grupos apoE^{-/-} e selvagem infectados com a cepa Colombiana foram observadas diferenças significativas nos dias 19, 25 e 26 pós infecção em relação aos demais grupos infectados. O período pré-patente foi menor nos animais selvagens (dia 9), em relação aos animais infectados apoE^{-/-} (dia 12).

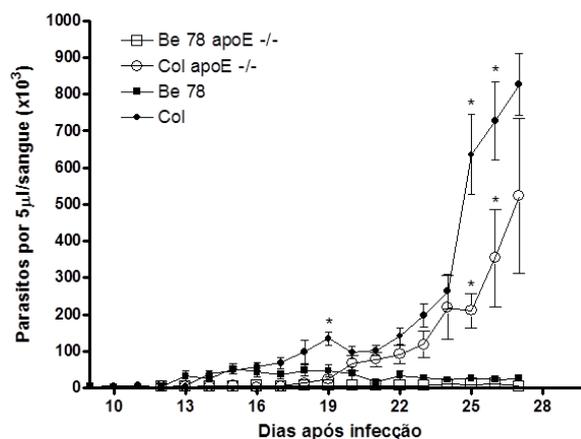


Figura 1. Curva de parasitemia. Be78 apoE^{-/-}: *Knockout* para apolipoproteína E infectado com Berenice 78; Col apoE^{-/-} *Knockout* para apolipoproteína E infectado com Colombiana; Be 78: tipo selvagem infectado com Berenice 78; Col: tipo selvagem infectado com Colombiana. Os dados acima foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (Tukey test), sendo significativo o $p < 0.05$.

As taxas de mortalidade foram determinadas para cada grupo de animais (Figura 2). Detectou-se mortalidade apenas nos grupos infectados pela cepa Colombiana, sendo que no grupo selvagem ocorreu no 9º dia de infecção e no grupo apoE -/- ocorreu no 25º dia.

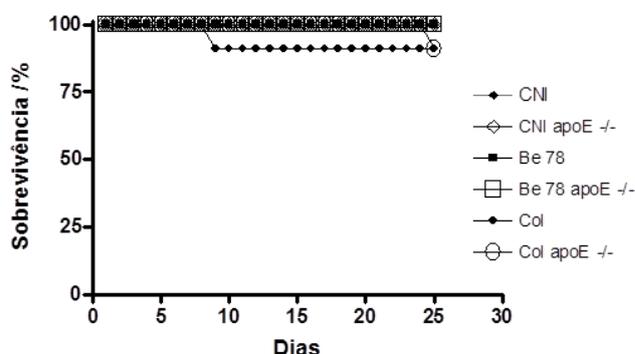


Figura 2. Curva de sobrevivência durante 25 dias. CNI: Controle não infectado; CNI apoE -/-: Controle não infectado *knockout* para apolipoproteína E; Be 78 apoE -/-: *Knockout* para apolipoproteína E infectado com Berenice 78; Col apoE -/-: *Knockout* para apolipoproteína E infectado com Colombiana; Be 78: tipo selvagem infectado com Berenice 78; Col: tipo selvagem infectado com Colombiana. Os dados acima foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (Tukeytest), sendo significativo o $p < 0.05$.

4.2. Variação do peso corporal

Como pode ser observado na tabela 1, não foram observadas diferenças na variação do peso corporal entre os grupos.

Tabela 1. Média de peso (em gramas) de animais da linhagem C57BL6 selvagem ou apoE -/- não infectados, infectados com as cepas Berenice 78 (Be 78) e Colombiana do *Trypanosoma cruzi* durante quatro semanas.

