



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA DA INFLAMAÇÃO



**INTERFERÊNCIA DAS TERAPIAS COM DOXICICLINA E BENZNIDAZOL
NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*.**

Ana Cláudia Alvarenga Carneiro

Ouro Preto - MG
Fevereiro de 2019

ANA CLÁUDIA ALVARENGA CARNEIRO

**INTERFERÊNCIA DAS TERAPIAS COM DOXICICLINA E BENZNIDAZOL
NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS CARDÍACOS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. André Talvani

Co-orientador: Prof. Breno de Mello Silva

Ouro Preto – MG

Fevereiro de 2019

C289i Carneiro, Ana Cláudia Alvarenga .
Interferências das terapias com doxiciclina e benznidazol nos parâmetros fisiológicos e inflamatórios cardíacos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Ana Cláudia Alvarenga Carneiro. - 2019.
84f.: il.: color; graf; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.

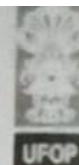
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Inflamação. 3. Ecocardiografia. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Ana Claudia Alvarenga Carneiro, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Eduardo de Almeida Marques da Silva (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Izabel Regina dos Santos C Maldonado (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Marcelo Eustaquio Silva (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Ana Claudia Alvarenga Carneiro 45 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Interferência das Terapias com Doxiciclina e Benznidazol nos Parâmetros Fisiológicos e Inflamatórios Cardíacos Na Infecção Experimental Pelo Trypanosoma Cruzi", na área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 0 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 27 de fevereiro de 2018.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Membro: _____

Doutorando: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia da Inflamação – ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

A Deus,

Amigo presente em todos os momentos.

É sempre bom parar para recomeçar. Dar uma chance a si mesmo, olhar para trás e sentir saudade, não tristeza porque a vida não volta no tempo. Dar boas risadas, sonhar alto, ter um novo objetivo para traçar sempre. Porque somos feitos de sonhos, de amor, precisamos de desafios, que nos impulsionem, e principalmente que teste a capacidade de saber que somos forte, depois de pensar que não podemos ir mais longe. Nossos pensamentos trazem para nós aquilo que desejamos e o tempo é sempre de aprendizado. O tempo. Este sim, nos faz crescer de alguma maneira, sem perceber, tornamos maduros o suficiente para resolvermos problemas que pareciam não ter solução. E não importa quanto tempo se passou, o importante é viver, é olhar para frente, porque o futuro depende do presente. Quanto tempo leva para tornarmos as pessoas que queremos ser? Às vezes a vida é curta, em determinadas ocasiões parece não ter lógica nenhuma e ainda continuamos insistindo, por que? Reitero, porque somos feitos de sonhos e precisamos sonhar a cada dia, precisamos ter persistência, e tentar de novo e mais uma vez, e se não der certo, de novo e de novo. De uma maneira diferente, de um jeito diferente, sempre levando nos olhos a oportunidade de querer fazer o melhor, de si mesmo, e no coração a esperança de que dias melhores virão, mesmo depois de pensar que não podemos mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar, me amparar, me abençoar e ajudar a cumprir mais uma etapa da minha vida.

À minha Madrinha, **Maria José Ribeiro** (*in memoriam*) e minha mãe **Ione de Alvarenga Cruz** (*in memoriam*) pelo amor incondicional, pelo exemplo de humildade, por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos, por contribuírem para minha formação e meu caráter. Vocês me ensinaram a lutar, a ter persistência, me ensinaram o valor da vida nas pequenas coisas, vocês foram e sempre serão minha fonte de inspiração e meus exemplos de vida! Á vocês, minha gratidão eterna.

A toda a minha família, minha avó **Maria da Conceição** (*in memoriam*), à minha tia **Vânia**, e **Josília**, pelo apoio e carinho dedicado, meus **irmãos** pelas conselhos e pela torcida e minhas **sobrinhas** por fazerem meus dias mais leves e divertidos.

Ao **Arlen**, meu amor, meu amigo, pela paciência e companheirismo sempre. Obrigada por ser meu porto seguro, por ouvir minhas lamentações quando fez-se necessário e principalmente por compartilhar minhas alegrias em cada objetivo cumprido, você fez parte de tudo isso me ajudando em todos os aspectos.

Ao **Prof. André Talvani Pedrosa da Silva**, pela orientação, pela amizade e contribuição durante o desenvolvimento do doutorado, serei sempre grata pela oportunidade, pela credibilidade e principalmente pelo incentivo, que foram necessários para que este trabalho se realizasse.

Aos colegas e amigos do **Laboratório de Imunobiologia da inflamação (Labiin)**, pela colaboração e parceria no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Laboratório de patologia animal, da UFV**. Principalmente, a professora Reggiani Gonçalves que abriu as portas de seu laboratório e a Mariáurea por me receber e permitir que eu realizasse parte dos meus experimentos, pela confiança e ajuda no manuseio dos equipamentos.

Ao **Laboratório de biomateriais e patologia experimental, da UFOP**. Em especial a professora Katiane que colaborou para a realização de uma parte experimental do trabalho, e colocou a disposição seus alunos para que me auxiliassem nas atividades.

Ao **Instituto de Biofísica do Instituto Carlos Chagas Filho, da UFRJ**. Em destaque o professor Antônio Carlos Campos de Carvalho e sua aluna, Isalira Ramos, que permitiram a realização de alguns experimentos fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos professores, mestres e amigos que foram essenciais durante toda minha jornada de aprendizado.

Aos amigos, **Renatinha, Karine, Letícia, Erica, Cyntia e Zorel** por terem compartilhado de tantas dificuldades e momentos bons, pela troca de experiências e pela amizade. Vocês são pessoas iluminadas, agradeço a Deus todos os dias por ter colocado vocês em meu caminho.

Aos **Laboratórios do NUPEB**, pela permissão e ajuda no uso de diversos equipamentos.

Ao **Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP**, pelo fornecimento e zelo com os animais.

À **Universidade Federal de Ouro Preto** por todas as oportunidades oferecidas, pelo ensino de qualidade e gratuito.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

A todos, que de alguma forma participaram e contribuíram com sua torcida para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia da doença de Chagas	2
1.2. O ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	4
1.3. As formas clínicas da doença de Chagas	5
1.4. O sistema imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	6
1.5. Papel do Benznidazol na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	9
1.6. Papel da Doxiciclina na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Animais	18
4.2. Parasitos e infecção	18
4.3. Tratamento, parasitemia e eutanásia	18
4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	21

4.5. Processamento do tecido muscular estriado cardíaco para microscopia óptica.	22
4.6. Técnica de Hematoxilina e Eosina (HE em resina)	22
4.7. Análise histopatológica	22
4.8. Ecocardiografia	23
4.9. Análise Estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Parasitemia	26
5.2. Sobrevida dos camundongos na fase crônica	28
5.3. Avaliação das citocinas e quimiocinas plasmáticas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	29
5.4. Análise Histopatológica do tecido cardíaco na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	31
5.5. Marcadores clínicos do prognóstico de alterações cardíacas funcionais	33
5.6. Síntese dos resultados de fase aguda e crônica da infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS	49
9. ANEXOS	60
9.1. Protocolo CEUA aprovado (2016/63)	61
9.2. Artigo submetido para publicação	63

RESUMO

A cardiopatia chagásica (CC) constitui a manifestação clínica mais importante da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Terapias farmacológicas têm sido propostas com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória e o dano cardíaco em hospedeiros infectados. Em particular, fármacos do grupo das tetraciclinas apresentam atividade anti-bacteriana, anti-fúngica e anti-protozoária em doses convencionais, mas em doses menores parecem atuar regulando a resposta inflamatória. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação da doxiciclina - Dox (tetraciclina), em dose submicrobiana, em monoterapia e em combinação com o fármaco antiparasitário benznidazol (Bz), durante as fases aguda e crônica da infecção experimental por *T. cruzi*, cepa VL-10, em camundongos C57BL/6. Os animais foram tratados por 20 dias com Dox (30 mg/Kg), Bz (100 mg/kg) e combinação (Dox + Bz) e a parasitemia foi realizada durante o período de tratamento/fase aguda. Estes animais foram acompanhados até a fase crônica (12 meses), quando realizou-se a ecocardiografia e posteriormente a eutanásia para a retirada de sangue/plasma para avaliação imunológica (CCL2, CCL5 e IL-10) e tecido cardíaco para a avaliação histopatológica. A Dox em monoterapia manteve os parâmetros parasitológicos e inflamatórios nos animais. Em vez disso, o Bz e a terapia combinada reduziram a parasitemia, os níveis plasmáticos de CCL2, CCL5 e a infiltração cardíaca durante a infecção aguda, além de reduzir os níveis plasmáticos de IL-10 e o volume sistólico do ventrículo esquerdo aos 12 meses. Entretanto, a Dox foi capaz de reduzir a massa do ventrículo esquerdo na fase crônica, enquanto o Bz em monoterapia reduziu os níveis plasmáticos de IL-10 durante a fase aguda e melhorou a fração de ejeção na fase crônica. Em suma, Dox não alterou os parâmetros imunológicos, mas melhorou a funcionalidade cardíaca, enquanto o Bz exerceu um papel modulador nos parâmetros imunológico, com efetividade parcial na melhora dos parâmetros cardíacos. Esses dados abrem perspectivas para que potenciais fármacos, como a Dox, atuem como futuros alvos terapêuticos, individualmente ou em combinação com outros fármacos, a fim de minimizar os danos causados durante a fase crônica da doença de Chagas.

Palavras – chave: *Trypanosoma cruzi*, doxiciclina, benznidazol, combinação, inflamação, ecocardiografia.

ABSTRACT

Chagasic cardiopathy (CC) is a more important clinical manifestation of *Trypanosoma cruzi* infection. Pharmacological therapies have been proposed aiming to reduce the inflammatory response and the cardiac damage in infected hosts. In particular, tetracycline drugs have anti-bacterial, antifungal and anti-protozoal activity in conventional doses, but at lower doses they appear to act regulating the inflammatory response. The present study objected to evaluate the action of doxycycline - Dox (tetracycline) in monotherapy and in combination with the antiparasitic drug benznidazol (Bz), during acute and chronic of the experimental infection by *T. cruzi*, strain VL - 10, in C57BL/6 mice. The animals were treated for 20 days with Dox (30 mg/kg), Bz (100 mg/kg) and combination (Dox + Bz) and a parasitemia was performed during the treatment/acute phase. These animals were followed up to the chronic phase (12 months), when the echocardiography was performed and subsequently to euthanasia for blood/plasma collection for immunological evaluation (CCL2, CCL5 and IL-10) and cardiac tissue for a histopathological evaluation. The Dox in monotherapy did kept the parasitological and inflammatory parameters in the animals. Instead, the Bz and the combination therapy reduced the parasitemia, the plasma CCL2, CCL5 and the cardiac infiltration during acute infection and in addition to reducing plasma levels of IL-10 and systolic volum at 12 months. However, Dox was able to reduced the left ventricle mass in the chronic phase while Bz in monotherapy was able to reduced the plasma IL-10 levels during acute phase and ameliorated the ejection fraction in the cronic phase. In conclusion, Dox did not alternate the immune parameters, but improved cardiac function while, in contrast, Bz exerted a modulatory role on immune parameters, with partial effectiveness in improving cardiac parameters. These data open perspectives so that potential drugs, such as Dox, can act as future therapeutic targets, individually or in combination with other drugs in order to minimize the damage caused during the chronic phase of Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, doxycycline, benznidazole, combination, inflammation, echocardiography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa demonstrativo da prevalência da doença de chagas em regiões endêmicas e não-endêmicas em 2010.....	2
Figura 2: Distribuição da estimativa global da população infectada pelo <i>T.cruzi</i> , 2010-2013.....	3
Figura 3: Ciclo de vida do <i>T.cruzi</i>	4
Figura 4: Hipótese proposta para células T regulatórias, que funcionam na imunorregulação na doença de Chagas crônica.....	8
Figura 5: Linha do tempo de infecção e tratamento.....	20
Figura 6: Curva e área sob a curva da parasitemia.....	26
Figura 7: Curva de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>T. cruzi</i> durante a fase crônica.....	29
Figura 8: Níveis plasmáticos de CCL-2, CCL5 e IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> sob diferentes estratégias terapêuticas.....	30
Figura 9: Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados com a linhagem VL-10 de <i>T. cruzi</i> , tratados ou não com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da doença de Chagas.....	32
Figura 10: Ecocardiograma do coração (VE) de camundongos C57B /6 infectados com a linhagem VL-10 de <i>T. cruzi</i> , tratados com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da doença de Chagas.....	34
Figura 11: Resultados experimentais comparativos da parasitemia, marcadores inflamatórios (CCL-2, CCL-5 e IL-10), inflamação e fração de ejeção (%EF) de camundongos C57BL/6 infectados com a linhagem VL-10 de <i>T. cruzi</i> , tratados com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da doença de Chagas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC – área sob a curva

