



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICA
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Alterações inflamatórias induzidas pelo tratamento com
Cloridrato de Amiodarona em modelo experimental da
infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Beatriz Cristina Silveira Salles

Ouro Preto, MG
Julho 2014

Alterações inflamatórias induzidas pelo tratamento com Cloridrato de Amiodarona em modelo experimental da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Beatriz Cristina Silveira Salles

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: imunobiologia de protozoários.

Orientador: Prof. André Talvani

Ouro Preto, MG
Julho de 2014

S159a

Salles, Beatriz Cristina Silveira.

Alterações inflamatórias induzidas pelo tratamento com cloridrato de amiodarona em modelo experimental da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Beatriz Cristina Silveira Salles. - 2014.

51f.: il.: color; graf.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani.

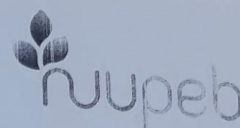
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Area de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi*- Teses. 2. Imunologia. 3. Medicamentos-Administração. 4. Cloridrato de amiodarona. I. Talvani, André. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



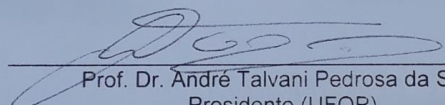
**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

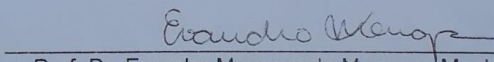
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

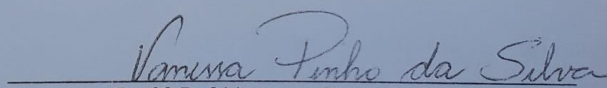
“Alterações inflamatórias induzidas pelo tratamento com Cloridrato de Amiodarona em modelo experimental da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*”

Aos vinte e cinco dias do mês de julho de 2014, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Beatriz Cristina Silveira Salles**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por *A. Aprovar* a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

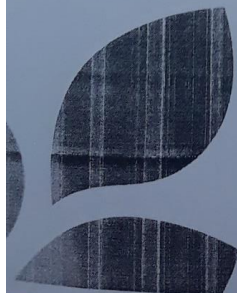
Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva
Presidente (UFOP)


Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
Examinador (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Vanessa Pinho da Silva
Examinadora (UFMG)

DATA DA DEFESA: **25/07/2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br

Dedicatória



*Em memória do meu avô Antônio Salles falecido em
decorrência da infecção pelo Trypanosoma cruzi*

Agradecimentos

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, o meu sincero e carinhoso muito obrigado.

Citação



Resumo

A doença de Chagas se desenvolve após a infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Este parasito desencadeia uma resposta imune em seu hospedeiro mamífero mediado por células, anticorpos e mediadores inflamatórios, culminando em destruição do tecido e perda funcional do órgão, a exemplificar, o coração e o trato gastrointestinal em humanos. Fármacos com o intuito de amenizar os danos funcionais cardíacos têm sido empregados na clínica médica e, nos últimos anos, também identificadas suas ações sob a resposta imune. Dentre estes fármacos, encontra-se o antiarrítmico Cloridrato de Amiodarona (CA). O objetivo deste estudo é avaliar a ação do tratamento com o CA na infecção aguda pela cepa VL-10 do *T. cruzi* em modelo murino. Para tal, realizou-se a infecção de camundongos C57BL/6, agrupados em (i) animais tratados com 30mg/kg de CA diariamente e (ii) animais tratados com PBS 1x + metilcelulose 0,5% (veículo). Após 30 dias de tratamento, realizou-se a necrópsia e coleta de soro e órgãos (coração, fígado e baço) para a dosagem de citocinas e avaliação do peso relativo dos órgãos, respectivamente, além de análise histológica. Observou-se redução nos níveis dos parasitas sanguíneos ao final do tratamento e redução dos níveis plasmáticos e cardíacos de TNF- α e CCL2, mas não de CCL5 e IL-10. Além disso, observou-se menor aumento do peso relativo do coração e baço associado ao tratamento com CA. Estes dados sugerem uma ação parcial do CA sobre *T. cruzi* e a resposta imune do hospedeiro, principalmente mediada por TNF- α e CCL-2, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, cepa VL-10, em animais isogênicos C57BL/6.

Abstract

Chagas disease is a clinical condition developed after *Trypanosoma cruzi* infection. This parasite triggers an immune response mediated by immune cells, antibodies, and inflammatory mediators from mammalian host resulting in tissue destruction and loss of function in different organs, such as heart and gastrointestinal tract observed in humans. Drugs used to mitigate the functional cardiac damage have been used in clinical medicine and, in recent years, also demonstrated their actions in the modulation of the immune response. Among these drugs the antiarrhythmic amiodarone (AD) is evidenced. The aim of this study is to evaluate the effect of the AD treatment in acute infection with *T. cruzi* VL-10 strain in murine model. C57BL/6 mice were grouped into (i) animals treated with 30mg/kg daily with AD and (ii) animals treated with water + 5% methylcellulose (vehicle). After 30 days of treatment, we performed a necropsy and serum and organs (heart, liver and spleen) were collected for cytokines and organ weights evaluations, respectively, and also histological analysis. There was a reduction in the levels of blood parasites after the treatment in parallel with a reduction of plasma and cardiac levels of TNF- α and CCL2, but not CCL5 and IL-10. In addition, there was a smaller increase in the relative weight of the heart and spleen associated with treatment with AD. Together, these data suggest a partial action of the AD on the immune response, mainly in TNF- α and CCL-2 production during inbred C57BL/6 mice experimentally infected with VL-10 strain of *T. cruzi*.

Sumário

1. Introdução	2
1.1. A doença de Chagas	2
1.2. Resposta imune à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3. Terapêuticas anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.4. O cloridrato de amiodarona	8
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo geral:	11
3.2. Objetivos específicos:	11
4. Material e Métodos	13
4.1. Animais de experimentação	13
4.2. Infecção experimental pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratamento farmacológico.....	13
4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	14
4.4. Histologia convencional	15
4.5. Análise estatística	16
5. Resultados	18
5.1. Efeito do cloridrato de amiodarona no parasitismo sanguíneo	18
5.2. Avaliação do peso relativo dos órgãos	19
5.3. Avaliação dos marcadores inflamatórios plasmáticos.....	20
5.3. Dosagens dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco	21
5.4. Análise histológica	24
6. Discussão.....	26
7. Conclusão.....	32
8. Referências Bibliográficas	34

Lista de Figuras

Figura 1: Resposta imune do hospedeiro desencadeada pela infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2 :Curva de parasitemia dos animais tratados e não tratados com Cloridrato de Amiodarona.	18
Figura 3: Peso relativo dos órgãos.....	19
Figura 4: Quantificação dos marcadores inflamatórios no plasma dos animais.....	20
Figura 5: Quantificação dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco.....	21
Figura 6: Correlação entre os marcadores inflamatórios no tecido cardíaco.	22
Figura 7: Correlação entre os marcadores inflamatórios no tecido cardíaco.	23
Figura 8: Fotomicrografia do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com o cloridrato de amiodarona.	24

Lista de Abreviações

°	Grau	OPD	<i>phenylenediamine</i>
X	Veze	PCR	Reação em Cadeia Polimerase
%	Percentual	RPM	Rotações por minuto
µm	Micrometro	TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
µg	Micrograma	pg	picogramas
µl	Microlitros	CCL2	MCP 1
BSA	Albumina de soro fetal bovino	CCL5	RANTES
BPS	Phosphate Buffer Salin	/	Por dividido
° C	Grau Celsius	RNA	ácido ribonucléico
C57bl6	Linhagem de camundongo isogênico	NFκ-β	Fator nuclear kappa beta
CCA	Centro de Ciência Animal	TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
CA	Cloridrato de Amiodarona	NK	<i>Natural Killers</i>
CEA	Comitê de Ética Animal	NOD	receptores citosólicos do tipo NOD
COBEA	Comitê Brasileiro para Experimental Animal	mg	miligrama
DNA	Ácido desoxirribonucléico		
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>		
g	Gramas		
HE	Hematoxilina – Eosina		
IFN-γ	Interferon gama		
IL-12	Interleucina 12		
IL-10	Interleucina 10		
Kg	Quilograma		
M	molar		
mL	Mililitro		
nM	Nanomolar		
µg	Micrograma		

1. Introdução

1. Introdução

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, também chamada de Tripanossomíase Americana, é causada pelo protozoário da família Trypanosomatidea, o *Trypanosoma cruzi*. (WHO, 2010). Ela foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Carlos Justiniano das Chagas em 1909 durante a campanha de erradicação da malária em Minas Gerais, Brasil. Chagas identificou o parasita flagelado em insetos Hemípteras, popularmente conhecidos como barbeiros, e em uma criança de 2 anos de idade chamada Berenice (Chagas, 1909). Desde então, muito vem sendo pesquisado com o objetivo de esclarecer as interações desse agente etiológico com os hospedeiros e vetores. Entretanto, vários aspectos da infecção e do desenvolvimento da doença associada ao *T. cruzi* ainda não estão elucidados. O único achado que continua incontestável, nos dias atuais, é de que o *T. cruzi*, na forma evolutiva tripomastigota, penetra nas células do hospedeiro vertebrado e se multiplica na forma amastigota para criar pseudocistos. Estes se rompem e provocam uma reação inflamatória no tecido parasitado que cicatriza por meio do processo de fibrose. No momento da ruptura dos pseudocistos novas formas de tripomastigotas são liberados, que circulam no organismo e invadem novas células, repetindo o ciclo e, conseqüentemente, produzindo novas lesões (Andrade & Andrews, 2005; Coura & Borges-Pereira, 2012).

A transmissão silvestre do *T. cruzi* ocorre por meio do contato direto com as fezes e urina dos insetos vetores pertencentes à família Reduviidae durante o repasto sanguíneo desses animais. Vinculadas a esta via de transmissão, foram descritas mais de duzentas espécies entre vetores e hospedeiros mamíferos, incluindo desde pequenos mamíferos silvestres até o ser humano, que passou a ocupar os ectopos silvestres disponibilizando alimento e abrigo aos vetores (Argolo *et al*, 2008). Outras formas de transmissão incluem a transfusão de sangue contaminado (Wendel, 1998), a via oral por meio da ingestão acidental de alimentos contaminados com as fezes ou com os próprios vetores infectados (Valente *et al*, 1999; Alarcon de Noya *et al*, 2010; Benchimol-Barbosa, 2010;) e o transplante de órgãos (Chocair *et al*, 1981; Bern *et al*, 2008).