	Semanas (Média \pm SEM)			
	1ª	2ª	3ª	4ª
CNI	24,5 \pm 0,89	23,4 \pm 0,41	23,7 \pm 0,72	23,2 \pm 0,40
Be78	24,2 \pm 0,91	24,3 \pm 0,93	23,9 \pm 0,96	23,6 \pm 0,89
Col	23,3 \pm 0,95	24,1 \pm 0,40	24,9 \pm 0,46	21,7 \pm 0,56
CNI apoE -/-	21,9 \pm 0,81	23,8 \pm 0,78	24,7 \pm 0,74	25,0 \pm 0,56
Be78 apoE -/-	21,1 \pm 0,87	21,8 \pm 0,87	22,9 \pm 0,96	24,2 \pm 0,96
Col apoE -/-	20,8 \pm 0,58	21,9 \pm 0,65	23,4 \pm 0,76	22,6 \pm 0,91

Os dados foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (Tukeytest), sendo significativo o $p < 0.05$. CNI: Controle não infectado; Col: cepa Colombiana; Be 78: cepa Berenice 78; CNI apoE -/-: controle não infectado *knockout* para apolipoproteína E; Be78 apoE -/-: infectado com Berenice 78 *knockout* para apolipoproteína E; Col apoE -/-: infectado com Colombiana *knockout* para apolipoproteína E

4.3. Relação entre o peso do fígado e o peso corporal

Na tabela 2, encontra-se descrita a média da relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais na 4ª semana de experimento. No grupo de animais infectados com cepa Colombiana foram observados valores estatisticamente mais elevados desta relação, sendo que nos demais grupos essa relação foi similar.

Bouzahzah *et al*, 2006, ao fazer análises histopatológicas do fígado de camundongos infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda, observou danos no tecido consequentes a infecção pelo parasito como intensa vasculite, células inflamatórias e microabcessos, apesar de não se observar fibrose no estágio crônico. Ainda segundo este autor, a infecção pelo *T. cruzi* resultaria na ativação de proteínas kinases extracelulares reguladoras de sinal e ciclinas que estão envolvidas na proliferação celular e podem contribuir para os processos de reparação após lesão hepática, observados na fase crônica. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação do ciclo celular, reparo e remodelação após a infecção por *T. cruzi* nos hepatócitos ainda não foram identificados. Assim, os valores estatisticamente elevados nos grupos infectados com a cepa Colombiana podem ser explicados pelo fato desta cepa ser altamente virulenta e capaz de ocasionar mais alterações na fase aguda, o que promoveria danos hepáticos mais intensos.

Tabela 2. Média da relação entre o peso do fígado e o peso corporal dos animais da linhagem C57BL6 selvagem ou apoE -/- não infectados, infectados com as cepas Berenice 78 (Be 78) e Colombiana do *Trypanosoma cruzi* durante quatro semanas.

Grupos	Valores (Média ± SEM)	Grupos	Valores (Média± SEM)
CNI ^a	0,048 ± 0,001	CNI ApoE-/- ^a	0,053 ± 0,001
Be78 ^{a,b}	0,058 ± 0,002	ApoE-/- Be78 ^a	0,044 ± 0,006
Col ^b	0,062 ± 0,003	ApoE-/- Col ^b	0,057 ± 0,004

Os dados foram apresentados como média+/- SEM e analisados por OneWay ANOVA (Tukeytest), sendo significativo o $p < 0.05$. Letras diferentes significam diferença entre os grupos. CNI: Controle não infectado; Col: cepa Colombiana; Be78: cepa Berenice 78; CNI apoE -/-: controle não infectado *knockout* para apolipoproteína E; Be78 apoE -/-: infectado com Berenice 78 *knockout* para apolipoproteína E; Col apoE -/-: infectado com Colombiana *knockout* para apolipoproteína E.

4.4. Dosagem de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos plasmáticos.

Ao se avaliar os níveis de colesterol total, foi observado que quando a apoE é ausente os valores estavam mais elevados, tanto antes (tabela 3) quanto após a infecção (figura 3A). Sabendo que a concentração do colesterol hepático depende da absorção no fígado de lipoproteínas (via receptores de LDL e LRP), da síntese de colesterol (via atividade da enzima HMG CoA redutase) e da síntese de ácido biliar, nossa hipótese é de que a infecção pelo *T. cruzi* afetaria a estrutura celular hepática e consequentemente interferiria no metabolismo e na liberação de lipoproteínas. Existe uma forte relação entre os níveis plasmáticos de colesterol e mortalidade por doença aterosclerótica, sendo que o risco para o desenvolvimento da aterosclerose aumenta progressivamente em função de níveis mais elevados de colesterol na corrente sanguínea (Lusis, 2000; Navarro, 2002).