Bz – benznidazol

DC – doença de Chagas

Dox – doxiciclina

DTH - hipersensibilidade tardia

DV – volume diastólico final

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECO – ecocardiografia

EF – fração de ejeção

ELISA - Ensaio imunoenzimático

FAC – variação fracional da área

HE – hematoxilina e eosina

IL – interleucina

INF- γ – interferon gama

LABIIN – Laboratório de Imunobiologia da Inflamação

MMPs – metaloproteinases de matriz

NK – *natural killer*

NO – óxido nítrico

OMS – organização mundial de saúde

VS – volume sistólico de ejeção

VDF – volume diastólico final

VSF – volume sistólico final

TNF – fator de necrose tumoral

VE – ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais.....19

Tabela 2: Dados da parasitemia dos grupos experimentais, avaliada durante 30 dias, após a infecção com a cepa VL-10 de *T. cruzi*.....27

Tabela 3: Dados da parasitemia dos grupos experimentais, avaliada durante 21 dias, após a confirmação da infecção com a cepa VL-10 de *T. cruzi*.....28

1. Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma doença parasitária tropical causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida principalmente por insetos vetores pertencentes à subfamília Triatominae (CHAGAS C., 1909). Como os triatomíneos são principalmente encontrados e disseminados na América latina, a DC é considerada endêmica nessa região (Fig 1), mas um número significativo de casos atribuídos aos imigrantes também é relatado nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália (CASTRO, 2009). Dessa maneira, tornou-se uma conduta essencial nos últimos anos, o monitoramento anti *T. cruzi* dos bancos de sangue nos países endêmicos. Com o aumento dos movimentos populacionais, a transfusão de sangue e transplantes teciduais são monitorados na América Latina, Estados Unidos, e em países da Europa (DESFORGES; KIRCHHOFF, 1993).

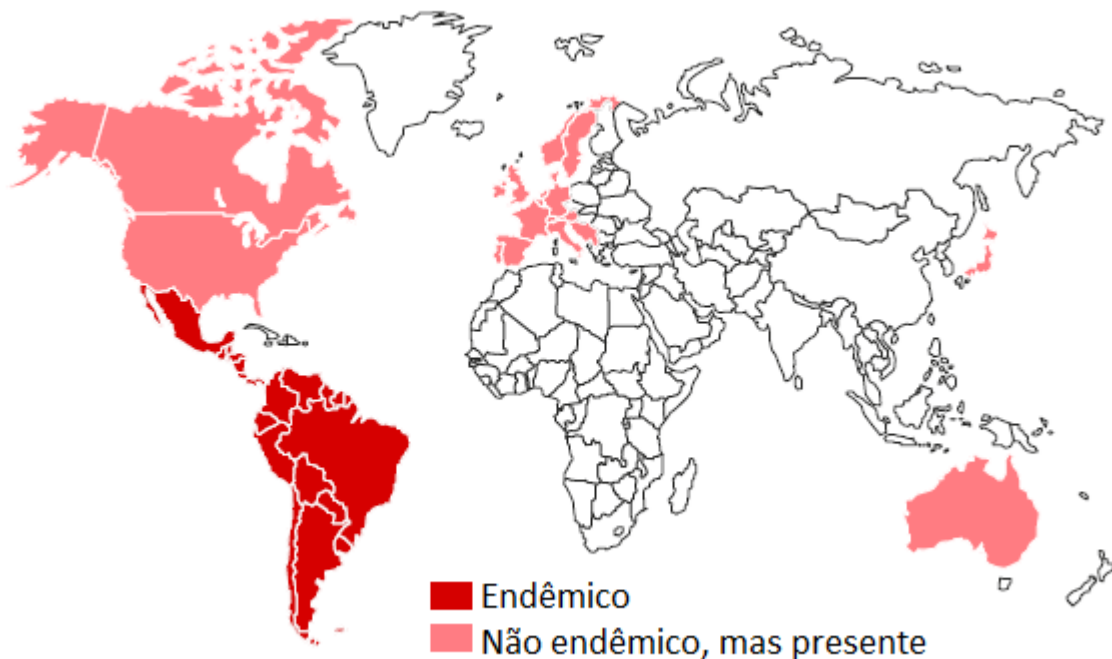


Figura 1: Mapa demonstrativo da prevalência da doença de chagas em regiões endêmicas e não-endêmicas em 2010. Fonte: WHO Weekly Epidemiological Record (WER) 6 de Fevereiro 2015, No. 6, 2015, 90 (pp. 33–44)

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) consideram que 6 a 7 milhões de novos casos ocorram anualmente e cerca de 100 milhões de pessoas estão em risco de infecção, sendo que nos últimos anos, com a aplicação de diversos programas voltados ao controle de vetores e à prevenção da transmissão por transfusões de sangue, tem sido alcançado um impressionante progresso na redução da DC. No entanto, a infecção pelo *T. cruzi* continua sendo uma séria ameaça para a saúde pública e, principalmente, pelo seu contexto terapêutico, é classificada como uma doença tropical negligenciada em países subdesenvolvidos, particularmente na América do Sul (“WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis)”, 2017). Estimativas para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2010, indicavam 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi*, das quais 62,4% eram residentes dos países do cone sul, como a Argentina, o Brasil, o México, e a Bolívia (AMERICA, 2015) (Fig.2). Todavia, estes dados se apresentam controversos ao serem comparados com estudos realizados por outros grupos, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da DC nas Américas.

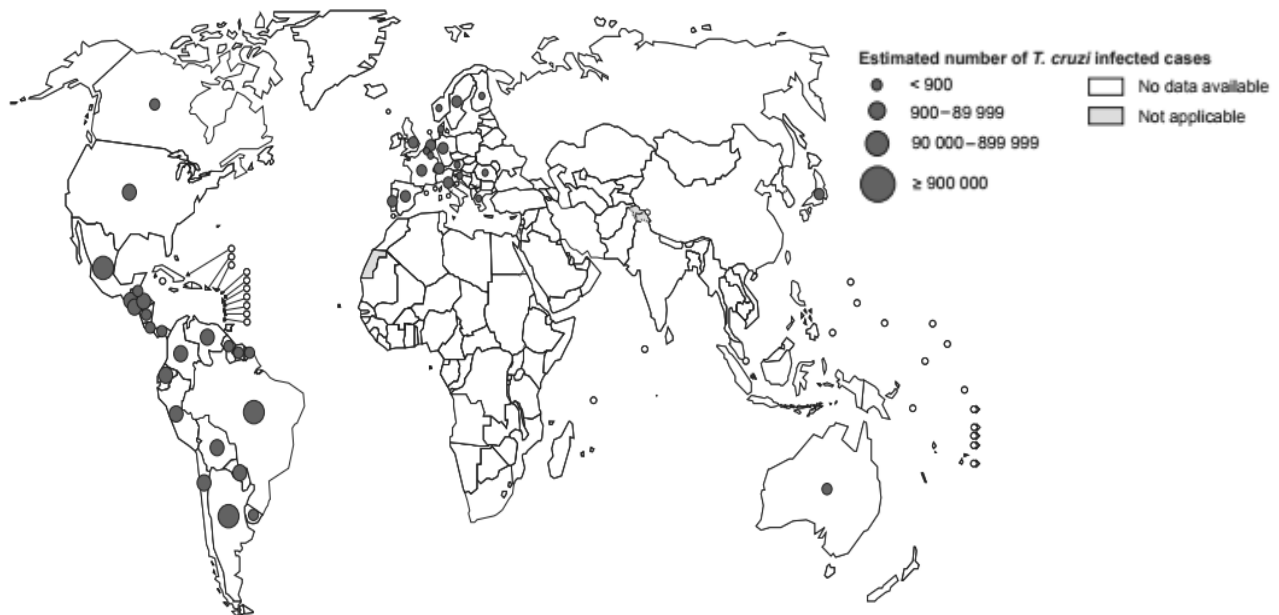


Figura 2: Distribuição da estimativa global da população infectada pelo *T.cruzi*, 2010-2013. Fonte: Adaptado - Terceiro relatório da organização mundial de saúde sobre doenças tropicais negligenciadas, WHO 2015.

Outra forma de transmissão é pela ingestão do parasito, o que pode ocorrer pelo consumo de caldo de cana de açúcar e açaí contaminados por triatomíneos ou por suas fezes infectadas (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). Acredita-se que a transmissão oral é a principal via de transmissão silvestre e de humanos na região amazônica (NATTAN-LARRIER, 1921; SVS BRASIL, 2011).

1.2. O ciclo evolutivo do *T. cruzi*

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida heteroxênico com diferenciação em quatro formas evolutivas (amastigota, epimastigota, tripomastigota sanguínea e tripomastigota metacíclica).