Após a entrada do parasito no organismo, advém a denominada fase aguda da infecção, que ocorre de forma assintomática ou sintomática na qual são observados febre, calafrios, mialgia, taquicardia e aumento do fígado, baço e linfonodos. Durante esta fase, acontece intensa replicação do parasita no interior das células do hospedeiro e é possível encontrar formas flageladas do *T. cruzi* em preparações de sangue a fresco dos pacientes (Rassi et al, 2010). Em paralelo a essas manifestações clínicas ocorre o aprimoramento da resposta imunológica contra o parasito. Esta resposta inflamatória culmina na redução da presença de formas tripomastigotas circulantes e respectiva replicação em células do sistema imune e conduz ao estabelecimento do *T. cruzi* em tecidos, mantendo-se em sua forma amastigota e conduzindo os pacientes à fase denominada crônica. Nesta nova fase, o indivíduo infectado pelo *T. cruzi* pode manter-se apenas infectado, numa forma conhecida como crônica indeterminada da doença, caracterizada pela sorologia positiva para anticorpos anti-*T. cruzi*, porém sem manifestações clínicas a exames convencionais. Porém, alguns indivíduos infectados, cerca de 15 a 30%, também podem desenvolver a forma crônica sintomática que é caracterizada por alterações cardíacas, digestivas ou ambas e usualmente se manifesta entre 10-30 anos após a infecção inicial. A forma cardíaca, geralmente, predomina entre os pacientes com a forma sintomática conduzindo-os a distúrbios de condução, disfunções autonômicas, alterações funcionais e, em alguns casos, levando-os a óbito. (Machado et al, 2013; Rassi et al, 2010).

1.2. Resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A resposta imune formada pelo hospedeiro após a infecção é necessária para controlar a replicação do parasito, mas também produz danos teciduais que podem ocasionar alterações de função e estrutura de determinados órgãos (Andrade & Andrews, 2005; Dutra & Gollob, 2008; Machado et al, 2013). Nesse contexto, a resposta imune parece exercer papel crucial na geração da patogênese da infecção pelo *T. cruzi* e parte dessa ativação parece ocorrer já nos primeiros contatos entre o parasito e células da imunidade inata do mamífero. Receptores *Toll-like* presentes na membrana plasmática (TLR - 1, 2, 4, 5 e 6) ou na membrana de endossomos (TLR- 3, 7, 8 e 9) das células do mamífero, bem como os receptores NOD, são

ativados pelo glicofosfatidilinositol da membrana do parasito (Fig.1) resultando na promoção de uma cascata de sinalização citoplasmática que culmina na ativação do fator de transcrição NFκ-β que promove a produção de mediadores pró-inflamatórias pelas células do sistema imunológico.

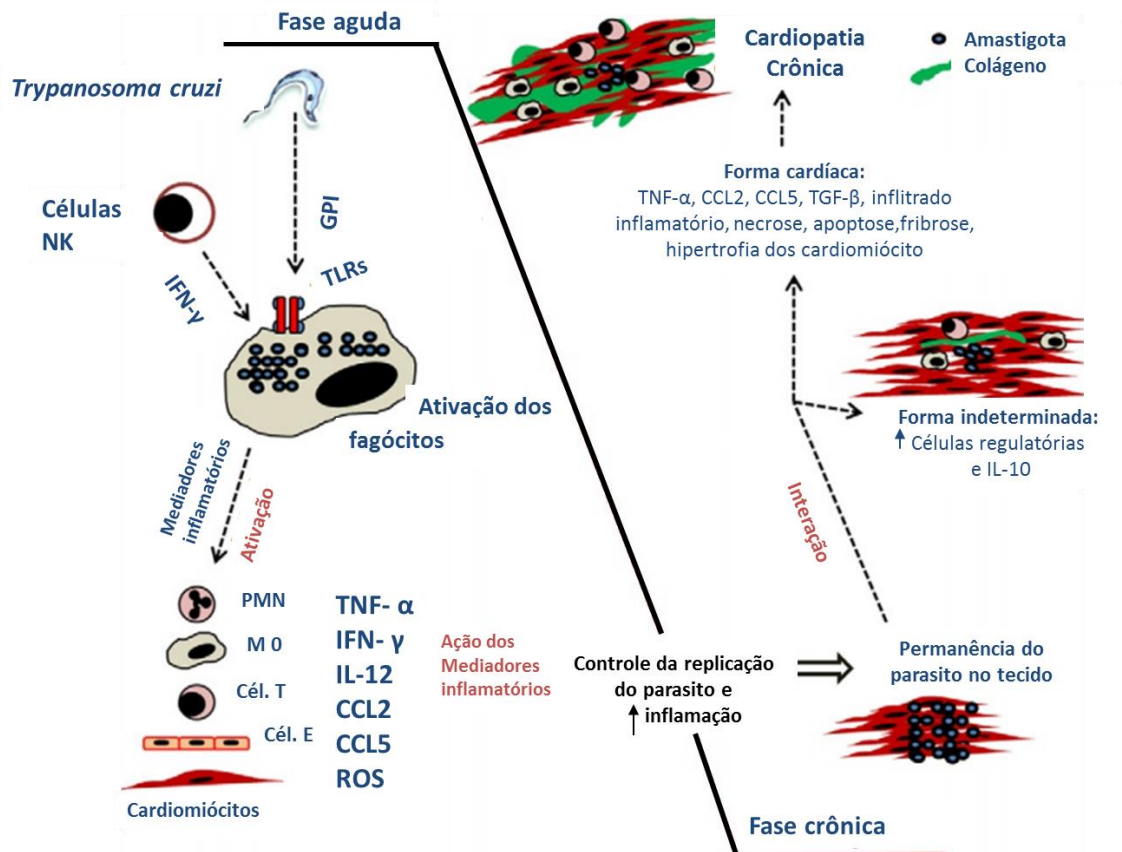


Figura 1: Resposta imune do hospedeiro desencadeada pela infecção por *Trypanosoma cruzi*. A presença de *T. cruzi* ativa os receptores do tipo Toll (TLR) em células fagocitárias para produzir mediadores inflamatórios. Estes mediadores atuam em várias células do organismo ativando-as e intensificando a produção de uma diversidade de outros mediadores inflamatórios e reguladores solúveis, que podem desempenhar um papel no controle da replicação do parasita. Não obtendo sucesso nesse controle, o parasito se instala em tecidos profundos e inicia uma resposta inflamatória progressiva culminando, em alguns casos, em destruição tecidual com perda funcional do órgão. (Modificado de Talvani & Teixeira 2011).

Uma das proteínas sintetizadas a partir do reconhecimento do protozoário é a interleucina 12 (IL-12), que estimula as células *natural killers* (NK) a sintetizarem interferon- γ (IFN- γ), além de promoverem a diferenciação dos linfócitos T CD4+ em células Th1, induzem a produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pelos macrófagos e desencadeiam outras funções efetoras nessas células (Aliberti et al, 2001; Teixeira et al, 2002; Golgher & Gazzinelli, 2004; Talvani & Teixeira, 2011). Os macrófagos ativados pelas células

Th1 passam a liberar mais TNF- α , IL-12, óxido nítrico (NO) e quimiocinas, como CCL2, CCL3 e CCL5, amplificando a resposta inflamatória inicial (Fig.1) (Talvani & Teixeira, 2011).

Outro importante mediador inflamatório no contexto da infecção pelo *T. cruzi* é a quimiocina CCL2, encontrada em altos níveis em pacientes com a infecção, principalmente naqueles com alterações cardíacas, estando relacionadas ao grau de comprometimento do órgão (Talvani, 2004). A análise quantitativa da expressão desse gene no miocárdio de pacientes cardiopatas mostra que este é regulado de forma seletiva, reforçando a importância dessa quimiocina na patogênese da infecção pelo *T. cruzi*. Sugere-se, portanto, que a CCL2 seria um potencial marcador da progressão e severidade na doença de Chagas (Frade et al, 2013).

Por outro lado, estudos *in vitro* demonstram que a ação de CCL2 em cardiomiócitos e macrófagos estimulam a produção de óxido nítrico, substância capaz de eliminar o parasito. Este fato, relacionado com a alta produção de CCL2 *in vivo* durante a infecção pelo protozoário, sugere que o controle da proliferação do *T. cruzi* pela CCL2 possa induzir resistência à infecção (Machado et al, 2013). Além disso, células infectadas pelo *T. cruzi* produzem CCL2 e expressam seus receptores promovendo a defesa do hospedeiro e sugerindo sua dependência para a migração leucocitária para o sítio inflamatório (Coelho et al. 2002, Talvani et al. 2009, Paiva et al. 2009).

Tanto em modelo experimental quanto em investigações envolvendo seres humanos, tem-se mostrado que a cardiopatia chagásica apresenta um substrato inflamatório persistente desencadeado pela presença do parasito (circulante ou no tecido) ou de suas moléculas antigênicas. Esse processo inflamatório consiste de células linfocitárias (T CD8⁺ duas a três vezes mais abundantes que as células T CD4⁺) e, em menor extensão, mas não menos importante, macrófagos, eosinófilos, células plasmáticas/B, neutrófilos e mastócitos (Brenner & Gazzinelli 1997, dos Santos et al. 2001, Gomez-Garcia et al 2005, da Silveira et al. 2007). Parte desse recrutamento leucocitário para o tecido cardíaco é coordenada por uma rede variada e integrada de quimiocinas e seus respectivos receptores, sendo sua elevada expressão claramente associada com a uma maior destruição do miocárdio ou mesmo à disfunção cardíaca (Talvani et al. 2000, Talvani & Teixeira 2011). A constância desse

processo inflamatório leva à destruição dos cardiomiócitos, dissolução do infiltrado inflamatório e reposição por tecido fibroconectivo (colágeno). Esse processo de fibrose é composto, então, por colágenos do tipo I e II e, após alguns anos, torna-se responsável pela redução da contratilidade cardíaca, diminuição da massa muscular e também destruição da inervação intrínseca do coração. Lesões similares a essas são facilmente encontradas no miocárdio, epicárdio e endocárdio, contribuindo para o processo de alterações eletrocardiográficas e/ou funcionais e, conseqüentemente, contribuindo para o remodelamento cardíaco associado à infecção pelo *T. cruzi* (Rossi 1991, 1998, Caldas et al. 2013).

Assumindo que parte da alteração morfo-funcional cardíaca, característica das formas avançadas da doença de Chagas, tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos, seja consequência de uma reação inflamatória progressiva e multifocal (Morris et al. 1990), é plausível que a compreensão da gênese desse mecanismo seja importante para proposição de estratégias de intervenção. Nesse sentido, tanto fatores internos (genética) quanto fatores externos (ex. ações de fármacos e/ou compostos químicos) que interfiram diretamente na ativação ou modulação de células e/ou mediadores inflamatórios seriam favoráveis à proposição de estratégias de intervenção clínica a médio e longo prazo.

Dentre alguns possíveis fatores externos destaca-se o benznidazol, fármaco empregado para o tratamento etiológico da doença de Chagas, e descrito por alterar a resposta imune em humanos e em modelo experimental (Piaggio et al. 2001, Sathler-Avelar et al. 2006, Bustamante et al. 2008, Cutrullis et al. 2011) além, obviamente, de exercer sua função tripanocida originária (Urbina 2010, Bern 2011).