Nos animais predispostos à hipercolesterolemia devido à ausência do gene apoE, observamos valores menores de colesterol HDL antes (tabela 3) e após a infecção (figura 3B) no grupo apoE^{-/-} quando comparados aos animais selvagens. Similar aos nossos animais predispostos à hipercolesterolemia devido à ausência do gene apoE, Souza *et al*, 2009, ao submeter ratos a uma dieta hipercolesterolêmica observou que os animais apresentavam altos níveis de colesterol total e baixos níveis de colesterol HDL, com reduzidos níveis de triglicérides. No entanto, podemos ressaltar que somente a infecção pela cepa Colombiana influenciou os níveis lipídicos de triglicérides no plasma dos animais apoE^{-/-} (figura 3C). Em relação aos demais parâmetros a genética do hospedeiro foi predominante.

Tabela 3. Média dos níveis de colesterol total, colesterol HDL e triglicérides dos animais da linhagem C57BL6 selvagem ou apoE^{-/-} antes da infecção.

	Resultados (Média ± SEM)	
	Animais apoE ^{-/-}	Animais selvagens
Colesterol total inicial	276,50 ± 29,13	83,48 ± 6,04
Colesterol HDL inicial	13,71 ± 0,26	28,39 ± 2,96
Triglicérides iniciais	71,51 ± 4,26	76,16 ± 4,06

Animais apoE^{-/-}: *knockout* para apolipoproteína E.

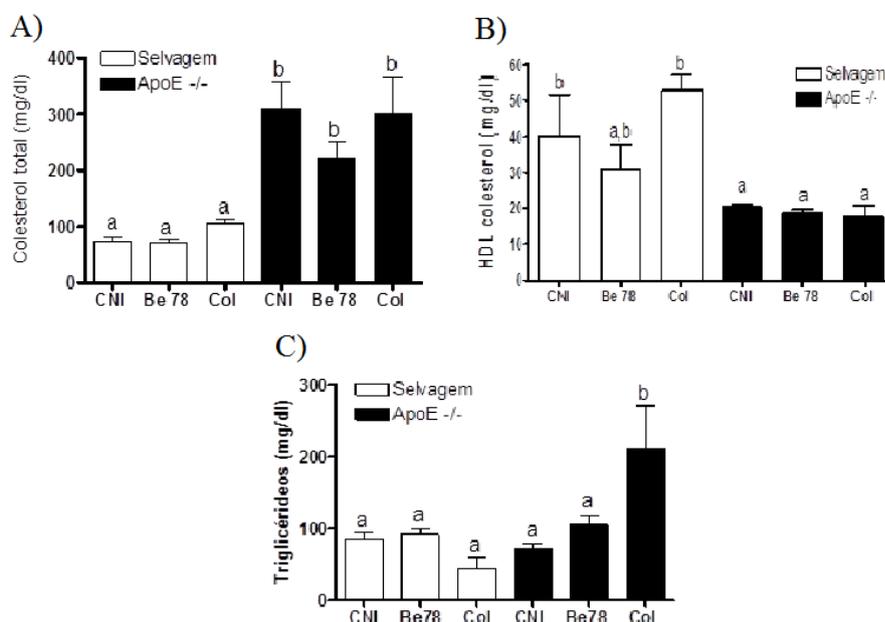


Figura 3. Avaliação do colesterol total, triglicérides e HDL plasmáticos após 27 dias de infecção. Colesterol total (A), triglicérides (B) e HDL (C) no soro dos animais *Knockout* para apoE e selvagem, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Os dados acima foram apresentados como média +/- SEM e analisados por OneWay ANOVA (*Tukeytest*), sendo significativo o $p < 0.05$. Letras diferentes significam diferença entre os grupos. CNI: controle não infectado; Be 78: infectado com Berenice 78; Col: infectado com Colombiana; apoE^{-/-}: camundongo *knockout* para apolipoproteína E.

Existe uma forte relação entre os níveis plasmáticos de colesterol e mortalidade por doença aterosclerótica, sendo que o risco para o desenvolvimento da aterosclerose aumenta progressivamente em função de níveis mais elevados de colesterol na corrente sanguínea (Lusis, 2000; Navarro, 2002). Sendo assim, a análise do colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos torna-se um importante instrumento para a avaliação funcional de doenças como a aterosclerose.