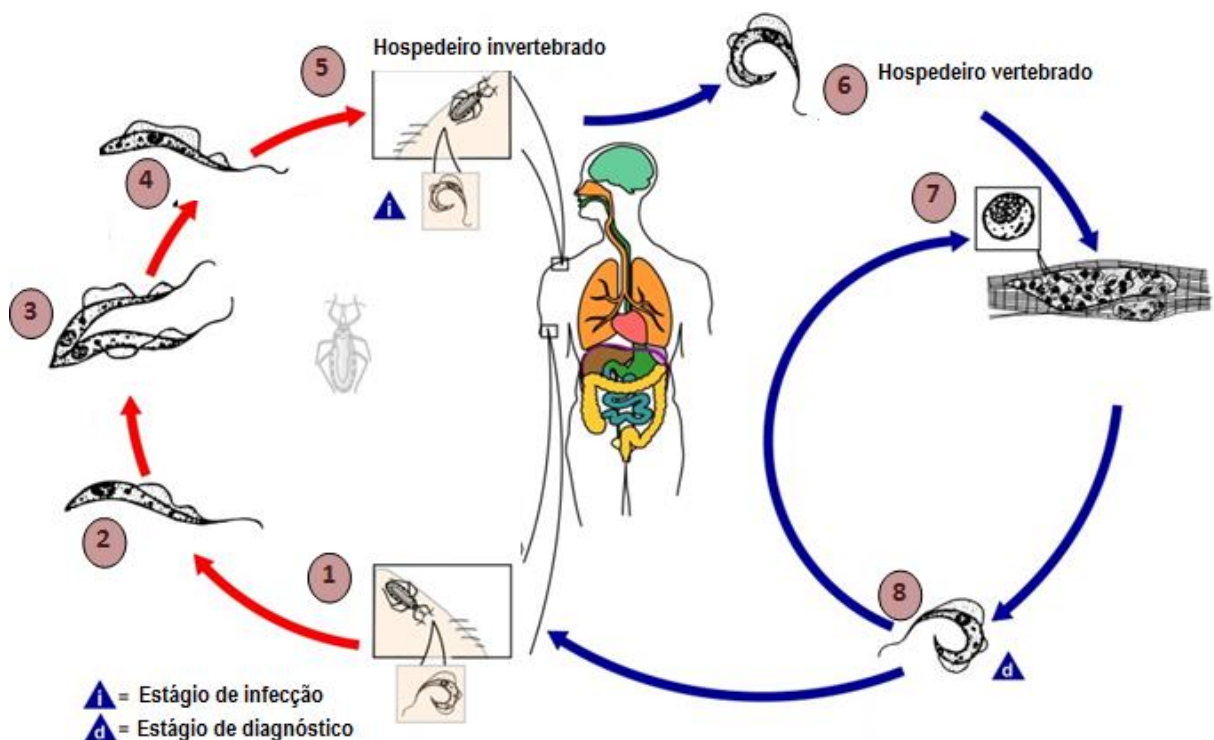


Figura 3: Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1) Ingestão das formas do tripomastigota sanguíneas (ou tripomastigota) pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo; 2) transformação da forma tripomastigota em epimastigota no intestino posterior do inseto; 3) forma epimastigota em multiplicação por divisão binária; 4) forma epimastigota transforma-se em forma tripomastigota metacíclica no reto do inseto; 5) forma tripomastigota metacíclica, nas fezes do triatomíneo, apta a penetrar em células do hospedeiro mamífero; 6) início da transformação do tripomastigota em amastigota; 7) essa forma multiplica-se intensamente por divisão binária dentro da célula; 8) rompimento da célula parasitada, liberando tripomastigota. A forma tripomastigota no sangue circulante; pode penetrar em outra célula reiniciando o ciclo. **Fonte:** Adaptado - Imagem cortesia dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças, A. J. da Silva e M. Moser, 2016.

O triatomíneo, durante repasto sanguíneo, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas residentes no sangue de mamíferos infectados que se transformarão na forma epimastigota (forma replicativa no hospedeiro invertebrado) dentro do estômago do inseto.

No intestino médio, o *T. cruzi* se divide por fissão binária e alcança a ampola retal apresentando-se na forma tripomastigota metacíclica (forma infectiva para o hospedeiro mamífero). Ao efetuar novo repasto sanguíneo o inseto pode defecar na pele do vertebrado eliminando as formas tripomastigotas metacíclicas que atingirão a corrente sanguínea após adentrar por uma secção do epitélio ou mesmo pela mucosa. Como o parasito, na forma tripomastigota, não replica, no citoplasma das células do vertebrado, ele se transformará na forma amastigota que, por divisão binária, originará novos parasitos. Após o citoplasma ser totalmente tomado por parasitos, haverá nova diferenciação para a forma tripomastigota sanguínea e a célula se romperá liberando os parasitos que infectarão novas células ou serão ingeridos por um triatomíneo novamente, reiniciando o ciclo (Fig.3) (NAGAJYOTHI et al., 2013).

1.3. As formas clínicas da doença de Chagas

A DC é classificada em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é caracterizada por parasitemia patente, parasitismo tecidual e processo inflamatório intenso composto de células T e macrófagos que são primordiais para o controle da replicação do parasito (ANDRADE; ANDREWS, 2005; ANDRADE, 1985; GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; HARDISON et al., 2006), podendo esta fase, ser sintomática ou assintomática.

A duração da fase aguda é de 4 a 12 semanas, e além da febre, neste período há aumento da parasitemia (PRATA et al., 2001). Indivíduos sintomáticos podem apresentar linfadenopatia e sinais de porta de entrada como sinal de Romanã ou chagoma de inoculação (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004). Além destes sintomas é possível que o indivíduo apresente meningoencefalite e miocardite aguda, caracterizada por uma intensa reação inflamatória adjacente à ruptura dos ninhos de amastigotas (após instalação do parasito no miocárdio). Embora mais comumente em crianças, estas manifestações características da fase aguda da doença podem levar o indivíduo à morte (RASSI et al, 2000).

À medida que a resposta imune progride e a parasitemia torna-se controlada, os indivíduos evoluem para a fase crônica e podem manifestar uma forma clínica denominada indeterminada ou assintomática, onde o indivíduo não apresenta nenhum tipo de manifestação clínica e na qual os parasitos só podem ser detectados por xenodiagnóstico, hemocultura,

imunoensaios ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) (BRENER, 1980; FRASCH; REYES, 1990). A forma indeterminada é mediada por uma resposta imune reguladora e pode persistir por toda a vida do indivíduo. Entretanto, cerca de 30% dos indivíduos infectados nesta fase crônica podem manifestar ou evoluir gradativamente para as formas clínicas, cardíaca ou digestiva (BRENER; GAZZINELLI, 1997; DIAS, 1989; MONCAYO, 1999). Essas formas são descritas pela presença de resposta inflamatória local, perda funcional do órgão afetado, perda da qualidade de vida e, em alguns casos, conduzir estes indivíduos ao óbito (PRATA et al., 2001). (PRATA et al., 2001). Sabe-se, no entanto, que a intensidade da doença crônica está relacionada com a intensidade da infecção aguda inicial (DIAS, 2000).

A presença do parasito no tecido cardíaco pode induzir alterações microvasculares que podem evoluir para uma degeneração cardíaca e inflamação crônica (MORRIS et al., 1990; PETKOVA et al., 2001). Nesse contexto, o ecocardiograma aparece como um dos exames sensíveis amplamente utilizados para o prognóstico tanto mais precoce quanto mais tardios de pacientes na fase crônica, destacando-se pela sua capacidade de detectar alterações funcionais ventriculares. A eficácia da ecocardiografia em estimar parâmetros funcionais ventriculares de forma não-invasiva abriu novas áreas de investigação para a detecção e quantificação de várias lesões cardíacas. Para tanto, a análise da ecocardiografia tanto em seres humanos quanto em outras espécies encontra-se atrelada a variáveis biométricas e funcionais como sexo, peso e frequência cardíaca em condições fisiológicas (PETRUS et al., 2010).

As razões pelas quais a DC se manifesta de formas distintas permanece desconhecida. A prevalência de diferentes formas clínicas da doença varia de acordo com a região geográfica (COURA, 1983; PRATA et al., 2001), mas as causas destas heterogeneidades clínicas e epidemiológicas não são completamente compreendidas. No entanto, sugere-se que as diferentes manifestações clínicas são dependentes de fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Dentre eles, pode-se citar: a cepa do parasito, a carga parasitária, o tempo de infecção, a natureza da resposta imune e a genética do hospedeiro (BRAZÃO et al., 2008; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; VAGO et al., 2000; LAGES-SILVA et al., 2006; MACEDO et al., 2004).

1.4. O sistema imune na infecção pelo *T. cruzi*

A infecção por *T. cruzi* induz a ativação de diferentes fatores relacionados à imunidade inata bem como à imunidade adquirida. Em consequência, o parasito é eliminado ou tem sua

replicação reduzida nas células do hospedeiro. A persistência do parasito, portanto, leva a uma atividade prolongada do sistema imune, resultando no aparecimento de lesões teciduais características da DC.

Já foi demonstrado o predomínio de linfócitos TCD8⁺ em relação aos linfócitos TCD4⁺ na miocardite chagásica crônica (BENVENUTI et al., 1997; REIS; HIGUCHI, 2000; TOSTES JÚNIOR et al., 1994). Portanto, a presença dos linfócitos TCD8⁺ no tecido cardíaco pode estar associada à lesão tecidual, devido à ação imunopatológica destas células contra o hospedeiro, que resulta em citólise e destruição da miofibra cardíaca (CUÑA & CUÑA, 1995).

Em contrapartida, dependendo do perfil dos linfócitos TCD8⁺, estas células podem apresentar papel protetor, principalmente durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (BRENER; GAZZINELLI, 1997; DUTRA; GOLLOB; GAZZINELLI, 1997; TARLETON, 1995). No modelo apresentado (Fig.4), as células T reguladoras são capazes de modular a função de células TCD8⁺, em um microambiente modulado por células *natural killer* (NK), monócitos e células TCD4⁺ que produzem citocinas reguladoras e outras interleucinas. Esta resposta imunológica contribui para o controle da parasitemia e a regulação da imunopatologia durante a fase crônica da doença.

Por outro lado, uma regulação insuficiente das células TCD8⁺ ativadas, além de monócitos e células TCD4⁺, induzem a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ). Este microambiente desencadeia eventos imunopatológicos e leva a danos teciduais na ausência de mecanismos reguladores e funções citotóxicas de células *natural killer* (NK). As células NK são de grande importância na imunidade inata contra o *T. cruzi*, limitando o crescimento parasitário e promovendo o desenvolvimento da imunidade adquirida (TRINCHIERI; GEROSA, 1996).

Adicionalmente, diferentes estudos demonstraram que a invasão de macrófagos leva à secreção de IL-12, que ativa as células NK a produzirem IFN- γ (ALIBERTI et al., 1996), que atua da mesma forma sobre macrófagos, ativando-os para a atividade microbicida (GAZZINELLI et al., 1992). O TNF produzido por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* participa dessa interação de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ . Diversos estudos demonstraram os papéis protetores do IFN- γ e do TNF (SANTOS LIMA et al., 1997), sendo que o TNF também apresenta efeitos deletérios na resposta do hospedeiro.

Pelo estudo associativo e de correlação com os parâmetros clínicos, acredita-se que a interação entre IFN- γ e algumas quimiocinas (CCL-2 e CCL-5) e seus receptores possa contribuir diretamente para as alterações cardíacas observadas naqueles cardiopatas crônicos (CUNHA-NETO et al., 2009). Nesse sentido, a quimiocina CCL2 foi previamente evidenciada no plasma de indivíduos chagásicos correlacionada com diferentes graus de disfunção cardíaca (TALVANI et al., 2004a) e, nesta população, aqueles indivíduos apresentando uma variante de CCL2 na posição 2518A/G apresentavam quatro vezes mais risco de desenvolver cardiopatia em relação àqueles que não apresentavam este genótipo (RAMASAWMY et al., 2006).