1.3. Terapêuticas anti-*Trypanosoma cruzi*

O tratamento atual para a doença de Chagas é insatisfatório, pois apesar de visar a eliminação do parasito com o nifurtimox [4 - (5-nitro-furylidenoamine) - tetra-hidro-4-4-1, 4-tiazina-1-1-dióxido] ou o benznidazol (N-benzil-2-nitro-imidazoleacetamide), testes imunológico e parasitológico realizados posteriormente ao tratamento ainda demonstram presença do parasito (Cançado, 2002). Além disso, durante a infecção aguda, os pacientes

tratados com as drogas supracitadas mostram sinais de miocardite e a progressão da doença não é interrompida quando o tratamento é realizado durante a fase aguda da infecção, além dessas drogas apresentarem efeitos colaterais (Teixeira et al, 2006; Pinazo et al, 2010; Teixeira et al, 2011; Rassi et al, 2012).

O nifurtimox age como uma pró-droga e necessita de ativação por nitroredução produzindo metabólitos de oxigênio (Peterson et. al., 1979). Entretanto sua utilização é controversa devido a sua toxicidade, potencial carcinogênico, eficácia limitada, existência de cepas do *T. cruzi* resistentes, além de seus efeitos adversos gerados (Belinda et. al., 2011). Mas com a escassez de tratamentos etiológicos para a doença de Chagas este fármaco ainda faz parte do arsenal contra a doença de Chagas em alguns países, embora não seja o fármaco de escolha no Brasil.

O benzonidazol atua por meio de um mecanismo de stress oxidativo, havendo modificação de macromoléculas (DNA e RNA) inibindo a replicação do parasito (Docampo, 1990). Os efeitos adversos associados ao benzonidazol são sua principal desvantagem sendo esses, principalmente, dermatites, intolerância digestiva, depressão da medula óssea e toxicidade hepática. Esses efeitos levam ao abandono do tratamento em aproximadamente 10% dos casos (Pérez-Molina et. al., 2009). No entanto o benzonidazol continua sendo a droga de escolha na terapia anti-*T. cruzi* em alguns países da América latina.

Por essas terapias não serem satisfatórias durante a fase crônica alcançando ausência ou baixos índices de cura (Suasnábar 2000; Cançado 2002; Caldas et. al. 2008), os pacientes crônicos são submetidos às terapias farmacológicas com o objetivo de minimizar os danos, bem como a progressão da insuficiência cardíaca. Essas terapias compreendem medicamentos de naturezas e propriedades distintas, como os diuréticos, os beta-bloqueadores adrenérgicos, os inibidores da enzima conversora da angiotensina, os digitálicos e os antiarrítmicos como é o caso do cloridrato de amiodarona (Rassi, 2010), objeto do presente estudo.

1.4. O cloridrato de amiodarona

O cloridrato de amiodarona (CA) é um antiarrítmico da classe III, ou seja, age prolongando o potencial de ação cardíaco e seu período refratário, bloqueando os canais de sódio e cálcio e ação α - e β -bloquedora adrenérgica não competitiva, fazendo com que o uso desse fármaco seja indicado para a redução de arritmia cardíaca (Steven & Singh, 1997).

A preparação oral de 200mg por comprimido autorizada em 1985, nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA), é indicada para adultos com arritmias ventriculares com risco de vida, quando os outros tratamentos são ineficazes ou não são tolerados pelo paciente (Greene, 1989). Dez anos depois foi liberado a utilização do CA pela via intravenosa como a mesma indicação. Atualmente, o CA é usado para controlar virtualmente todas as manifestações supraventricular e taquicardia ventricular, dessa maneira, tornando-se um dos antiarrítmicos mais utilizados na prática clínica (Doval, et al; 1994; Herendael & Dorian, 2010).

A farmacocinética do CA após administração oral é complexa, sua biodisponibilidade varia de 20 a 80% e seu pico sério é atingido em 3 a 7 horas, após a sua metabolização no fígado. Em razão da sua característica lipofílica, sua absorção varia de um tecido para outro, sendo elevados no tecido adiposo, pulmão, fígado e linfonodos e baixos no cérebro, músculos e tireoide esse fato contribuí para seu tempo de meia-vida de até 60 dias com uma dose oral única (Herendael & Dorian, 2010).

O CA atua amenizando sintomas associados à forma cardíaca da infecção pelo *T. cruzi* (Rassi et al, 2010). Em 2006, Benaim e colaboradores mostraram que o CA possuía uma ação anti-*T. cruzi* relacionada à alteração da concentração intracelular dos íons de cálcio e com a inibição da biossíntese do ergosterol no parasito. Posteriormente, em 2010, Adesse e colaboradores mostraram que o CA possui efeito anti-proliferativo seletivo sobre o *T. cruzi* em modelo *in vitro* com cardiomiócitos, pois o tratamento induziu danos estruturais nas formas amastigotas e promoveu a recuperação estrutural e funcional completa de células hospedeiras. Em 2012, Veiga-Santos e colaboradores avaliaram a ação do CA sobre a estrutura celular das formas evolutivas do *T. cruzi* demonstrando que este fármaco, além de

reduzir o número de epimastigotas, amastigotas e de macrófagos infectados, induzia também a formação de autofagossomos e alterações na mitocôndria nas células do parasita.

Como a resposta imunológica é parte integrante do processo imunopatogênico associado à infecção pelo *T. cruzi*, avaliar a ação do CA sobre a mesma torna-se de interesse científico. De acordo com a literatura o tratamento com o CA mostrou-se capaz de inibir a produção de TNF- α por monócitos humanos, de diminuir a concentração de IL-6 e o infiltrado de células imunes e conseqüentemente, o dano tecidual em camundongos com miocardite viral (Matsumori et al, 1997, Ito et al, 2002).

3.Objetivos:

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Avaliar os aspectos inflamatórios na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em decorrência do tratamento com o cloridrato de amiodarona (CA).

3.2. Objetivos específicos:

(i) Avaliar a interferência do tratamento com o CA sobre a parasitemia de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa VL-10 do *T. cruzi*;

(ii) Avaliar alterações macroscópicas dos órgãos relacionados com a infecção;

(iii) Avaliar a influência do CA na produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , CCL2, CCL5 e IL-10) no plasma e no coração em decorrência da infecção pelo *T. cruzi*;

(iv) avaliar histologicamente a interferência do CA sobre a inflamação e o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco.

4. Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Foram utilizados, neste estudo, 14 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com peso entre 18 e 20g, com idade de aproximadamente 60 dias obtidos no Centro de Ciência Animal (CCA), da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais, durante os experimentos, permaneceram em salas climatizadas no CCA com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados aqui foram realizados de acordo com as normas do Comitê Brasileiro para Experimental Animal (COBEA) e submetidos ao Comitê de Ética Animal (CEA) da UFOP.

4.2. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* e tratamento farmacológico

Todos os animais foram infectados por meio de inoculação intraperitoneal com 0,1 mL de sangue contendo 5×10^3 formas tripomastigotas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, DTU II (Moreno et al, 2010) previamente caracterizada por Filardi & Brener em 1987.

Os animais foram divididos em 2 grupos infectados, um tratado e outro não tratado com o cloridrato de amiodarona (CA). O grupo tratado foi caracterizado pela administração do CA (Laboratório Biosintética ACHE[®]) na dose de 30mg/kg/dia, realizada durante 30 dias, via oral, sendo que o tratamento teve início 24 horas após a infecção. O veículo usado foi água a 0,5% de metil celulose (Sigma[®]) (Haruyasu et al, 2001). O grupo não tratado foi submetido ao mesmo esquema de tratamento apenas com o veículo. Todos os animais foram pesados semanalmente para ajuste das dosagens até o 30º dia de tratamento.

Concomitantemente ao tratamento foi realizada diariamente o exame microscópico de sangue a fresco para a contagem das formas tripomastigotas sanguíneas, a partir de 5 µL de sangue retirados da cauda dos animais, até o 30º dia de tratamento. A quantificação dos parasitos foi realizada segundo a técnica descrita por Brener (1962). Os números de parasitas foram plotados como a média diária observada nos 7 animais de cada grupo.

No 30º dia de tratamento os animais foram eutanasiados para coleta de sangue, coração, fígado e baço. Do sangue foi obtido o plasma imediatamente após a coleta, por centrifugação a 35000 rpm a 4°C por 15 minutos. O coração depois de pesado foi cortado longitudinalmente ao meio e metade imersa em solução de formol tamponado a 10% para confecção das lâminas histológicas, a outra metade redividida, sendo uma parte mantida a -80°C e a outra pesada novamente, solubilizada em 500µL de PBS 1X (*Phosphate Buffer Salin*), macerada em nitrogênio líquido, centrifugada a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos para coleta do sobrenadante para a realização do ELISA do tecido cardíaco. O fígado e o baço foram pesados e estocados a -80°C.

4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando-se o plasma e o sobrenadante do tecido cardíaco macerado em PBS 1X dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados ou não com o CA.

Para o procedimento do ensaio de ELISA foram utilizados kits para detecção sendo que, em cada poço (foram utilizadas placas de 96 poços) foram adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra cada uma das citocinas de interesse, diluídos em PBS contendo 0.1% de albumina de plasma bovino - BSA (SIGMA), sendo estas placas incubadas por 12 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* e as placas foram bloqueadas com 300 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a 25° C. A seguir as placas foram novamente lavadas. As amostras de plasma e do tecido cardíaco macerado em PBS 1X, previamente padronizadas por nosso grupo, foram aplicadas em um volume de 50 µl para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários, após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por duas horas à 25°C. Finalmente, 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma foi incubada por trinta minutos à temperatura ambiente.

O cromógeno escolhido para revelação foi o OPD (*o*-phenylenediamine -SIGMA) na diluição de 4 mg para 10 ml de tampão citrato. No momento da aplicação de 100µl desta solução nos poços, foi ainda adicionado 2 µl/placa de H₂O₂ 30 volumes. Após vinte minutos de incubação em ausência de luz a reação sofreu bloqueio adicionando-se 50 µl de H₂SO₄ 3M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 450 nM, trinta minutos após a adição de H₂SO₄ para o bloqueio das reações.

4.4. Histologia convencional

As metades do coração, colocadas em solução de formol 10% tamponado foram, após 24 horas, processadas para a confecção de lâminas histológicas. Para tal, elas sofreram desidratações sucessivas de 30 minutos cada, em álcool 70%, 80%, 90% e três submersões de 30 min. também, em recipientes distintos contendo álcool absoluto. Em seguida, elas foram submetidas a banhos de Xilol por 10 minutos cada, para posterior fixação em paraplast e emblocados no mesmo. Os cortes de 4µm de espessura feitos no micrótomo, foram colocados em uma solução de água destilada com 10% álcool 96,2% e transferidos para um banho com água destilada a temperatura de 46°C antes de serem fixadas em lâminas para a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE) para avaliação do infiltrado inflamatório e dos vasos na matriz da esponja.