4.5. Dosagem de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos

Ao se avaliar os lipídeos hepáticos totais observou-se uma redução de sua concentração nos animais apoE $-/-$ infectados com ambas as cepas do *T. cruzi* quando comparados com o animais apoE $-/-$ não infectados (Figura 4A). Por outro lado, quando avaliado o colesterol total hepático nesses animais, observou-se que a presença da cepa Be78 no grupo apoE $-/-$ foi capaz de reduzir sua concentração plasmática (Figura 4B), sendo que o grupo de apoE $-/-$ infectado com a cepa Colombiana do *T.cruzi* permaneceu com níveis similares aos dos animais apoE $-/-$ não infectados. Finalmente, a presença de ambas as cepas do parasito reduziram drasticamente os níveis de triglicerídeos hepáticos nos animais apoE $-/-$, sendo os valores menores encontrados associados à cepa Colombiana do *T. cruzi* (Figura 4C). Assim, sugere-se que tanto a infecção pelo *T. cruzi* quanto a ausência da apoE são capazes de interferir nas concentrações hepáticas de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos.

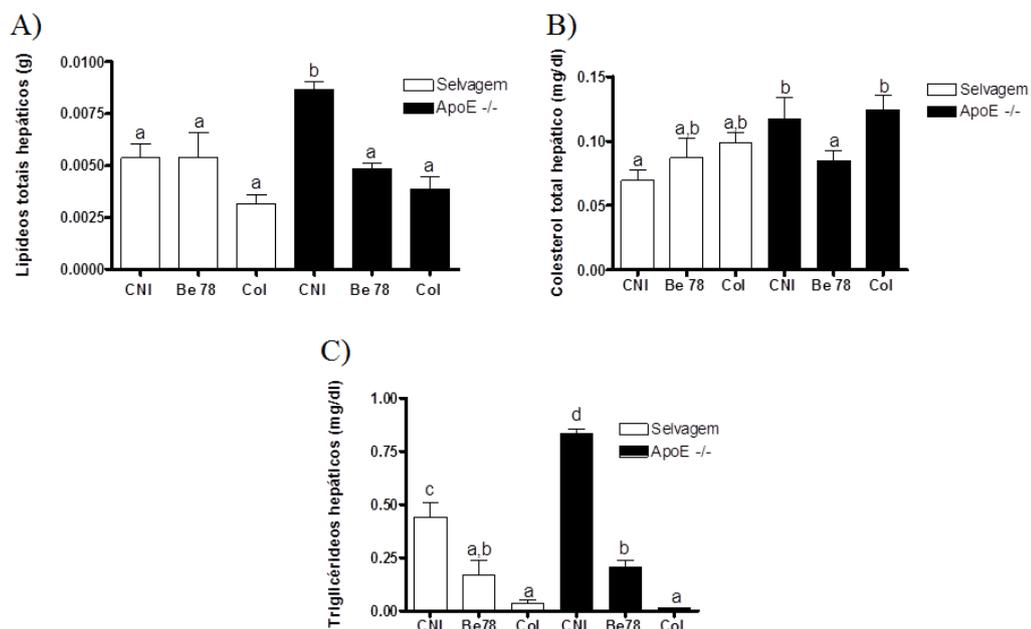


Figura 4. Avaliação de lipídeos totais, colesterol total e triglicerídeos hepáticos. Lipídeos totais (A), colesterol total (B) e triglicerídeos (C) no fígado de animais C57BL6 selvagens e apoE $-/-$ (*knockout*). Os dados acima foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (*Tukeytest*), sendo significativo o $p < 0.05$. Letras diferentes significam diferença entre os grupos. CNI: controle não infectado; Be 78: infectado com Berenice 78; Col: infectado com Colombiana; ApoE $-/-$: camundongo *knockout* para apolipoproteína E.

4.6. Dosagem de lipídeos totais e colesterol total fecal.

Ao se avaliar os lipídeos totais fecais, nos animais não infectados observou-se maiores valores no grupo apoE $-/-$ em relação ao selvagem (Figura 5A). A cepa Berenice 78 elevou os níveis de lipídeos totais fecais nos animais selvagens, enquanto a cepa Colombiana elevou os níveis nos animais apoE $-/-$ (figura 5A). Em relação ao colesterol total fecal observamos diferença significativa apenas no grupo apoE $-/-$ infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Figura 5B).