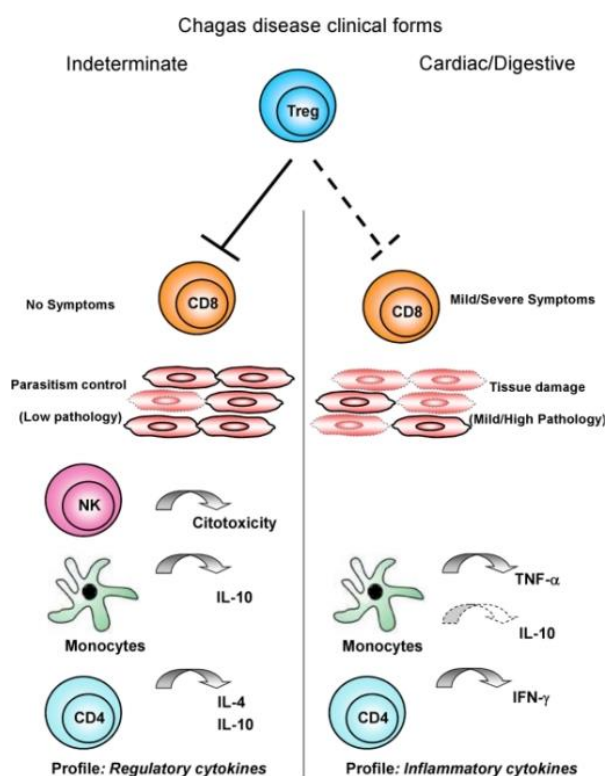


Figura 4: Hipótese proposta para células T reguladoras, que funcionam na imunorregulação na doença de Chagas crônica. Vários subconjuntos de leucócitos demonstraram desempenhar um papel na imunorregulação durante infecções crônicas. **Fonte:** ARAÚJO, F.; et al., 2011.

De forma contrária, o receptor para a quimiocina CCL5, expresso em leucócitos circulantes, mostrou-se correlacionado em outros estudos com formas mais brandas da cardiopatia (TALVANI et al., 2004b) e mutações no promotor CCL5 na posição 59029/G

foram relacionadas a uma baixa expressão destes receptores associadas a pacientes assintomáticos (FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004).

Dessa forma, se a resposta imune não é capaz de controlar o parasitismo sem promover danos teciduais e, se não há terapêutica eficaz contra o parasito, torna-se importante a investigação de alvos terapêuticos que possam atuar também na regulação da resposta imune. Independentemente de sua abordagem clínica, social e epidemiológica, a abordagem terapêutica da DC ainda é alvo de muitos estudos, uma vez que os fármacos existentes anti-*T. cruzi* são eficazes, principalmente na fase aguda da doença. Além de paralelamente à ação terapêutica, levarem a efeitos colaterais, esses fármacos precisam ser continuamente investigados quanto à sua eficácia na fase crônica da doença, assim como é importante a investigação de outros fármacos que apresentam uma abordagem clínica e que possam atuar na eliminação do parasito e conseqüentemente na diminuição da patologia do indivíduo chagásico, ou mesmo na diminuição da inflamação.

1.5. Papel do benznidazol na infecção pelo *T. cruzi*

Uma estratégia terapêutica para interromper a progressão inflamatória cardíaca associada à infecção pelo *T. cruzi* seria a eliminação do agente etiológico. O benznidazol (Bz), fármaco empregado para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil, é também descrito por alterar a resposta imune em humanos e em modelo experimental (BUSTAMANTE; BIXBY; TARLETON, 2011; CUTRULLIS et al., 2011; PIAGGIO et al., 2001) além, de exercer sua função tripanocida primária, por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (BERN, 2011; URBINA, 2010). Porém, a magnitude da ação do Bz ou de outros potenciais fármacos anti-*T. cruzi* sobre o sistema imune e, conseqüentemente, sobre os eventos de remodelamento cardíaco na DC ainda não foram totalmente descritos.

O "derivado nitro benznidazol" (N-benzil-2-nitroimidazole acetamida) ainda é o fármaco tripanocida mais utilizado contra o *T. cruzi*. Infelizmente, esta droga tem baixa eficácia e leva a reações adversas (COURA; DE CASTRO, 2002; URBINA, 2015). Dentre os efeitos colaterais mais comuns a este fármaco tem-se reações de hipersensibilidade que ocasionam dermatites, toxicidade hepática, intolerância digestiva, edemas e depressão da medula óssea que leva ao abandono imediato do tratamento (SALOMON, 2011).

Como a resposta inflamatória contra o parasito persiste por décadas causando danos cardíacos silenciosos em humanos, um novo consenso sobre o tratamento com Bz foi proposto visando a redução ou eliminação de carga parasitária, o que poderia causar menos inflamação (MARIN-NETO et al., 2008; VIOTTI; VIGLIANO, 2007). Desta forma, a administração de Bz durante a fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi* evita o desenvolvimento de uma forma mais grave de cardiopatia, (GARCIA et al., 2005) em parte pela redução da carga parasitária, afetando a regulação imune do hospedeiro (PERDIGÃO OLIVIERI; COTTA-DE-ALMEIDA; ARAÚJO-JORGE, 2002). De fato, em estudos preliminares *in vitro* foi demonstrado que o Bz atua de forma negativa para a expressão do gene NOSII que atua inibindo óxido nítrico e também promovendo a inibição de NF- κ B de macrófagos após estimulação com lipopolissacarídeo e IFN- γ (PIAGGIO et al., 2001). Foi observado também que o Bz é capaz de inibir citocinas inflamatórias, os anticorpos específicos, a produção de óxido nítrico e o recrutamento de leucócitos para o coração durante a infecção por *T. cruzi* em modelos humanos e experimentais (CUTRULLIS et al., 2011; DALIRY et al., 2014; PIAGGIO et al., 2001; SATHLER-AVELAR et al., 2006).

Po outro lado, os resultados recentes de um ensaio clínico randomizado que compara o Bz com placebo em pacientes internados com DC demonstraram que a terapia não diminuiu a cardiopatia (MARIN-NETO et al., 2008; MORILLO et al., 2015), necessitando assim de novas opções de tratamento. A cura da doença é confirmada pela depuração completa de anticorpos específicos, que podem levar décadas em infecção crônica (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA et al., 2015; VIOTTI et al., 2006). Pela ausência de fármacos efetivos na eliminação dos parasitos, surge a vertente investigativa focando fármacos que, direta ou indiretamente, atuam sobre a resposta imune do hospedeiro reduzindo-a e, conseqüentemente, equilibrando ou amenizando o remodelamento deletério cardíaco (ZORNOFF et al., 2002).

Nesse contexto, torna-se imprescindível que novos estudos possam ser realizados com o Bz na fase crônica da DC, assim como com outros fármacos promissores, que em substituição ou até mesmo em associação ao Bz possam trazer efeitos benéficos no que diz respeito à cura parasitológica de pacientes infectados com o *T. cruzi* ou até mesmo promover uma redução da inflamação nos tecidos cardíacos, o que implica numa progressão da qualidade de vida desses pacientes. Em particular, alguns grupos farmacológicos têm recebido atenção do nosso grupo de pesquisa na última década em decorrência de suas ações

pleiotrópicas sobre a resposta imune como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (DE PAULA COSTA et al., 2010; PENITENTE et al., 2015), as estatinas (MELO et al., 2011; SILVA et al., 2012) e, como objeto da presente proposta, fármacos da classe tetraciclina de antibióticos, as doxiciclinas (Doxs) (DE PAULA COSTA et al., 2016).

1.6. Papel da doxiciclina na infecção por *T. cruzi*

A cardiopatia induzida por *T. cruzi* é sabidamente uma doença dependente da resposta inflamatória do hospedeiro ocasionando destruição celular/tecidual e consequente remodelamento na matriz extracelular cardíaca. Esse remodelamento é regulado por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs) e por diversos outros mediadores inflamatórios. Mediante estímulos específicos, essas enzimas podem ser ativadas e alterar a homeostase da matriz extracelular, levando a um rearranjo local e consequente perturbação na função dos cardiomiócitos, o que pode ocasionar hipertrofia e hiperplasia do tecido cardíaco (LEE et al. 1997; THICHAULT et al. 2001).

A doxiciclina (Dox) foi previamente empregada em diferentes estudos não objetivando apenas sua ação primária bacteriostática, mas por suas ações de inibição sobre as MMPs em doses sub-microbianas (CASTRO et al., 2011). A interferência de Dox em doenças cardíacas, mesmo quando ministrada em doses subantimicrobiais, está relacionada com as ações inibidoras sobre as metaloproteinases de matriz (MMP), principalmente as MMP-2 e 9, evitando a ocorrência do remodelamento não fisiológico e, conseqüentemente, prevenindo patologias como lesão de isquemia/reperfusão, disfunção contrátil e inflamação da artéria coronária (CHEUNG et al., 2000; LÉON et al., 2008; LAU et al., 2009; CADETE et al., 2012). Sendo um fármaco bacteriostático, a Dox inibe a síntese proteica bacteriana, possuindo um largo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, cocos, aeróbios e anaeróbios (SMILACK et al., 1999). Além disso, não sofre influência da administração de alimentos, sendo distribuída à maioria dos fluidos, ossos, fígado, baço e dentes. Essa tetraciclina é absorvida por via oral (90% a 100%), parcialmente inativada pelo metabolismo hepático, atinge seu nível sérico entre 2 a 4 horas e apresenta meia-vida de 12 a 22 horas, sendo eliminada pelas fezes enquanto outras tetraciclinas são excretadas por filtração glomerular (GRIFFIN et al., 2010).

Estudos sugerem que a Dox evita o dano tecidual induzido por *T. cruzi* (no coração e na placenta) e diminui a carga parasitária nas vilosidades coriônicas, o que sugere fortemente um papel fundamental das MMPs na infecção e invasão do tecido placentário

(POTENTIALLY et al., 2012). Além disso, a Dox é conhecida por seu efeito significativo na modulação dose-dependente de mediadores inflamatórios (TNF, IL-1beta, IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 e CCL4) em diferentes tipos de linhagens celulares (JOKS; DURKIN, 2011; LI et al., 2006).

Além dos efeitos inibitórios já descritos da Dox nas MMPs em corações infectados por *T. cruzi* (GUTIERREZ et al., 2008), foi mostrado que Dox estava agindo, nos cães infectados, através da produção de citocinas, reduzindo, portanto a inflamação cardíaca e as manifestações clínicas no estágio final desta infecção (DE PAULA COSTA, et al., 2016). Dessa forma, a Dox, ao lado de outros potenciais fármacos, mostra-se promissora no contexto da inibição das MMPs e, possivelmente, da resposta inflamatória causadora do “mau remodelamento” cardíaco associado à infecção por *T. cruzi*.

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *T. cruzi* ainda é um problema social e acomete milhares de indivíduos na América Latina e em outros continentes. Sendo o quadro clínico desta infecção associado à resposta inflamatória do hospedeiro mamífero e, não havendo ainda terapia eficaz para eliminar este parasito, principalmente na fase crônica da doença estabelecida, é importante que alternativas sejam encontradas para amenizar o quadro patológico cardíaco e o risco de mortalidade entre os indivíduos infectados pelo parasito. Fármacos que atuem no controle da resposta inflamatória poderiam trazer benefícios morfofuncionais ao coração do hospedeiro, como fazem os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), beta-bloqueadores, as estatinas e, mais recentemente, fármacos do grupo das tetraciclinas (ex.: Doxiciclinas - Dox). As Dox, ao lado de outros potenciais fármacos, são promissoras no contexto da inibição das metaloproteinases de matriz e, possivelmente, da resposta imune causadora da inflamação cardíaca associada à infecção por *T. cruzi*. Sabemos que as drogas tripanocidas são supressoras de parasitemia e que, para agir no parasito em sua forma intracelular, as doses teriam que atingir níveis tóxicos, não devendo ser utilizadas na clínica (BONAINAIN, et al., 2010). Devido à ineficiência dos atuais tratamentos etiológicos contra o *T. cruzi*, em particular, na fase crônica da doença, estratégias farmacológicas que diminuam ou modulem a resposta inflamatória sistêmica e/ou tecidual, poderiam reduzir os danos observados durante a cardiopatia chagásica. Neste contexto, além do estudo do Bz, conhecido como o fármaco de escolha anti-*T. cruzi*, propomos a investigação da Dox administrada de forma isolada ou em associação com o Bz. Este fármaco poderia atuar minimizando ou revertendo o quadro clínico decorrente das respostas inflamatórias do sistema imunológico frente à infecção por *T. cruzi*, o que poderia implicar em uma progressão na qualidade de vida dos pacientes.