Todos os núcleos celulares presentes no tecido cardíaco foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $2,24 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40× foram digitalizadas através de microcâmera Leica DM 5000 B (*Leica Application Suite*, versão 2.4.0R1) e processadas por meio do programa analisador de imagens *Leica Qwin V3*.

4.5. Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram apresentados através da média de seus valores e respectivos “erro médio padrão”. Utilizou-se teste t para comparações entre os dois grupos. Para avaliar a existência de correlação das dosagens das citocinas entre si foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson, que tem o símbolo r , e fornece uma medida da força de relacionamento linear entre duas variáveis contínuas e varia de -1 a $+1$ passando pelo zero. Para todos os testes, foi utilizado um nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas através dos programas *GraphPad Prism*.

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Efeito do cloridrato de amiodarona no parasitismo sanguíneo

A partir do exame de sangue a fresco obtido dos animais infectados pelo *T. cruzi* obteve-se a curva de parasitemia com as médias diárias de cada grupo, durante os 30 dias de infecção (Fig.2). Os parasitos foram detectados a partir do 10º dia de infecção e foi observado que entre o 28º e 30º dias, o grupo tratado apresentou número de parasitas significativamente menor em relação ao grupo não tratado.

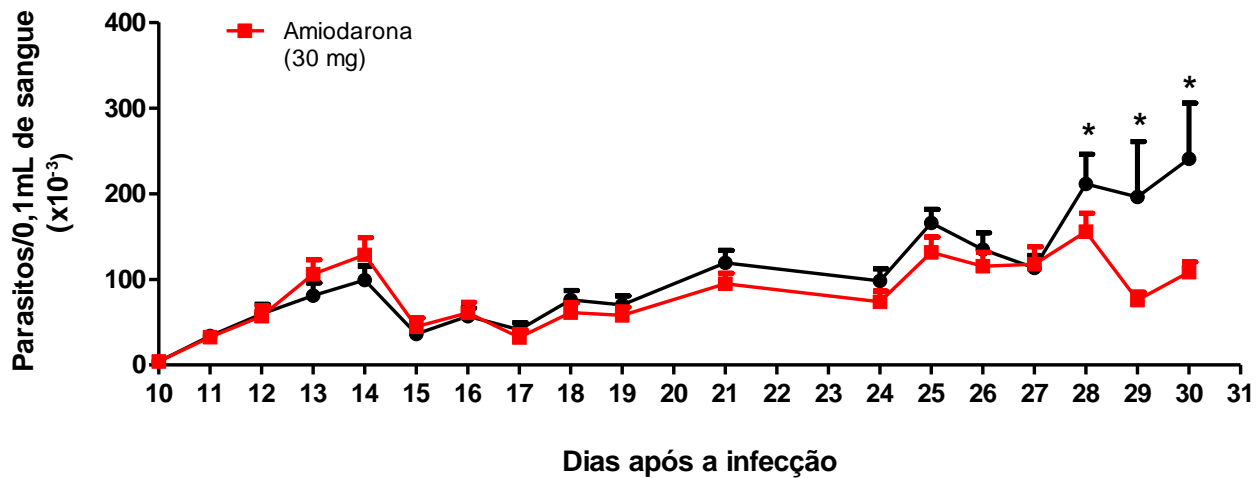


Figura 2 :Curva de parasitemia dos animais tratados e não tratados com Cloridrato de Amiodarona. Quantificação diária das formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, cepa VL-10, em camundongos C57BL/6. * diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

5.2. Avaliação do peso relativo dos órgãos

Levando-se em consideração o peso de cada animal infectado pelo *T. cruzi* e de seu respectivo órgão, calculou-se o peso relativo do coração, fígado e baço. Observou-se que os animais tratados com 30mg de CA apresentaram o peso relativo do coração e do baço significativamente menores do que aqueles não tratados para os mesmos órgãos. Não houve diferença de peso relativo para o fígado entre os diferentes grupos (Fig.3).

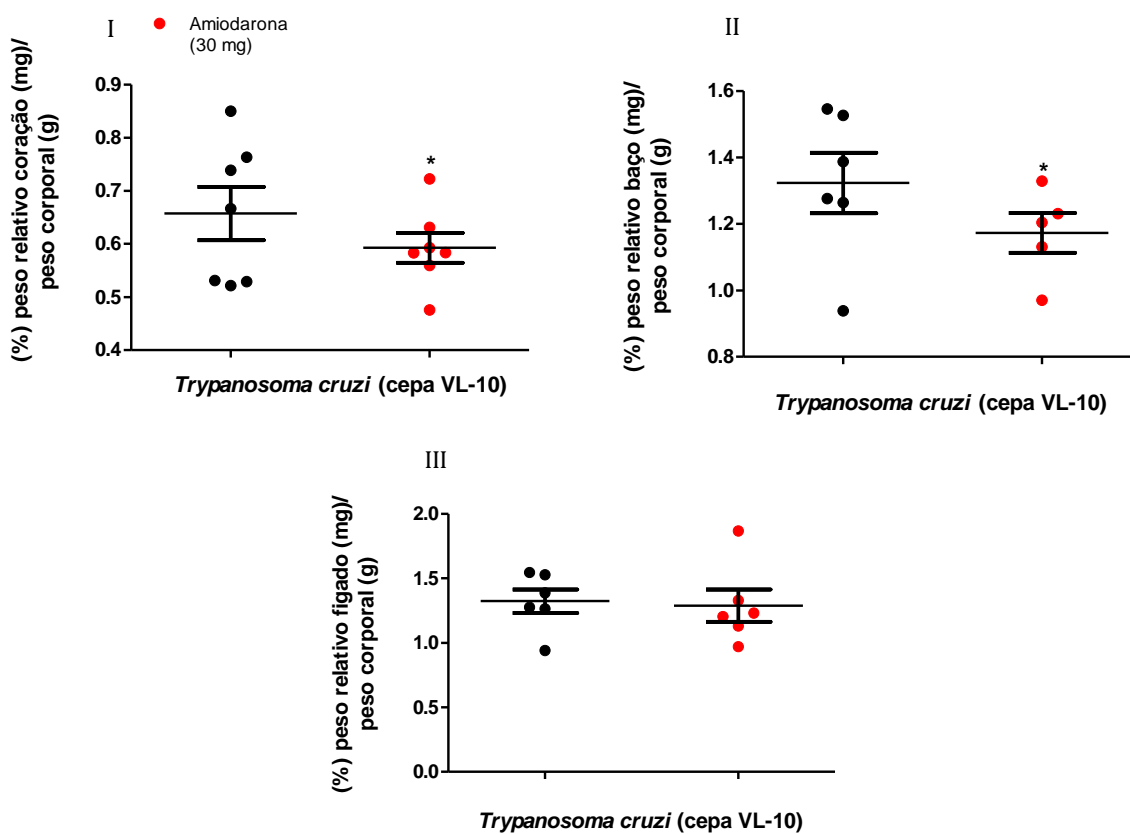


Figura 3: Peso relativo dos órgãos. Relação entre o peso dos órgãos em miligramas e o peso corporal, em gramas, dos animais infectados tratados e não tratados com o cloridrato de amiodarona. * significa diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Em (I) o peso relativo do coração, (II) o do baço e em (III) o do fígado.

5.3. Avaliação dos marcadores inflamatórios plasmáticos

Nas dosagens de citocinas e quimiocinas no plasma dos animais, observou-se que o tratamento com o CA implicou em redução da concentração da quimiocina CCL2 (Fig. 4 II). Porém, para os demais marcadores inflamatórios, a saber, TNF- α (Fig. 4 I), CCL5 (Fig. 4 III) e IL-10 (Fig. 4 IV) não houve alteração.

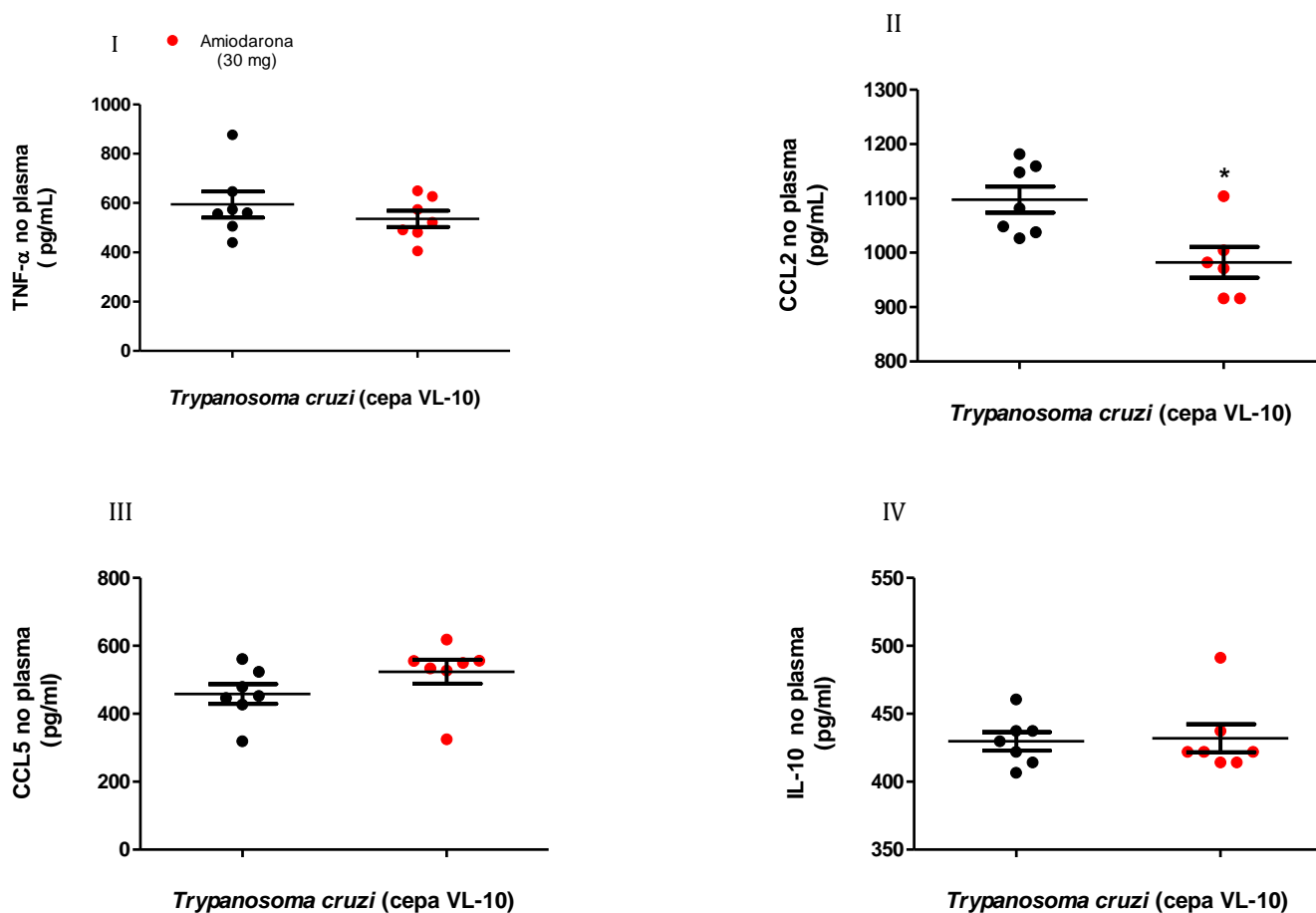


Figura 4: Quantificação dos marcadores inflamatórios no plasma dos animais. A quantificação de TNF-alfa (I), CCL2 (II), CCL5 (III) e IL-10 (IV), dado em picograma por mililitro, em cada um dos grupos. Nos pontos marcados com o símbolo * diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