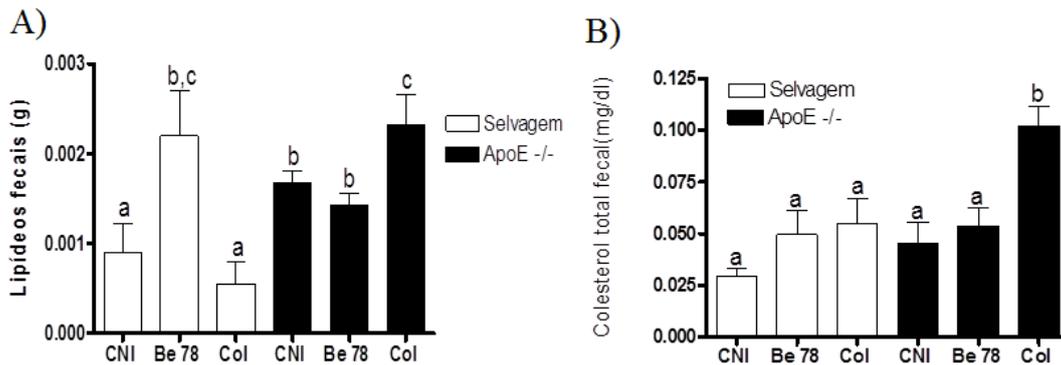


Figura 5. Avaliação de lipídios e colesterol total fecal. Lipídeos totais (A) e colesterol total (B) nas fezes dos animais *Knockout* para apolipoprotina E e selvagem, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Os dados acima foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (Tukeytest), sendo significativo o $p < 0.05$. Letras diferentes significam diferença entre os grupos. CNI: controle não infectado; Be 78: infectado com Berenice 78; Col: infectado com Colombiana; ApoE KO: camundongo *knockout* para apolipoproteína E.

Diferentemente dos nossos resultados, no estudo de Portugal *et al* 2004 e 2006 não foram encontradas diferenças nos níveis de colesterol fecal em camundongos apoE $-/-$ infectados pelo *Toxoplasma gondii* e colonizados pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii*, respectivamente. Uma elevação na excreção fecal pode indicar uma menor absorção ou assimilação de colesterol no intestino (Manzoni *et al*, 2008), já que a maior parte do colesterol sintetizado endogenamente e oriundo da dieta é convertido em ácidos biliares e excretado nas fezes. Entretanto, mais estudos são necessários para se entender o envolvimento do *T. cruzi* neste processo.

4.7. Dosagem plasmática de MCP-1 (CCL2) e RANTES (CCL5)

A produção de CCL2 foi elevada nos animais infectados para ambas as cepas (Figura 6A). Do mesmo modo, ao se avaliar a produção de CCL5, observamos maiores níveis nos grupos infectados em comparação aos não infectados (Figura 6 B). Na ausência da apoE observamos menores valores para o grupo infectado pela cepa Be 78 do *T. cruzi*, quando comparado ao infectado pela cepa Colombiana nas dosagens tanto de CCL2 quanto CCL5.

O aparecimento de células inflamatórias no epitélio vascular no local da lesão é um dos primeiros fatores observados nos danos causados pela aterosclerose. A localização de células

T ativas e macrófagos em lesões ateroscleróticas recentes e maduras sugerem que a imunidade celular tem um papel importante na patogenia aterosclerótica (Lusis, 2000). Em modelos animais de infecção pelo *T. cruzi* já foi descrita a participação de algumas citocinas como IFN-gama, TNF-alfa, IL-10 e quimiocinas como CCL2/MCP1, CCL3/MIP1-alfa, CCL5/RANTES no plasma e coração de camundongos infectados (Talvani *et al*, 2000). Em nosso trabalho foi observada uma elevação nos níveis das quimiocinas CCL2 e CCL5 nos animais infectados pelas cepas Be 78 e Colombiana do *T. cruzi*, tanto para os animais apoE^{-/-} quanto selvagens. Dentre os animais infectados, apenas os apoE^{-/-} inoculados com a cepa Be 78 mostraram menores níveis séricos desses mediadores. Corroborando com os resultados, Guedes 2010, ao estudar cães infectados pelo *T. cruzi*, observou um aumento significativo de citocinas no soro e tecido cardíaco destes animais, apresentando níveis variados para as diferentes cepas estudadas. Em conjunto, estes dados reforçam uma estreita relação entre a população de *T. cruzi* e a resposta imune do hospedeiro diante da infecção.