3.Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as ações do tratamento com a doxiciclina (Dox) e de sua combinação com o benznidazol (Bz), na resposta inflamatória e fisiopatológica frente à infecção experimental por *T. cruzi*, durante a fase aguda e crônica da infecção, em camundongos C57BL/6.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar, os efeitos dos tratamentos com Dox e/ou Bz quanto à replicação dos parasitos (parasitemia) na fase aguda e a sobrevida dos animais na fase crônica da infecção;
- Quantificar a produção plasmática de CCL2, CCL5 e IL-10 nos animais infectados e tratados com os respectivos fármacos na fase aguda e crônica da infecção;
- Avaliar alterações histopatológicas no miocárdio na fase aguda e crônica da infecção;
- Avaliar as alterações ecocardiográficas, durante a fase crônica da infecção, após administração da Dox e/ou do Bz, no início da infecção.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos adultos com idade de 6-8 semanas pesando 18-20g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantidos em “racks” ventiladas, sem restrição de água e ração (autoclavadas) nas instalações do CCA. Os procedimentos adotados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal pré-estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, protocolo nº 2016/63 (Anexo 9.1).

4.2. Parasitos e infecção

Foram utilizados parasitos da cepa “VL-10” do *T. cruzi* armazenados em nitrogênio líquido e mantidos *in vivo* por sucessivas passagens em camundongos Swiss, mantidos no CCA-UFOP.

A infecção intraperitoneal foi feita com a administração de 5000 formas tripomastigotas sanguíneas retiradas de camundongos Swiss próximo ao pico de parasitemia, com o objetivo de minimizar a seleção de formas do parasito. O sangue foi diluído em salina 0,9% para ajuste da concentração desejada e o inóculo realizado por via peritoneal nos animais com quatro semanas de idade.

4.3. Tratamento, parasitemia e eutanásia

Os animais foram separados em cinco grupos contendo seis camundongos em cada grupo (n=6) e treze camundongos em cada grupo (n=13), para a realização dos experimentos de fase aguda e de fase crônica respectivamente, de acordo com a natureza do tratamento. Apenas o grupo “1” permaneceu não infectado. Os grupos foram distribuídos de acordo com mostrado na **tabela 1** e os procedimentos realizados são descritos conforme desenho esquemático representado na **figura 5**.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupo	<i>T. cruzi</i>	Machos (Fase aguda)	Machos (Fase crônica)	Tratamento
1	Não	06	13	Nenhum
2	Sim	06	13	Nenhum
3	Sim	06	13	Doxiciclina (Dox)
4	Sim	06	13	Benznidazol (Bz)
5	Sim	06	13	Dox + Bz

*Os animais foram divididos em cinco grupos separadamente, para a realização dos experimentos de fase aguda e de fase crônica.

O tratamento com os fármacos Dox e Bz em monoterapia e em associação foi iniciado 10 dias após a infecção por *T. cruzi*, e administrados durante 20 dias consecutivos, por via oral (gavagem), em um volume diário de 0,2mL (diluídos em PBS + carboximetilcelulose (0.5%)), sendo as doses diárias de 30mg/kg (Dox) e 100mg/kg (Bz).

A parasitemia foi medida na fase aguda da infecção através do exame a fresco de uma gota (5µl) de sangue obtida pela secção da cauda. As determinações de parasitemia foram feitas pelo método descrito por BRENER (1962), para verificar a presença de parasitos circulantes.

Para os grupos pertencente à fase aguda a eutanásia foi realizada quando os animais completaram um mês de infecção, e para os grupos pertencentes à fase crônica a eutanásia foi realizada quando os animais completaram doze meses de infecção de acordo com as diretrizes de práticas de eutanásia, baseado no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). No dia da eutanásia, uma amostra de 1,0 ml de sangue foi coletada para obtenção de plasma, os animais foram sedados com anestésicos na dose de 80 mg/kg e relaxante muscular, na dose de 8 mg/kg via intramuscular. O sangue total foi coletado dos vasos adjacentes que irrigam a região do retro orbital utilizando a pipeta pasteur contendo heparina, e submetidos à centrifugação refrigerada por 4°C, à 3500rpm durante 10 minutos, e

posteriormente o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos cônicos da marca *eppendorff* de 1,5mL estéril no freezer -80°C para realização de ensaios imunoenzimáticos.

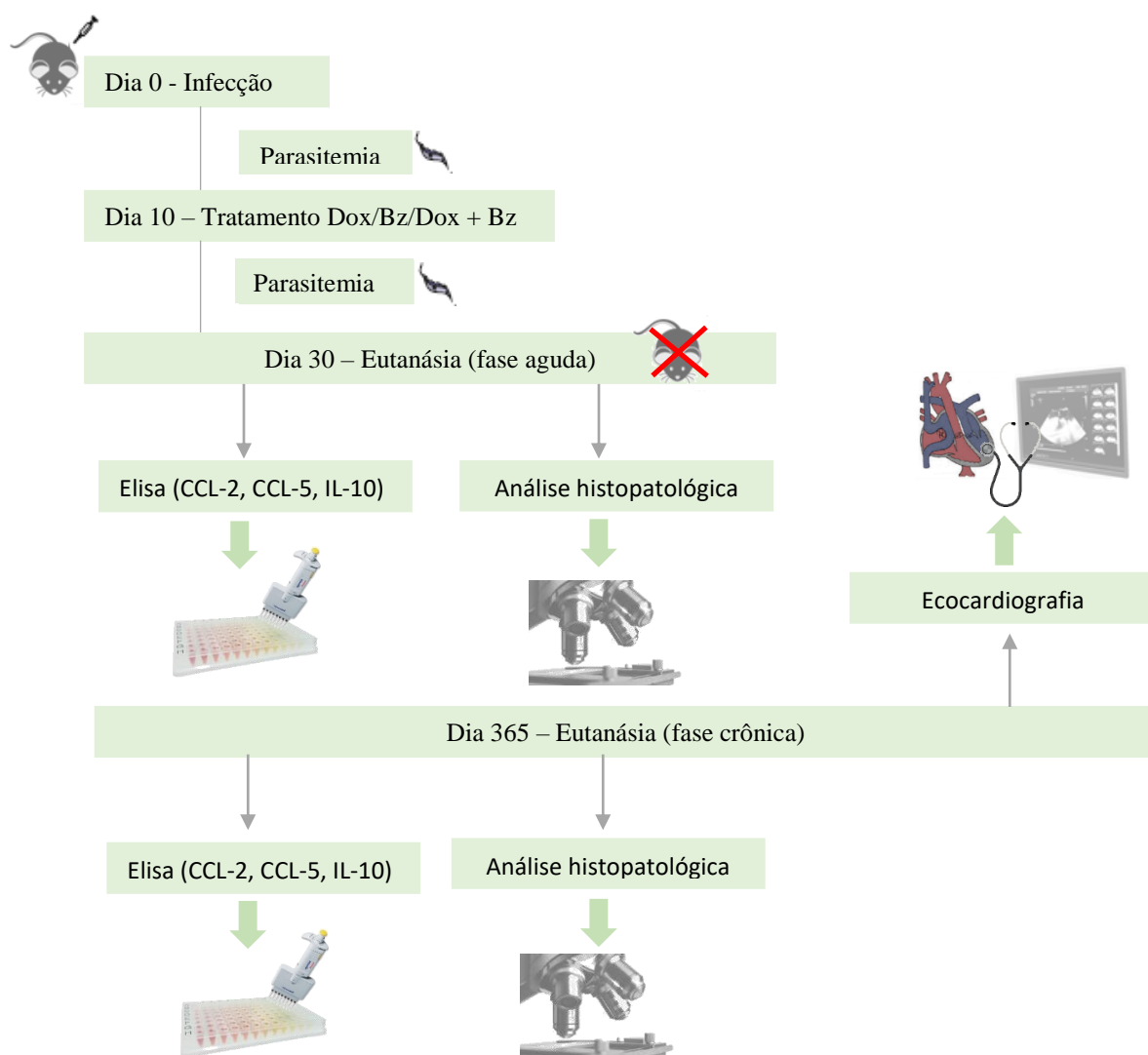


Figura 5: Linha do tempo de infecção e tratamento. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados com Bz, Dox e a combinação dos dois fármacos por 20 dias. Após um mês, os animais de fase aguda foram eutanasiados e o coração foi excisado para a realização de exames histopatológicos e o sangue coletado para a realização de imunoenaios. Para os animais pertencentes a fase crônica, após 12 meses foi realizado o ecocardiograma e, em seguida, os animais foram eutanasiados e o coração foi excisado para a realização de exames histopatológicos e o sangue coletado para a realização de imunoenaios.

O coração foi excisado e lavado com PBS 1x para remoção de possíveis coágulos em seguida ele foi pesado e seccionado longitudinalmente na metade. Uma secção do coração foi armazenado em cassete embebido em formaldeído tamponado a 10%, no dia seguinte, o formaldeído foi substituído por álcool 70% e mantido no álcool até o processamento em

resina para possível análise histológica e morfométrica. A outra parte seccionada do coração foi armazenada em tubo eppendorf, cada grupo foi identificado corretamente e armazenado em freezer -80°C para análise através de ensaios imunoenzimáticos. Outros órgãos (baço e músculo esquelético) foram excisados para futuros estudos que serão desenvolvidos em nosso laboratório. Todos os órgãos supracitados foram retirados inteiros, pesados e só depois fragmentados para conservação/fixação.

4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Ensaio imunoenzimáticos foram empregados para avaliação da produção das quimiocinas CCL5 e CCL2 (Peprotech, EUA) e para as citocina anti-inflamatória, interleucina-10 (Peprotech, EUA) na fase aguda e crônica da infecção, no plasma dos camundongos infectados ou não por *T. cruzi* e tratados ou não com os fármacos Dox e Bz. Os ensaios, assim como a preparação das soluções utilizadas, foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (Peprotech, EUA).

Para os procedimentos foram utilizadas placas de 96 poços (Kasvi) e, em cada poço adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra a proteína (anticorpo de captura), diluídos em PBS, sendo estas placas incubadas por 16 horas, à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos foram descartados por inversão e através de sucessivas lavagens em PBS-Tween. Posteriormente as placas foram bloqueadas com 300 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante uma hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente. As amostras de plasma foram adicionadas em um volume de 25µl para cada poço. Concomitante, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para a construção da curva padrão e, em seguida as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente.