5.3. Dosagens dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco

Da mesma forma que a detecção no plasma, houve avaliação dos mesmos mediadores inflamatórios no macerado de tecido cardíaco (50mg) de animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados com o CA. Não foram encontradas diferenças entre as avaliações no macerado cardíaco para o TNF- α (Fig. 5 I), CCL2 (Fig. 5 II), CCL5 (Fig. 5 III) e IL-10 (Fig. 5 IV)

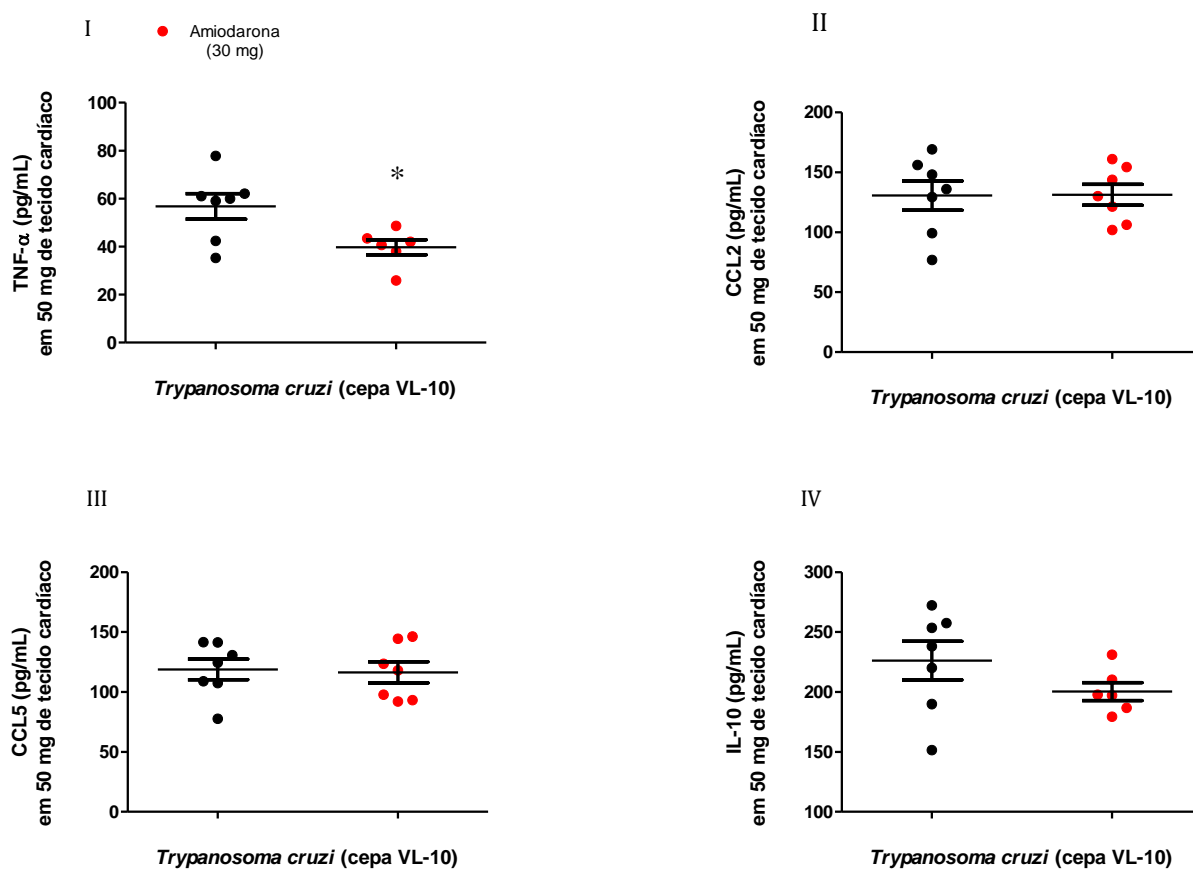


Figura 5: Quantificação dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco. A quantificação de TNF- α (I), CCL2 (II), CCL5 (III) e IL-10 (IV), apresentados em picograma por mililitro, em 50 miligramas de tecido. * diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Visto que existe uma estreita relação entre a produção desses marcadores entre si e, sabendo-se que o efeito de um pode interferir na produção/expressão do outro, realizou-se uma análise de correlação entre a CCL2 e CCL5 e destas com o TNF- α e IL-10. Observou-se que a produção de CCL5 e CCL2 (Fig. 6 I) apresentam forte correlação positiva ($r=0,85$) e que elas estão distribuídas de forma linear ($r^2=0,75$ e $p=0,001$) uma vez que o aumento da produção de uma eleva a produção da outra. Analisando-se a produção de CCL2 com TNF- α , (Fig. 6 II) observou-se a existência de uma forte correlação positiva entre estas citocinas ($r=0,83$) sendo da mesma forma linear ($r^2=0,68$ $p=0,006$). Ainda, correlacionando-se CCL5 com TNF- α (Fig. 6 III), observou-se uma fraca correlação positiva entre elas ($r=0,45$) (Fig.6).

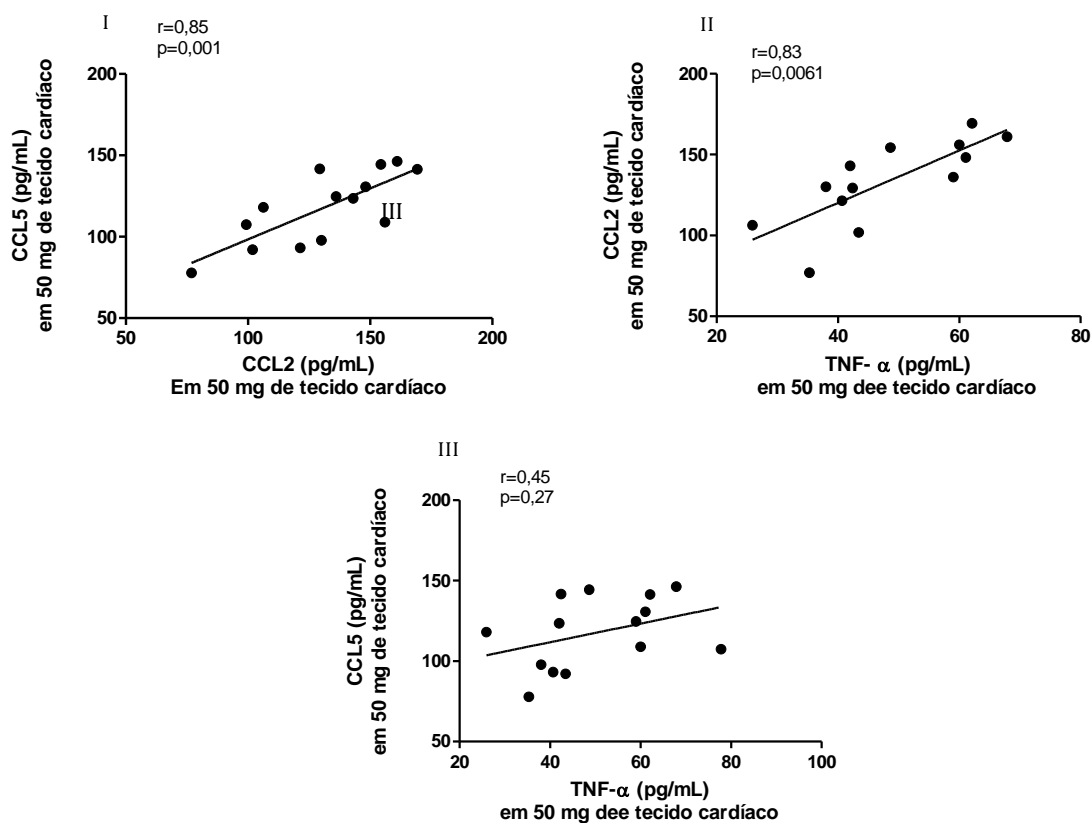


Figura 6: Correlação entre os marcadores inflamatórios no tecido cardíaco. A correlação entre CCL5 e CCL2 (I), entre CCL2 e TNF- α (II), CCL5 e TNF- α (III) dado em picogramas por mililitro, em 50 miligramas de tecido. Mostrando que existe uma correlação linear entre as citocinas em I e II.

Compreendendo a IL-10 como uma citocina reguladora do processo inflamatório, avaliou-se a correlação de sua produção cardíaca com a produção dos mediadores inflamatórios avaliados. Verificou-se forte correlação positiva ($r=0,64$) entre a IL-10 e a CCL2 (Fig. 7 I), porém essa correlação não foi linear ($r^2= 0,46$, $p=0,03$). Observou-se, também, a correlação entre a produção de CCL5 e a IL-10 (Fig. 7 II), sendo a mesma considerada fraca ($r=0,57$) e não apresentando uma regressão linear ($r^2=0,33$ e $p=0,08$). Já entre a correlação entre a produção de TNF- α e IL-10 (Fig. 7 III) observou-se forte correlação positiva ($r=0,71$) e também linearidade ($r^2=0,55$ e $p=0,01$).