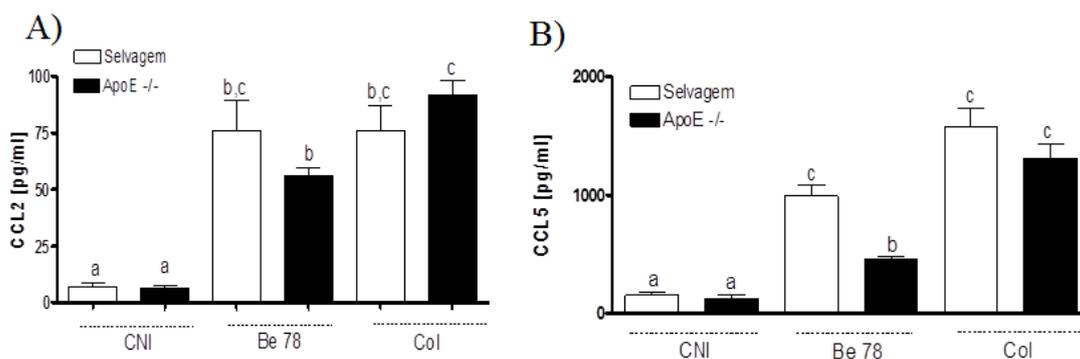


Figura 6. Síntese de MCP-1-CCL2 e RANTES-CCL5. Ensaios imunoenzimáticos foram realizados no plasma para CCL2 (A), e CCL5 (B) em animais C57BL6 *knockout* (-/-) para apolipoproteína E e selvagens. Os dados acima foram apresentados como média \pm SEM e analisados por OneWay ANOVA (*Tukeytest*), sendo significativo o $p < 0.05$ para letras diferentes. CNI: controle não infectado; Be 78: infectado com Berenice 78; Col: infectado com Colombiana; ApoE^{-/-}: camundongo *knockout* para apolipoproteína E.

Em nosso estudo o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco ainda será avaliado, mas já é conhecido que a cepa Colombiana apresenta tropismo muscular cardíaco e esquelético, com grande inflamação tecidual, levando a altas taxas de mortalidade (Talvani *et al*, 2000). Além disso, em relação à cepa Be 78, Guedes *et al* 2010 observou que durante a fase crônica, cães infectados por esta cepa que não possuíam fibrose ou inflamação e apresentavam maiores níveis de IL-10, o que poderia contribuir para uma melhor regulação entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

5. Conclusão

Neste trabalho correlacionamos a infecção experimental pelo *T. cruzi* e a interferência do gene da apolipoproteína E (apoE) no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Até o presente momento, foi possível concluir que:

- Na ausência da apoE os animais infectados pelo *T. cruzi* apresentaram diminuição da parasitemia com aumento do período pré-patente;
- Os níveis de colesterol total plasmático apresentaram-se elevados nos animais apoE -/- independentemente de estarem infectados ou não;
- A infecção pelo *T. cruzi* reduziu os níveis hepáticos de lipídeos totais e triglicérides em animais apoE -/-;
- A cepa Colombiana interferiu nos níveis de colesterol total fecal, elevando-os nos animais apoE -/-;
- Verificou-se que, na ausência da apoE, a síntese de CCL5 e CCL2 foi reduzida na infecção com a cepa Be78, mas não com a cepa Colombiana.

Entretanto, este estudo ainda está em andamento. As análises histopatológicas dos tecidos cardíaco e aórtico de todos os animais, além de sua correlação e interpretação com os demais resultados obtidos, ainda serão realizadas. Assim, a análise e compreensão da interferência da apoE na patogênese cardíaca da DC, associado à variabilidade genética do parasito, constituirão importantes elementos para estudos futuros envolvendo a resposta inflamatória cardiovascular e tratamentos farmacológicos para a DC.