Após a lavagem dos poços, os anticorpos secundários (anticorpo de detecção) foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase em PBS-BSA 0,1% adicionados às placas que permaneceram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens dos poços, adicionamos o cromógeno para revelação, o cromógeno utilizado foi o ABTS. Foram adicionados 100ul de ABTS à temperatura ambiente em cada poço, e em seguida as placas foram incubadas à temperatura ambiente até o aparecimento da cor (aproximadamente 60 minutos, mas pode variar, por isso deve-se monitorar o desenvolvimento da cor a cada 5 minutos). Posteriormente, após o aparecimento da cor foi

realizada a leitura no leitor óptico de microplacas utilizando um comprimento de onda de 405nm e 630nm. A quantificação das quimiocinas e citocinas foi realizada a partir da densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas dos peptídeos, analisadas pelo *software* *SOFTmax PRO* 4.0.

4.5. Processamento do tecido muscular estriado cardíaco para microscopia óptica

Os animais dos cinco grupos experimentais pertencentes à fase aguda foram eutanasiados após um mês de infecção e os animais dos cinco grupos experimentais pertencentes à fase crônica foram eutanasiados após doze meses de infecção. Durante esse procedimento os fragmentos do coração foram coletados e imediatamente fixados em formaldeído tamponado à 10%, no dia seguinte o formaldeído foi substituído e armazenado em álcool 70%. Posteriormente os tecidos de fase aguda foram processados e incluídos em resina histológica (*Histo-resin - Leica Basic resin*®), dessa forma, os blocos foram submetidos à microtomia em secções de 3µm de diâmetro para confecção das lâminas que foram, posteriormente, coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina – H&E.

4.6. Técnica de H&E

Para análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no tecido cardíaco dos animais de fase aguda e crônica da infecção, foi realizada a coloração por H&E em fragmentos do coração incluídos em resina. Secções com 3µm de espessura foram submetidos à testes de coloração para padronização do tempo, após padronização, os corantes foram filtrados, e as cubas foram lavadas em água corrente antes e depois do uso. Dessa forma, para os corantes utilizados, os cortes foram corados pela hematoxilina por 7 minutos, lavados em água corrente por 1 minuto. Em seguida, os cortes foram corados pela eosina por 3 minutos e lavados por 30 segundos em água corrente. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas contendo os cortes, foram colocadas na placa aquecedora na temperatura de 70°C para secagem e, posteriormente montadas com lamínulas e entellan.

4.7. Análise histopatológica

Para todas as análises presentes nos cortes histológicos, as imagens foram digitalizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B com um micro câmera acoplada e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica QWin V3 no laboratório multiusuários de microscopia da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi avaliado

através da quantificação de todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração em 25 imagens aleatórias ($35.493,7 \mu\text{m}^2$) obtidas através da objetiva de 40x e padronizadas pelo teste de estabilidade, no programa excel. O mesmo foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados \pm desvio padrão. Os animais infectados com o *T. cruzi* que apresentavam valores de quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.

4.8. Ecocardiografia

A avaliação da função ventricular nos indivíduos chagásicos é essencial, visto a elevada prevalência de pacientes cardiopatas crônicos que se apresentam assintomáticos, podendo apresentar um considerável aumento da área cardíaca e distúrbios de ritmo e/ou condução cardíaca, representando pior prognóstico associado a risco elevado de morte súbita (BESTETTI, et al., 1997). A acurácia e a reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as dimensões e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmadas em uma variedade de estudos (GUAZZI et al., 1999; NIENABER, TACHIBANA, NAGA PRASAD, ESPOSITO, WU, MAO & ROCKMAN, 2003; SANTOS et al, 2006).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Instituto e Centro nacional de biologia estrutural e bioimagem quando os camundongos completaram doze meses de infecção, sob anestesia em fluxo contínuo de oxigênio misturado ao anestésico, mantendo a frequência cardíaca em valores semelhantes entre os grupos para evitar influência da mesma sobre os índices de contratilidade cardíaca. O animal anestesiado foi colocado decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento Vevo 770 da Visual Sonics com o transdutor de 30MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de cerca de 14MHz, para otimização e resolução e a penetração do animal. A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) foi realizada a análise Simpson em modo B (bidimensional) em níveis dos músculos papilares e obtida as medidas das seguintes variáveis: fração de ejeção (%EF), variação fracional da área (%FAC), volume diastólico final (VDF), volume sistólico final (VSF) e área do ventrículo esquerdo (mm^2). A análise Simpson em modo M (unidimensional) em níveis dos músculos papilares e obtida as medidas das seguintes variáveis: Massa do ventrículo esquerdo (mg), e volume sistólico de ejeção (μl).

4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de média \pm erro padrão. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* e os dados separadamente foram analisados utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov* para confirmar os padrões de normalidade. Os testes *OneWay ANOVA* e *Kruskal-Wallis* foram utilizados para múltiplas comparações com pós-teste *Bonferroni* ou *Tukey-Kramer e Dunn's*, respectivamente. E para a comparação dos resultados experimentais foi utilizado o teste *t-Student*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*. Para todas as análises, foi adotado um nível de significância $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Parasitemia

A parasitemia foi determinada por 30 dias nos animais infectados e tratados com os diferentes fármacos, o equivalente à fase inicial da infecção. Na **figura 6.A**, observou-se que o tratamento com a Dox não foi capaz de inibir a replicação do parasito, mantendo o seu perfil similar ao perfil dos animais sem tratamento.

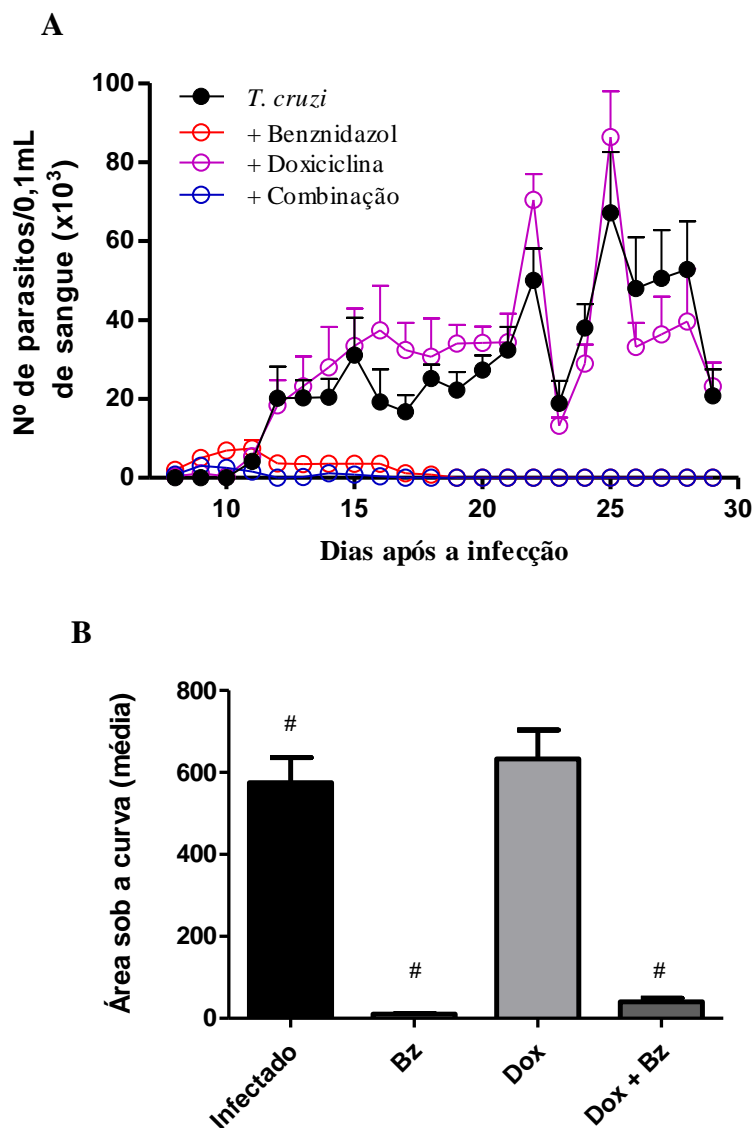


Figura 6: Curva e área sob a curva da parasitemia. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados com Bz, Dox e combinações, (n=6/grupo) na fase inicial da infecção. Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/dia referente a cada grupo (A); Área sob a curva da parasitemia calculada após a confirmação da infecção pelo *T. cruzi* (B). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão, (n = 6), onde o símbolo (#) significa diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo infectado não-tratado (*Teste One-Way ANOVA, pos-teste de Tukey*)

Por outro lado, o Bz quando administrado em monoterapia e em associação com a Dox, reduziu o pico e o perfil da curva de parasitemia. Esses dados da área sob a curva da parasitemia estão representados na **figura 6.B**. O pico de parasitemia dos animais infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* ocorreu no 25º dia da infecção, como observado na **figura 6.A** e a média da parasitemia ao longo dos dias está representada na **tabela 2**. Logo após o pico da parasitemia é importante observar uma redução da parasitemia tanto no grupo de animais tratados com Dox quanto no grupo de animais sem tratamento, no entanto a redução da parasitemia ocorre de maneira mais acentuada no grupo tratado com a Dox.

Todos os animais que foram infectados apresentaram parasitemia positiva. Além disso, conforme os dados respresentados na **tabela 2**, não foram observadas diferenças significativas entre o período pré-patente nos animais do grupo infectado não-tratado (11 dias) em relação aos demais grupos (8 dias). Por outro lado, o período patente dos grupos infectados e que receberam o tratamento com o Bz e com a combinação, foi significamente menor quando comparados ao grupo infectado não-tratado.

Tabela 2. Dados da parasitemia dos grupos experimentais, avaliada durante 30 dias, após a infecção com a cepa VL-10 do *T. cruzi*.

Grupo	Período pré-patente (dias)	Período patente (dias)	Pico de Parasitemia 25º dia (média)	Nº de animais com parasitemia negativa/total
<i>T. cruzi</i>	11	≥19	67.15	0/6
+ Bz	8	9*	0	0/6
+ Dox	8	≥22	86.35	0/6
+ Combinação	8	11*	0	0/6

*= indica diferença significativa em relação ao grupo infectado não-tratado (Teste *t-Student*).

Na **tabela 3** estão representados os dados da média da parasitemia (análise feita durante 21 dias após confirmação da presença do parasito no sangue dos camundongos infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi*), e a média da área sob a curva de parasitemia, assim como a correlação do grupo infectado que não recebeu tratamento e dos grupos que receberam o tratamento. Os resultados obtidos por análise da área sob a curva (ASC) demonstraram que os animais do grupo infectado não-tratado apresentaram maiores níveis de parasitemia quando comparados aos grupos que receberam o tratamento com o Bz, e com a combinação.

Tabela 3. Dados da parasitemia dos grupos experimentais, avaliada durante 21 dias, após a confirmação da infecção com a cepa VL-10 do *T. cruzi*.

Grupo	Parasitemia (média + DP ¹)	Área sob a curva (média + DP ¹)	Grupo	Correlação Área sob a curva (média)
<i>T. cruzi</i>	584.435 ± 200.68	575.200 ± 194.00	-	-
+ Bz	10.105 ± 4.44*	10.300 ± 4.86*	<i>T.cruzi/bz</i>	57.836
+ Dox	643.284 ± 229.55	633.100 ± 223.70	<i>T.cruzi/dox</i>	0.908
+ Combinação	41.710 ± 27.06*	40.310 ± 26.83*	<i>T.cruzi/combinação</i>	14.269

¹ = Desvio Padrão;

= Os dados estão representados como média ± desvio padrão, (n = 6), onde o símbolo () indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo infectado não-tratado (Teste One-Way ANOVA, pos-teste de Tukey).