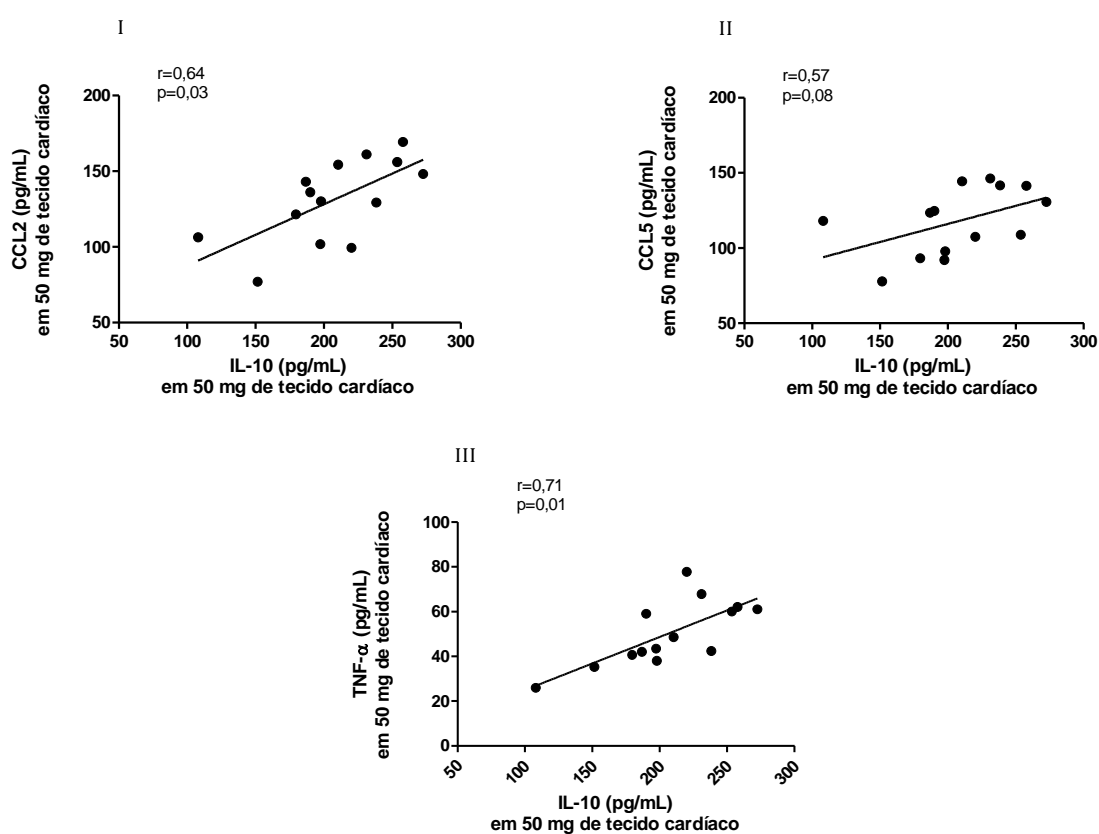


Figura 7: Correlação entre os marcadores inflamatórios no tecido cardíaco. A correlação entre as CCL2 e IL-10(I), entre CCL5 e IL-10 (II) e TNF- α e IL-10 (III) dado em picograma por mililitro, em 50 miligramas de tecido.

5.4. Análise histológica

Na análise dos cortes histológicos do coração dos animais corados em H&E, não foi encontrado diferença estatística entre o número de núcleos das amostras do coração dos grupos utilizado nesse estudo (Fig. 8).

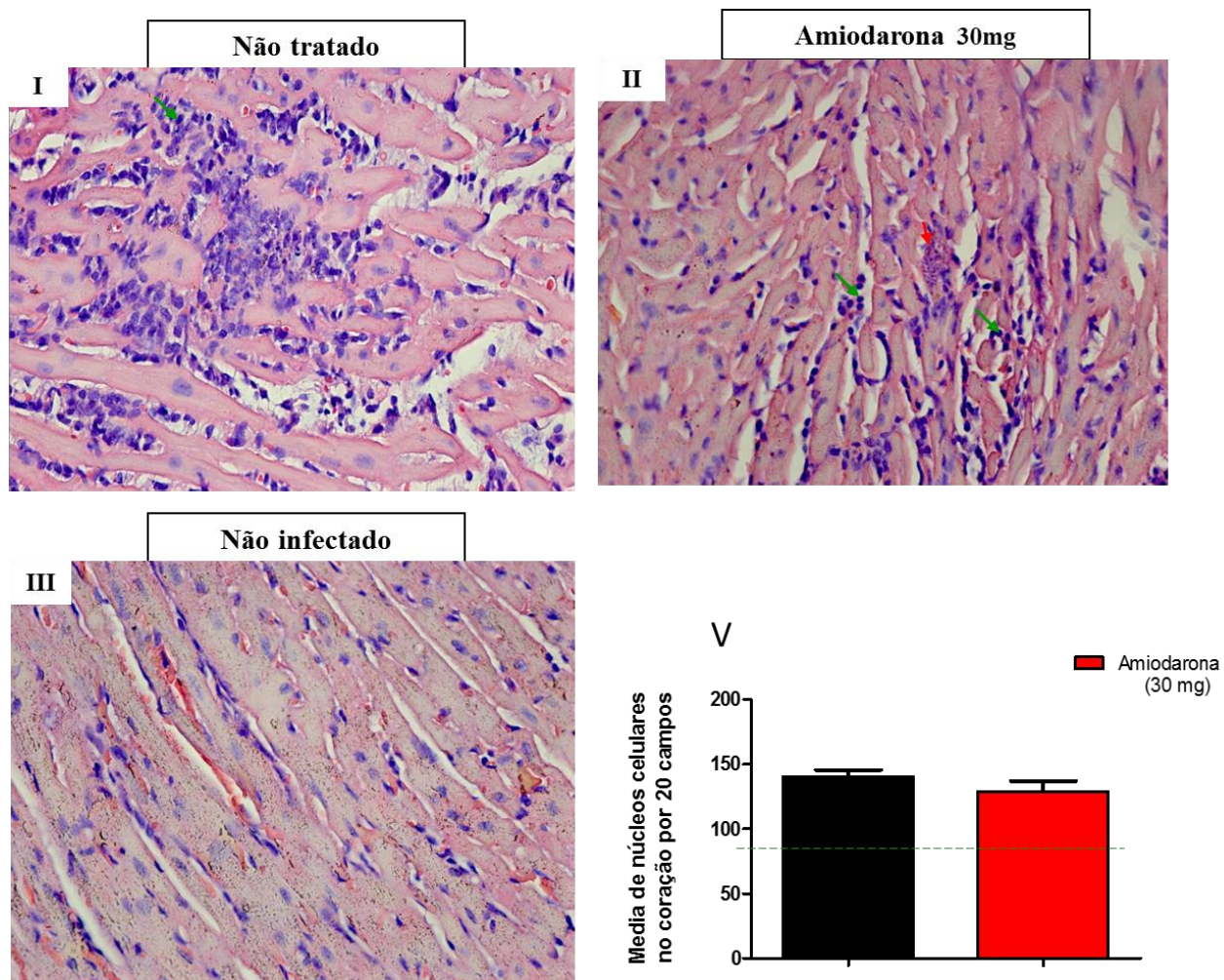


Figura 8: Fotomicrografia do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com o *Trypanosoma cruzi* e tratados com o cloridrato de amiodarona. Imagem representativa do tecido cardíaco de animais infectados e não tratados (I), animais infectados tratados com CA (II) e representação do grupo animais não infectados não tratados (III). Gráfico, em anexo (V), representando a contagem de núcleos celulares em 20 campos do corte histológico cardíaco, sendo núcleos de células inflamatórias e de cardiomiócitos. As setas verdes apontam células inflamatórias, a seta vermelha o ninho de amostigota e a linha pontilhada verde o número de núcleos de animais não infectados. Imagens capturadas através de microcâmara *Leica DM 5000 B*. Magnitude: 40 X.

6.Discussão

6. Discussão

O cloridrato de amiodarona (CA) é um fármaco utilizado no tratamento de arritmias cardíacas com propriedades complexas únicas objetivando diminuir a frequência cardíaca, reduzir as contrações prematuras dos ventrículos e impedir a fibrilação ventricular (Konery et al, 1997; Connolly et al, 1999; Kudernchuk et al, 1999). O tratamento com o CA, ao lado de outros grupos farmacológicos, constitui importante estratégia empregada no manejo clínico do paciente chagásico (Rassi et al. 2010). Não havendo tratamento específico para a fase crônica da doença, tem-se utilizado fármacos com propriedades cardiovasculares para o reestabelecimento da função cardíaca nos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. No entanto, além dos benefícios funcionais, estudos anteriores revelaram a ação desse fármaco sobre o *T. cruzi* e alterando a resposta imune em doenças cardíacas de etiologia viral (Benaim et al, 2006; Ito et al, 2002; Veiga-Santos, 2012).

De fato, no presente estudo, alguns achados receberam destaque em relação às propriedades do CA na infecção pelo *T. cruzi*, a saber: (i) propiciou a redução no número de parasitos sanguíneos; (ii) propiciou redução no peso relativo do coração e baço e; (iii) reduziu o nível plasmático e do macerado cardíaco da citocina CCL-2 e TNF- α , respectivamente.

A redução do parasitismo sanguíneo apresenta uma sugestiva ação anti- *T. cruzi* associada ao CA, provavelmente devido à modificação da concentração dos íons de Ca²⁺ e, conseqüentemente, modificações das organelas intracitoplasmáticas do parasito (Benaim, 2006; Adesse, 2011; Veiga-Santos, 2012). Em estudo anterior, o CA foi capaz de manter a parasitemia dos camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* em níveis reduzidos, sendo o esquema terapêutico utilizado em dose de 50mg por Kg de peso e em dias alternados por 30 dia (Benaim et al. 2006). É sabido que o CA é um fármaco que apresenta baixa concentração inicial no tecido muscular (Heredndael & Dorian; 2010) e o tratamento em dia alternados não se torna interessante se o objetivo é uma ação mais profunda. Ainda assim, o estudo de Benaim e colaboradores demonstrou que o CA foi capaz de reduzir a mortalidade dos animais, em relação ao grupo controle infectado não tratado, mas sem demonstrar a presença de redução parasitária no tecido muscular cardíaco ou esquelético, apenas na circulação. A cepa Y do *T. cruzi*, utilizada no trabalho supracitado, é uma cepa parcialmente

resistente ao fármaco de escolha utilizado no Brasil, o benznidazol. Levando-se em consideração as particularidades farmacológicas do CA e dos derivados imidazólicos em vias metabólicas do parasito (Benaim et al, 2012), é aceitável que doses menores do CA pudessem exercer ações detectáveis na parasitemia dos animais. Por outro lado, no presente estudo optou-se por utilizar uma cepa do *T. cruzi* considerada resistente ao benznidazol levando-se em consideração a baixa virulência e menor mortalidade dos animais. Por outro lado foi proposto um aumento da dose diária de CA em função da cepa do parasito e de outros trabalhos demonstrando o tratamento experimental com doses mais elevadas do fármaco (Menezes et al, 2011). O aumento na dose do CA foi capaz de alterar, parcialmente, a curva de parasitemia dos animais infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi*. Ainda que se desconheça o mecanismo pelo qual o CA exerce um papel inibidor em alguma via metabólica do protozoário, é possível conceber a ideia que o tratamento de cunho cardioprotetor do CA em indivíduos crônicos com a doença de Chagas também possam se beneficiar com sua propriedade anti-parasitária, tanto na circulação (sabendo-se que em fase crônica não se observa com frequência parasitos circulantes) quanto nas células musculares profundas, pois o tratamento diário com o fármaco propicia maior absorção tecidual (Benaim; 2006, Heredndael & Dorian; 2010).