6. Referências bibliográficas

- Aliberti JCS, Souto JT, Marino APMP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 2001; 158, 1433-1440, 2001.
- Andrade LO, Galvão LMC, Meirelles MNSL, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010; 6:105.
- Bouzahzah B, Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Krishnamachary M, Factor SM, Cohen AW, *et al.* Cell cycle regulatory proteins in the liver in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Cycle.* 2006; 5:2396-400.

- Brener Z & Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997; 114, 103-110.
- Brener Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann of Trop. Med. And Parasit.* 1969; 63:2.
- Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo.* 1962; v.4, p.389-96.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity.* 2006; 39, 41-54.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104, 252-258.
- Federici EE, Abelmann WH, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964; 13:272-280.
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J of Biol Chem.* 1957; 226,497-509.
- Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, *et al.* Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 1998; 31, 89-104.
- Guedes PM, Veloso VM, Talvani A, Diniz LF, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA, *et al.* Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 138:106-13.
- Lana M, Chiari C A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986; 81:247-253.
- Lefkovitz RJ.; Willerson JT. Prospects for the cardiovascular research. *JAMA.* 2001; 285:581-587.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407:233-41.
- Manzoni MSJ, Cavallini DCU, Rossi EA. Efeitos do consumo de probióticos nos lipídeos sanguíneos. *Alim. Nutr.* 2008; 19: 351-360.

- Medei EH, Nascimento JHM, Pedrosa RC, Carvalho ACC. Role of autoantibodies in the physiopathology of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 91:257-62.
- Meir K, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: a decade of progress. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* 2004; 24:1006-1014.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 17-30.
- Moncayo A. Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98:5.
- Navarro SC, Conegero CI. Os fatores de risco da doença aterosclerótica. *Arq Ciênc saúde Unipar.* 2002; 6: 151-156
- Portugal LR, Fernandes LR, Cesar GC, Santiago HC. Infection with *Toxoplasma gondii* increase atherosclerotic lesion in apoE deficient mice. *Infection and Immunity.* 2004; 3571-3576.
- Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA. *The vasculature in chagas disease.* *Adv Parasitol.* 2011; 76:83-99.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.* 2001; 1, 92-100.
- Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages Silva E. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31:99-102.
- Remme JHF, Feenstra P, Lever PR, Medici AC, Morel CM, Noma M, *et al.* Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy. *Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2006; 22, 433-447.
- Ribeirão M, Pereira-Chioccola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite. Immunol.* 2000; 22, 49-53.
- Rocha MOC, Teixeira MM, Ribeiro AL. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5:727-43.
- Rong S, Cao Q, Liu M, Seo J, Jia L, Boudyguina E, Gebre AK, Colvin PL, Smith TL, Murphy RC, Mishra N, Parks JS. Macrophage 12/15 lipoxygenase expression increases plasma and hepatic lipid levels and exacerbates atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2012.

- Rossi MA, Carobrez SG. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *BrJ Exp Pathol.* 1985; 66:155-60.
- Souza ML, Silva M, Silva ME, Oliveira RP, Pedrosa ML. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2009; 1-7.
- Strocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidatives modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84:1384-1478.
- Stryer L. Biochemistry. 4th edition. New York (NY); W.H. Freedman and Company; 1995.
- Sunnermark D, Andersson R, Harris R A , Jeddi-Tehrani M, Orn A. Enhanced prevalence of T cells expressing TCRBV8S2 and TCRBV8S3 in hearts of chronically *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol Lett.* 1996; 60:171-7.
- Tafuri W L, Brener Z. Lesions of the autonomic nervous system of the white mouse in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1966; 8:177-83.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, *et al.* Kinetic of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy – tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection.* 2000; 2: 851-866.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38, 943-950.
- WHO, Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. 2010.
- Ye D, Zhao Y, Hildebrand RB, Singaraja RR, Hayden MR, Van Berkel TJ, Van Eck M. The dynamics of macrophage infiltration into the arterial wall during atherosclerotic lesion development in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Am J Pathol.* 2011; 178:413-22.