A média dos níveis de parasitemia dos animais infectados não-tratados foi 58 vezes maior que a observada no grupo que receberam o tratamento com o Bz, e 14 vezes maior no grupo que receberam o tratamento com Bz e Dox.

5.2. Sobrevida dos camundongos na fase crônica

Os camundongos pertencentes a fase crônica da infecção, foram avaliados quanto a sobrevida, durante o período de infecção (doze meses). E de acordo com os dados obtidos, os animais infectados com o *T. cruzi* e tratados com a Dox em monoterapia e com a combinação tiveram a menor taxa de sobrevivência, como observado na **figura 7**. Em contrapartida, os animais infectados e tratados com o Bz em monoterapia apresentaram a taxa de sobrevivência similar aos animais pertencentes ao grupo controle, ou seja, próximo a cem por cento.

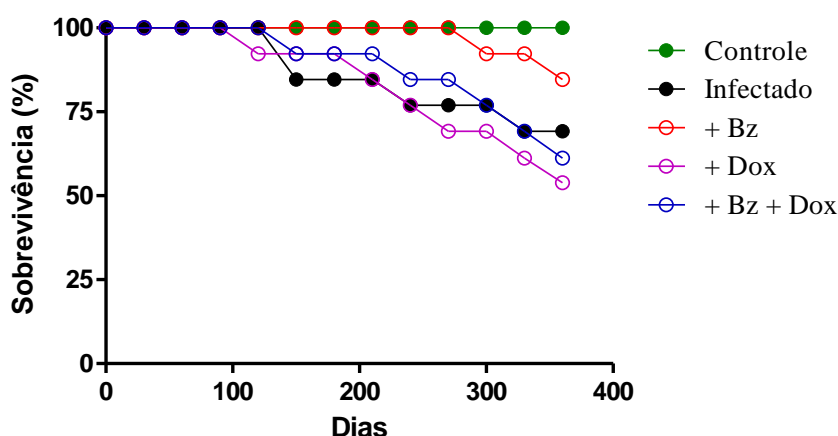


Figura 7: Curva de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* durante a fase crônica. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados com Bz, Dox e combinações, (n=6/grupo) na fase inicial da infecção. Os dados em cada ponto da curva equivalem a sobrevivência/dia (em porcentagem) referente a cada grupo experimental, descrito conforme legenda.

5.3. Avaliação das citocinas e quimiocinas plasmáticas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*

A resposta imune advinda dos diferentes tratamentos foi avaliada neste estudo por meio de ensaios imunoenzimáticos para as quimiocinas CCL2 e CCL5, bem como para a citocina anti-inflamatória IL-10, na fase aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

Quanto a produção plasmática da quimiocina CCL2 e da quimiocina CCL5 durante a fase aguda, observou-se uma redução dos níveis das mesmas nos camundongos tratados com o Bz e a combinação (**Fig.8; A e B**), comparado ao grupo infectado não-tratado, e ao grupo infectado tratado com a Dox. Já no grupo tratado com a Dox, observou-se que houve um aumento dos níveis plasmáticos das quimiocinas comparado ao grupo controle, mas não houve diferença significativa comparado ao grupo infectado não-tratado.

Os níveis de citocina regulatória IL-10 dosados no plasma dos camundongos tratados estão mostrados na **figura 8 (C)**. Para esta citocina observou-se que o fármaco Dox elevou a síntese desta citocina quando comparado aos grupos que receberam o tratamento com o Bz e a combinação, mas esse aumento não foi significativo quando comparado ao grupo infectado não-tratado. Em contrapartida, o grupo que recebeu o tratamento com Bz, diminuiu a síntese de IL-10 quando comparado ao grupo infectado não-tratado.

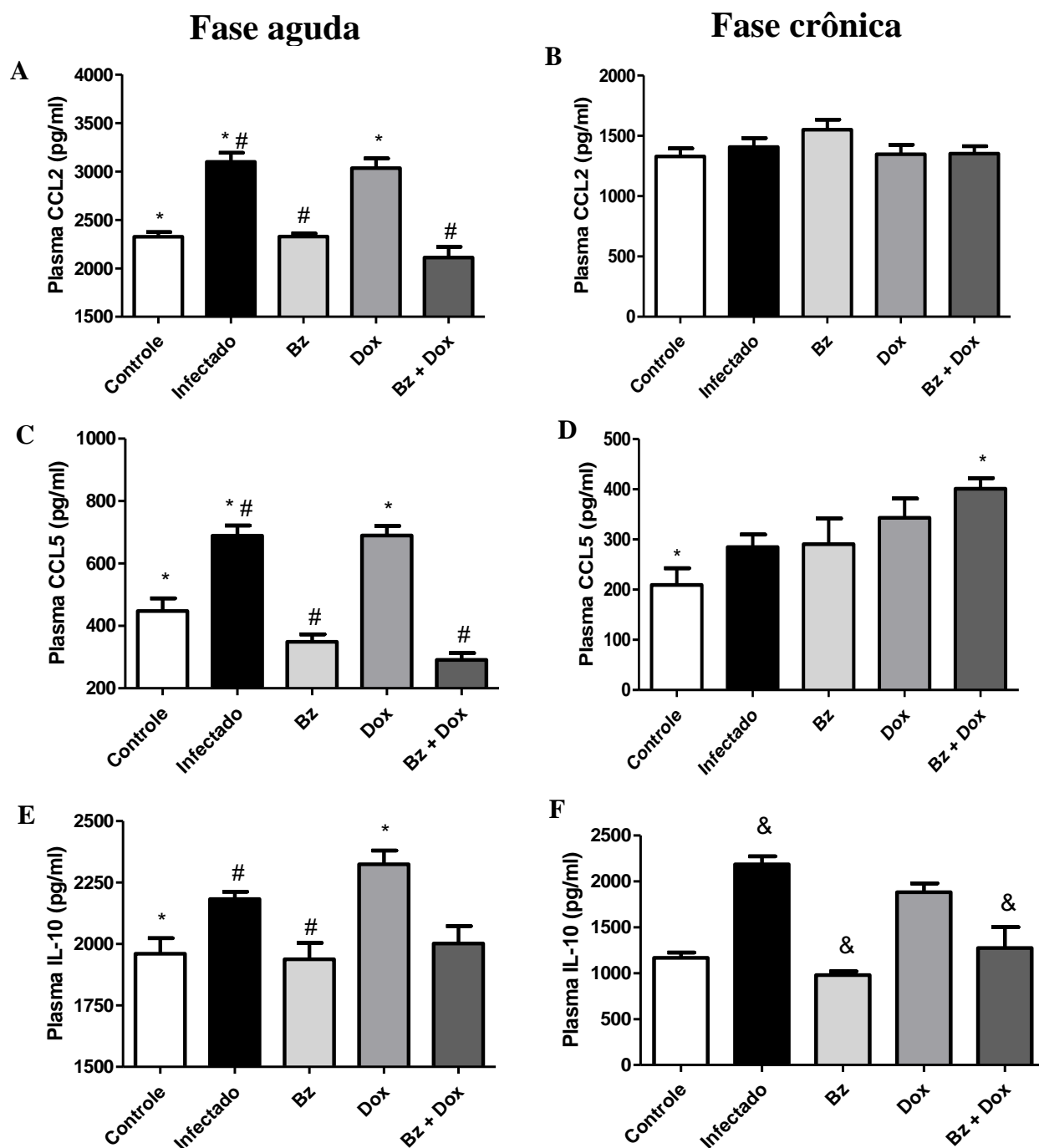


Figura 8: Níveis plasmáticos de CCL-2, CCL5 e IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* sob diferentes estratégias terapêuticas. Concentração de quimiocinas CCL2 (A, B), CCL5 (C, D) e IL-10 (E, F) de camundongos C57BL/6 infectados com a linhagem VL-10 de *T. cruzi* e tratadas com Bz, Dox e combinações durante e fase aguda e crônica da infecção. Os dados são representados como média \pm desvio padrão ($n = 6$), onde os símbolos (* e #) significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle e em relação ao grupo infectado não-tratado, respectivamente (teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

Já durante a fase crônica apenas o grupo tratado com a associação dos fármacos apresentou alta síntese de quimiocina CCL5 em relação ao grupo controle, como mostra a **figura 8 (D)**. Para a quimiocina CCL2, não houve diferença entre os grupos analisados, no entanto, para a citocina anti-inflamatória IL-10, a monoterapia com Bz diminuiu seus níveis plasmáticos durante a fase aguda e durante a fase crônica da doença, quando comparado ao grupo infectado não-tratado, como mostra a Figura 3 (**E; F**).

5.4. Análise histopatológica do tecido cardíaco na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*

O efeito do tratamento com Bz e/ou Dox foi observado sobre as alterações histopatológicas cardíacas durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Sendo os resultados qualitativos e quantitativos representados na **figura 9**.

Na fase aguda todos os animais infectados não-tratados apresentaram processo inflamatório cardíaco (**Fig. 9/B**), sendo o mesmo difuso e discreto, representado pela seta em vermelho. Os camundongos tratados com Bz (**Fig. 9/C**) e a combinação dos fármacos (**Fig. 9/E**) não apresentaram processo inflamatório cardíaco, no entanto, os camundongos que foram tratados com Dox apresentaram processo inflamatório difuso e discreto, sendo similar ao grupo de camundongos infectados não-tratados, como evidenciado pela análise quantitativa mostrada na figura **9 (F)**.

Na fase crônica da infecção não foi observado processo inflamatório nos grupos infectados não-tratados, assim como nos grupos que receberam o tratamento **figura 9 (G; H; I; J e K)**, mostrado também pela análise quantitativa (**Fig. 9/L**).