Outro aspecto associado ao quadro inflamatório é o tamanho e/ou peso de determinados órgãos. A diminuição do peso relativo do coração observada no grupo de camundongos infectados e tratados com o CA pode estar relacionada, em parte, à mencionada propriedade desse fármaco em reduzir a carga parasitária circulante e, possivelmente, tecidual. Alguns estudos têm mostrado que a carga parasitária exerce importante influência no processo inflamatório cardíaco e, conseqüentemente, no desenvolvimento da patogênese associada à infecção pelo *T. cruzi* (Diniz et al, 2010). Portanto, se o CA é capaz de reduzir o parasito circulante na fase aguda da infecção, é proposto que esta redução interfira diretamente no processo inflamatório e nas mudanças morfométricas dos órgãos. Entretanto, a análise microscópica do tecido muscular cardíaco não confirmou essa ação protetora, uma vez que não houve alteração no número de núcleos celulares entre os dois grupos de estudo (tratados e não tratados com CA). Além disso, não houve diferenças entre a avaliação dos parasitos teciduais encontrados com estudo histológico no referido material. Uma análise mais sensível torna-se necessária para confirmação das ações do CA sob os parasitos na

forma amastigota em tecidos musculares cardíacos como, por exemplo, a quantificação do DNA do *T. cruzi* utilizando-se a técnica de PCR-real time, como realizado previamente por nosso grupo (Cummings & Torleton, 2003; Caldas, et al, 2012). Tantos os ensaios moleculares quanto uma avaliação fenotípica das células inflamatórias no tecido muscular cardíaco encontram-se, em andamento, no laboratório de doença de Chagas, da Universidade Federal de Ouro Preto, mas sem resultados para apresentação e discussão nessa dissertação.

Além da redução do órgão cardíaco, houve diminuição do peso relativo do baço e da quantidade de CCL2 plasmática associado ao tratamento com CA. O baço encontra-se intimamente relacionado com infecções em mamíferos, por ser um órgão linfoide e estar macroscopicamente aumentado em infecções por *Leishmania sp* ou mesmo por *T. cruzi* (Herwaldt, 1999; Machado et al, 2012). Portanto, o fato do baço apresentar peso relativo menor é um indício de uma possível ação anti-inflamatória ou regulatória do CA. Da mesma forma, a redução no nível circulante de CCL2, quimiocina importante para o recrutamento e ativação de monócitos durante processos infecciosos (Coelho et al, 2002) reforçam as propriedades anti-inflamatórias do CA.

A ação do CA na resposta inflamatória à infecção pelo *T. cruzi* sobre o sistema imune foi reforçada avaliando-se a redução do TNF- α no macerado de tecido cardíaco, porém não evidenciada nas avaliações de CCL5 e IL-10. No entanto, é importante considerar que o estudo aqui realizado ocorreu com uma cepa menos virulenta que as demais cepas usualmente utilizadas em estudos com o *T. cruzi* onde a resposta inflamatória é mais evidenciada ainda na fase aguda, mas o índice de mortalidade dos animais também acompanha tal perfil (Bahia, et al, 2012; Diniz, et al, 2013).

Um aspecto importante observado com o tratamento com o CA foi sua interferência direta na produção tanto do TNF- α quanto da quimiocina CCL2, ambos mediadores inflamatórios largamente descritos em associação à inflamação induzida pelo *T. cruzi* tanto em modelo experimental quanto em seres humanos (Pérez et al, 2011; Machado, et al 2012). Não se pode afirmar que o fármaco tenha interferido diretamente na via intracelular de formação do TNF- α e da CCL2, mas pode-se inferir à ação direta ou indireta do CA na redução destes mediadores circulantes, promovendo tanto o TNF- α quanto o CCL2 como

biomarcadores das ações do CA na infecção experimental pelo *T. cruzi*. É sabido haver uma relação direta entre a produção de IFN- γ e TNF- α para ativação de macrófagos e, destes na produção inicial de algumas das principais citocinas descritas na infecção por este parasito (Talvani et al. 2000), e de demonstrar que a quimiocina CCL2 é responsável pelo recrutamento de células mononucleares para o sítio inflamatório cardíaco na fase inicial da infecção. Além disso, a CCL2 tem sido mostrada como um fator importante para o controle parasitário na fase aguda da infecção em detrimento do aumento do processo inflamatório por ela induzido (Paiva et al. 2009). Portanto, a CCL2 ao contrário da CCL5 ou mesmo da citocina regulatória IL-10, mostrou-se diretamente associada às ações iniciais regulatórias do CA na infecção em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa VL-10 do parasito.

Estudos em cães e em seres humanos também demonstraram a CCL2, bem como outras quimiocinas e o TNF- α como importantes mediadores da inflamação crônica induzida pelo *T. cruzi* além de bons biomarcadores de insuficiência cardíaca (Guedes, et al 2010, Machado, et al 2012). Foi demonstrado, por exemplo, que a maior produção de CCL2 e TNF- α em soro de indivíduos chagásicos apresentava-se diretamente correlacionado com redução da fração de ejeção ventricular esquerda e com a dilatação do ventrículo esquerdo em diástole, parâmetros funcionais característicos da cardiomiopatia chagásica crônica (Talvani et al. 2004). Além disso, a importância da quimiocina CCL2 para a doença humana ultrapassa sua detecção plasmática e avança para o campo do polimorfismo gênico, demonstrando que indivíduos apresentando genótipo CCL2 -2518AA possuíam um risco quatro vezes maior de desenvolver cardiopatia chagásica crônica que outros indivíduos também infectados com o protozoário, mas sem este genótipo (Ramasawmy et al. 2006).

Da mesma forma, estudos de correlações entre citocinas e quimiocinas no presente estudo reforçaram sua importância e interdependência durante a infecção experimental pelo protozoário *T. cruzi*. Tanto quimiocinas e as citocinas inflamatórias apresentaram alta correlação positiva entre si quanto esses mesmos mediadores inflamatórios com a citocina regulatória IL-10, lembrando-se que apesar de seu papel regulador e protetor associado à infecção pelo *T. cruzi* (Roffê, et al 2012), a IL-10 apresenta-se elevada na circulação em decorrência do aumento do processo inflamatório sistêmico observado nos animais.

Em suma, em decorrência dos poucos estudos em seres humanos ou mesmo em modelos animais utilizando o CA na infecção pelo *T. cruzi*, foi possível observar que esse fármaco apresenta interferência direta ou indireta sob a população circulante de parasitos e, além disso, exerce efeito parcial tanto na redução da produção de CCL-2 circulante quanto na de TNF- α no sítio cardíaco. De qualquer forma, estudos em associação com outros fármacos que também apresentam efeitos pleiotrópicos sob a resposta imune, como é o caso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (Paula-Costa, et al 2010) e das sinvastatinas (Melo, et al, 2011, Silva et al 2012), trariam novas informações para o campo das terapias cardíacas associadas à infecção pelo *T. cruzi*, em modelo experimental, mas já criando uma perspectiva de análise críticas para os eventos inflamatórios e clínicos observados durante o manejo clínico dos indivíduos chagásicos.

7. Conclusão

7. Conclusão

Com o presente estudo sugere-se que o tratamento com o cloridrato de amiodarona interfere na resposta imune à infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* reduzindo parcialmente o parasitismo sanguíneo e a produção plasmáticas de CCL2 e TNF- α .

8 Referências Bibliográficas

8 Referências Bibliográficas

Adesse, D.; Azzam, E. M.; Meirelles, M. N. L.; Urbina, J.A.; Garzoni, L. R.; Amiodarone Inhibits *Trypanosoma cruzi* Infection and Promotes Cardiac Cell Recovery with Gap Junction and Cytoskeleton Reassembly In Vitro. *Antimi. Ag. Chemot.* 2011, p. 203–210

Alarcon de Noya B, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201(9):1308–1315

Aliberti J.C.; Souto J.T.; Marino A.P., Lannes-Vieira J, Teixeira M.M.; Farber J, Gazzinelli R.T; Silva J.S.; 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 Apr;158(4):1433-40.

Andrade L.O.; Andrews N.W.; The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Oct;3(10):819-23.

Andrade, L. O.; Andrews, N. W. The *Trypanosoma cruzi* and host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews|Microbiology.* 2005. doi:10.1038/nrmicro1249.

Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J 2008. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil, 1ª. ed., Imperial Novo Milênio, Rio de Janeiro, vol. 1, 64 pp.

Argolo, A.M; Félix, M.; Pacheco, R.; Costa, J. Doença de Chagas e seus principais vetores do Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. 2008. p. 1-63.

Bahia, M .T.; Andrade, I. M.; Martins, T. A.F.; Nascimento, A. F. S.; Diniz, L. F.; Caldas, I. S.; Talvani. A.; Trunz, B. B.; Torreele. E.; Ribeiro, I.; Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. *PLOS Neg. Trop. Dis.* 2012. 11- 1870.

Benaim, G.; Sanders, J. M.; Garcia-Marcha, Y.; Colina, C.; Lira, R.; Caldera, A. R.; Payares, G.; Sanoja, C.; Burgos, J. M.; Leon-Rossell, J.; Schijman, A. G.; Levin, M.; Oldfield, E.; Urbina, J.A.; Amiodarone Has Intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi*. Activity and Acts Synergistically with Posaconazole. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 892-899.

Benaim, G.; Hernandez-Rodriguez, V.; Mujica-Gonzalez, S.; Plaza-Rojas, L.; Li Silva, M.; Parra-Gimenez, n.; Garcia-Marchan, Y.; Paniz-Mondolfi, A.; Uzcanga, G.; In Vitro Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Dronedarone, a Novel Amiodarone Derivative with an Improved Safety Profile; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, Volume 56 Number 7 p. 3720–3725

Benchimol-Barbosa PR. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. *Int J Cardiol.* 2010; 145(3):494–496.

Benchimol-Barbosa, P.R.. (2010). "Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation". *International Journal of Cardiology* 145 (3): 494–496. DOI:10.1016/j.ijcard.2009.08.030. PMID 19762096.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21(5):476–482.

Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M.J.; Montgomery, S.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011. Oct. p. 655–681

Brener, Z., Gazzinelli. R. T.; Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997 114:103-110. [PubMed]

Caldas, S.; Caldas, I. S.; Diniz, L. F.; Lima, W. G.; Oliveria, R. P.; Cecílio, A. B.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bahia, T. M.; Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Tropica* .2012. 170– 177.

Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2002 44:29-37.

Cançado, J.R.; Long term evaluation of evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with Benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2002- 41-29-37.

Carlier, Y.; Torrico, F.; Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2003, 6:767–771.

CHAGAS, C. 1901. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Me. do In. Oswaldo Cruz,* 3-219-275.

Chocair P.R.; Sabbaga E.; Amato Neto V, Shiroma M, de Goes GM. Kidney transplantation: a new way of transmitting chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1981 Nov-Dec;23(6):280-2.

Chocair, P.R.; Amata Neto, V.; Sabbaga, E; Torrecillas, P.H., 1985. Aspectos clínico-diagnósticos relativos à fase aguda da doença de Chagas, em pacientes submetidos a transplante de rim e imunossuprimidos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* 1985.18: 43-45

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, Silva JS, Canizzaro H, Gazzinelli RT, Teixeira MM. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte

recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol.* 2002; 71(5):837–44. [PubMed: 11994509].

Coelho, S. P.; Klein, A.; Talvani, A.; Coutinho, S.F.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Silva, J. S.; Canizzaro, H.; Gazzinelli, R. T.; Teixeira, M.M.; Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- α -primed-macrophages. *Jou. Leuk. Bio.* 2002 71- 837-844.

Connolly, S. J.; Evidence-Based Analysis of Amiodarone Efficacy and Safety. *Connolly Circulation* 1999;100:2025–2034.

Coura, J. R.; Borges-Pereira, J.; Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012. 45 - 286-296.

Cummings, K. L.; Tarleton R.L.; Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Par.* 2003-129- 53–59

Cutrullis RA, Moscatelli GF, Moroni S, Volta BJ, Cardoni RL, et al. (2011) Benznidazole Therapy Modulates Interferon- γ and M2 Muscarinic Receptor Autoantibody Responses in *Trypanosoma cruzi*-Infected Children. *PLoS ONE* 6(10): e27133. doi:10.1371/journal.pone.0027133.

Da Silveira, A.B.M.; Lemos, E.M.; Adad, S.J.; Correa-Oliveira, R.; Furness, J.B.; Reis, D.A. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum. Pathol.* 2007.7 Rissi, M.A.; Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int. J. Cardiol.*, 1998 66:183-194.

Diniz, L. F.; Caldas, I. S.; Guedes, P. M.M.; Crepalde, G.; Lana, M.; Carneiro, C. M.; Talvani, A.; Urbina, J. A.; Bahia, T. M. Effects of Ravuconazole Treatment on Parasite Load and Immune Response in Dogs Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicro. Ag. Chemo.* 2010, p. 2979–2986

Diniz, L. F.; Urbina, J. A.; Andrade, I. ; Mazzeti, A, L.; Martins, T .A. F.; Caldas, I. S.; Talvani, A.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T.; Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLOS Neg. Trop. Dis.* 2013. 7- 2367.

dos Santos PVA, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Prevalence of CD8⁺ T-cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 2001. 3: 971-984.

Doval, H.C.; Nul, D.R.; Vancelli, H.O., Randomized trial low dose amiodarone severe congestive heart failure. *Lancet* 1994;344:493-498

Dutra W.O.; Gollob, K.J.; Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Jun;21(3):287-92. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f88b80.

Frade, P. F.; Ianni, B. M.; Saba, B.; Lin-Wang, H. T.; Nogueira, L. G.;¹Borges, A. M.;¹Fabício Dias, F.; Ferreira, L. R. P.; Schmidt, A.; Hirata, M.; Sampaio, M.; Fragata, A.; Pereira A, C,¹ Donadi, E.; Kalil, J. Rodrigues, V.; Cunha-Neto, E.; Chevillard, C.; Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 587

Golgher D, Gazzinelli R, T.; Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity.* 2004;37(5):399-409

Gómez-García, L.; López-Marín, N, L. M.; Saavedra, R.; Reyes, J. L.; Rodríguez-Sosa M.; Terrazas, L.; Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells *Parasite Immunology.* 2005. 27, 10-11, 395–405.

Guedes, P. M. M.; Veloso, V. M.; Talvani, A.; Diniz, L. F.; Caldas, I. S.; Valle-Tattac, M.; Santiago-Silva, J.; Chiarid, E.; Galvão, L. M. C.; Silva, J. S.; Bahia, M. T.; Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in Beagle dogs. *Vet. Immu. and Immunopa.* 2010. 136. 106–113.

Herendael, H. V.; Dorian, P.; Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. *Vascular Health and Risk Management* 2010;6 465–472.

Herwaldt, B. L.; Leishmaniasis *Lancet*; 1999; 354: 1191–99

Machado, C. M.; Chagas Disease in Transplantation: Time to Enter an Era of Better Diagnosis and Better Outcomes. *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 3065–3066

Machado, F. S.; Jelicks, L. A.; Kirchhoff, L. V.; Shirani, J.; Nagajyothi, F.; Mukherjee, S.; Nelson, R.; Coyle, C. M.; Spray, D. C.; Carvalho, A. C.; Guan, F.; Prado, C. M.; Lisanti, M. P.; Weiss, L. M.; Montgomery, P. S.; Tanowiutz, H. B.; Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas. *Semin Immunopathol.* 2012 34(6): 753–770. doi:10.1007/s00281-012-0351-7

Machado, F.S.; Jelicks, L. A.; Kirchhoff, L. V.; Shirani, J.; Nagajyothi, F.; Mukherjee, S.; Nelson R.; Coyle, S. M.; Spray, D. C.; Campos de Carvalho, A.; Guan, F.; Prado, C. M.; Lisanti, M. P.; Weiss, L. M.; Montgomery, S. P.; Tanowitz, H. B.; Chagas Heart

Disease: Report on Recent Developments, *Cardiol Rev.* 2012 20(2): 53–65. doi:10.1097/CRD.0b013e31823efde2.

Melo, L. ; Caldas, I. S. ; Azevedo, M. A. ; Gonçalves, K. R. ; da Silva do Nascimento, A. F. ; Figueiredo, V. P. ; de Figueiredo Diniz, L. ; de Lima, W. G. ; Torres, R. M. ; Bahia, M. T. ; Talvani, A. . Low Doses of Simvastatin Therapy Ameliorate Cardiac Inflammatory Remodeling in *Trypanosoma cruzi*-Infected Dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2011 v. 84, p. 325-331.

Menezes, C.;Costa, G. C.; Gollob, k. J.; Dutra, W. O.; Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res.*, 2011, 72(6): 471–479. doi:10.1002/ddr.20454

Morris, S. A., M. Wittner, L. Weiss, V. B. Hatcher, H. B. Tanowitz, J. P. Bilezikian, and P. B. Gordon. Extracellular matrix derived from *Trypanosoma cruzi* infected endothelial cells directs cellular phenotypic expression. *J. Cell. Physiol.* 1990. 145:340-346.

Paiva, C.N^o; Figueiredo, R.T.,; Kroll-Palhares, K.; Silva, A.A.; Silvério, J.C.; Gibaldi D.; Pyrrho Ados, S.; Benjamim, C.F.; Lannes-Vieira, J.;Bozza, M.T.; CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 2009 86(5):1239-46. doi: 0.1189/jlb.0309187.

Paula-Costa, G.;Silva, R. R.;Pedrosa, M. C.;Pinho,V.; Lima, W. G.; Teixeira, M. M.; Bahia, M. T.;Talvani, A.; Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. *Parasite Immunology*, 2010, 32, 202–208.

Pérez, A. R.; Berbert, L. R.;Lepletier, A.;Revelli, S.; Bottasso, O.;Silva-Barbosa, S. D.;Savino, W.; TNF- α Is Involved in the Abnormal Thymocyte Migration during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection and Favors the Export of Immature Cells. *Plos One* .2012 -7 – 34360.

Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wiertzerbin J, Bottasso OA, et al. (2001) Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87: 539–547.

Ramasawmya, R.;Menezes, E.;Magalhães, A.; Oliveira,J.;Castellucci, L.;Almeida, R.; Rosaa, M. E. A.; Guimarães,L. H.;Lessa,M.; Noronha,E.; Wilson, M.E.; Jamiesong,S. E.;Kalil,J.; Blackwell,J. M.; Carvalho, E. M.;Jesus, M. R.; The -2518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010 10(5): 607–613. doi:10.1016/j.meegid.2010.04.006

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A.; Chagas disease. *Lancet.* 2010; 375:1388–1402.

Roffê, E.; Rothfuchs, A. G.; Santiago, H. C.; Marino, A. P. M.P.; Ribeiro-Gomes, F.; L.; Eckhaus, M.; Antoelli, L. R. V.; Murphy, P. M.; IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol.* 2012. 15; 188(2): 649–660. doi:10.4049/jimmunol.1003845.

Rossi, M.A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.*, 1991-335-340.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol.* 2006 64: 554-56.

Silva R.R.; Shrestha-Bajracharya D.; Almeida-Leite C. M.; Leite R.; Bahia M.T.; Talvani A. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Jun;107(4):513-21

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT. Kinetics 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 Infect.* 2000; 2(8):851–66. [PubMed: 10962268]

Talvani A.; Ribeiro, C.S.; Aliberti, J. C. S.; Michailowsky, V.; Santos, P. V. A.; Murta, S. M. F.; Romanha, J.; Almeida, I.; Farber, J.; Janes-Vieirad, J.; Silva, J. S.; Gazzinelli R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression. during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, 2, 2000, 851–866.

Talvani, A.; Rocha, M. O. C.; Barcelos, L. S.; Gomes, Y.; Ribeiro, A. L.; Texeira, M. M.; Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- α in Chagasic Cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases.* 2004. 38:943–50.

Talvani, A.; Texeira, M.M.; Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. *Adv. Paras.* 2011.76- 171-194.

Teixeira M.M.¹, Gazzinelli R.T.; Silva J.S.; Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002 Jun;18(6):262-5.

Teixeira, A. R. L.; Hecht, M.M. Guimaro, M.C.; Sousa, A.O.; Nitz, N.; Pathogenesis of Chagas Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Cli. Micro.Rev.* 2011. 592–630.

Urbina J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2009.

Vaidian, K. A.; Weiss, M. L.; Tanowitz, H. B. Chagas Disease and ADIS. *Kinetoplastid Biology and Disease.*2004, 3:1-6.

Valente, S. A.S.; Valente, V. C.; Fraiha-Neto, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999, 94(Suppl. 1):S395–S398.

Veiga-Santos, P.; Barrias, E. S.; Santos, J. F.C.; Moreira, T. L. B.; Carvalho, T. M. U.; Urbina, J. A.; Souza, W.; Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Inter.Jour. Antimi.Ag.*2012. 40. 61– 71

Wendel S; Transfusion-transmitted Chagas disease. *Curr Opin Hematol.* 1998;5(6):406-11.

Wendel, S. Transfusion-transmitted Chagas disease. *Current Opinion in Hematology,* 1998. 5:406–411.

WHO (World Health Organization). Chagas Disease. Seventeenth programme report UNDP/TDR. Geneva, Switzerland. 2005.

WHO (World Health Organization). First WHO report on neglected tropical diseases. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland. 2010. p 1-172.