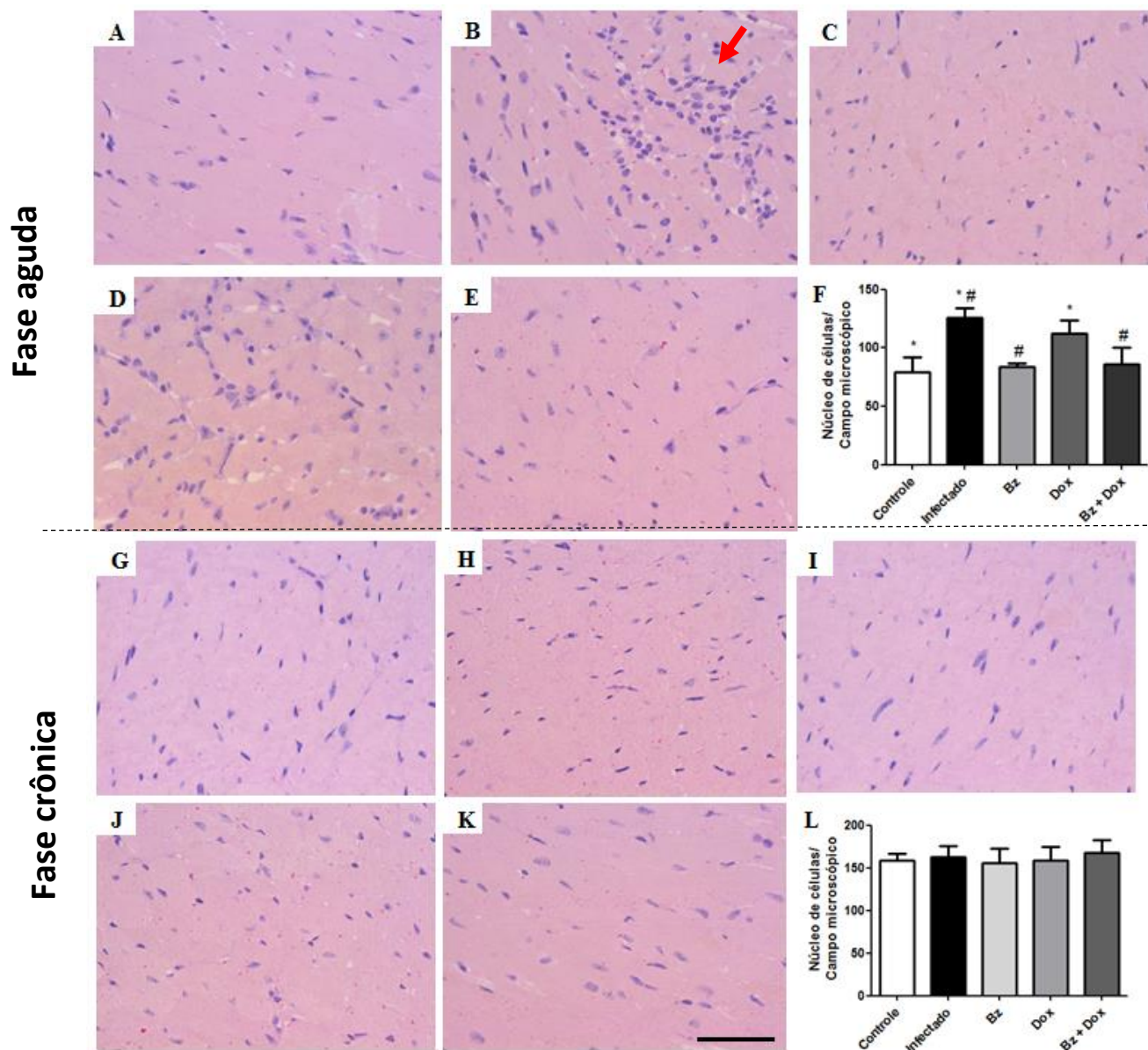


Figura 9: Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados com a linhagem VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da infecção experimental. (A, G) Aspecto histológico cardíaco normal em camundongos C57BL/6 não infectados; (B) Infiltrado inflamatório moderado e focal em camundongos infectados e não tratados; (C, I) Ausência de infiltrado inflamatório em camundongos infectados tratados com Bz; (D) Processo inflamatório discreto e focal em camundongos infectados tratados com Dox; (H) Ausência de processo inflamatório em camundongos infectados não tratados; (J) Ausência de processo inflamatório em camundongos tratados com Dox; (E, K) Ausência de processo inflamatório em camundongos tratados com a combinação dos fármacos; Hematoxilina-Eosina. Ampliação 40x. Barra = 50 μ m². (F, L) Análise do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco em camundongos infectados tratados com Bz, Dox e combinações. Seta (→) indica presença de infiltrado inflamatório. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão (n = 6), onde os símbolos (* e #) significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle e em relação ao grupo infectado não-tratado, respectivamente (One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.5. Marcadores clínicos do prognóstico de alterações cardíacas funcionais

As análises ecocardiográficas mostraram que a fração de ejeção (%EF), do grupo tratado com Bz equiparou ao grupo controle, o que representa uma melhora nesse parâmetro, no entanto os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo infectado não-tratado (**Fig. 10.A**). Já o grupo tratado com a combinação apresentou uma redução do parâmetro (%EF), comparado ao grupo que recebeu a monoterapia com o Bz, mas não apresentou diferença significativa comparado grupo infectado não – tratado.

Foi avaliado também, utilizando medidas ecocardiográficas, a variação fracional da área (FAC). A FAC bidimensional é um dos métodos mais recomendados para a estimativa quantitativa da função ventricular esquerda, sendo esta medida identificada como prognóstica independente de insuficiência cardíaca em estudos com pacientes após o acometimento de infarto do miocárdio (ANAVEKAR, 2008). As análises mostraram que não houve diferença significativa dos grupos que foram infectados e tratados em relação ao grupo infectado não-tratado, ao contrário do grupo infectado não-tratado, que diminuiu, comparado ao grupo controle (**Fig. 10.B**).

Já em relação à massa do ventrículo esquerdo (VE), podemos observar, que de acordo com as análises ecocardiográficas, houve um aumento significativo do grupo infectado não – tratado se comparado ao grupo controle, em contrapartida podemos observar que em relação ao grupo tratado em monoterapia com a Dox, houve uma redução significativa deste parâmetro comparado ao grupo infectado não-tratado e ao grupo infectado tratado com Bz, sendo que essa redução não foi significativa em relação aos demais grupos (**Fig. 10.C**).

Em relação ao volume sistólico de ejeção, as análises ecocardiográficas mostraram que houve uma redução significativa, do grupo infectado não-tratado e dos demais grupos que receberam o tratamento em relação ao grupo controle, como mostrado na **figura 10 (D)**. O volume sistólico de ejeção é o volume de sangue bombeado pelo ventrículo cardíaco esquerdo por batimento.

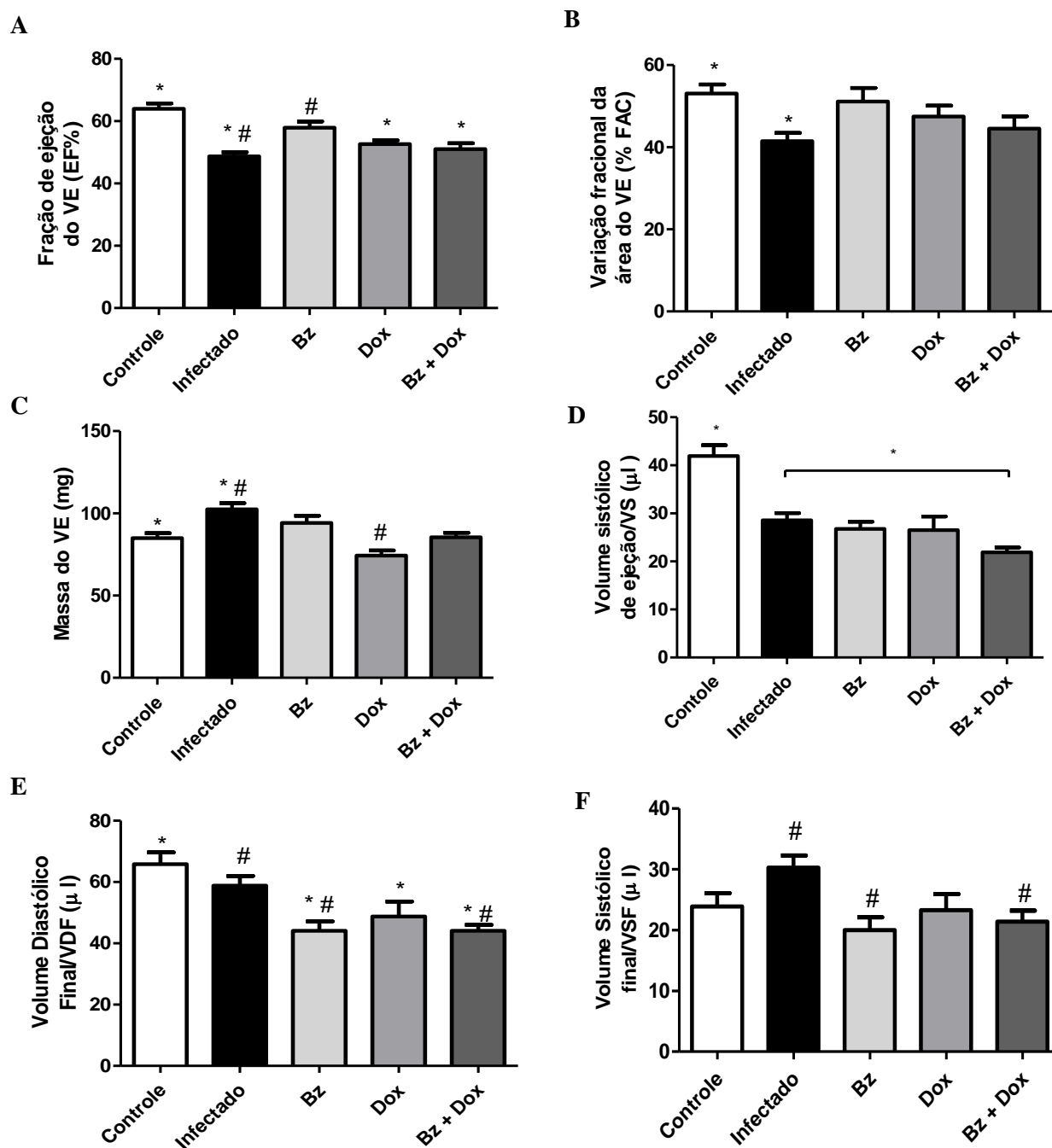


Figura 10: Ecocardiograma do coração (VE) de camundongos C57B /6 infectados com a linhagem VL-10 do *T. cruzi*, tratados com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Representação gráfica dos resultados das análises comparativas da Fração de Ejeção (A); Variação da Área Fracionada (FAC%) (B); Massa do ventrículo esquerdo (C); Volume sistólico de ejeção (D); Volume diastólico final (E); e volume sistólico final (F), de camundongos C57BL/6 infectados com a linhagem VL-10 de *T. cruzi* e tratados com Bz, Dox e combinações durante a fase crônica da doença. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão ($n = 6$), onde os símbolos (* e #) significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle e em relação ao grupo infectado não-tratado, respectivamente (teste One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey).

Por último, em relação ao volume diastólico final, após as análises ecocardiográficas, foi observado que houve uma diminuição significativa do volume no grupo infectado e tratado com Bz e a combinação, comparado ao grupo infectado não – tratado e ao grupo controle. Já em relação ao grupo infectado e tratado com Dox, podemos observar que não houve diferença significativa comparado ao grupo infectado não – tratado, mas houve uma diminuição significativa em relação ao grupo controle (**Fig. 10.E**). Esse perfil mostrou-se semelhante para as análises do volume sistólico dos grupos infectados que receberam tratamento em relação ao grupo infectado não - tratado (**Fig. 10.F**), entretanto, em relação ao grupo controle, não houve diferença entre os grupos analisados.

5.6. Síntese dos resultados de fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T.cruzi*

Resumidamente, nossos resultados mostram que o Bz e sua combinação com Dox reduziram a parasitemia, os níveis plasmáticos de CCL2, CCL5, IL-10 e o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco na fase aguda da infecção. Durante a fase crônica, o tratamento com Bz reduziu os níveis plasmáticos de IL-10 e apresentou melhora na fração de ejeção; os animais tratados com a combinação dos fármacos reduziram os níveis plasmáticos de IL-10 e apresentaram melhora no volume sistólico final, como mostrado pela figura 11. Além disso, os animais tratados com Dox também tiveram uma melhora na massa relativa do VE.

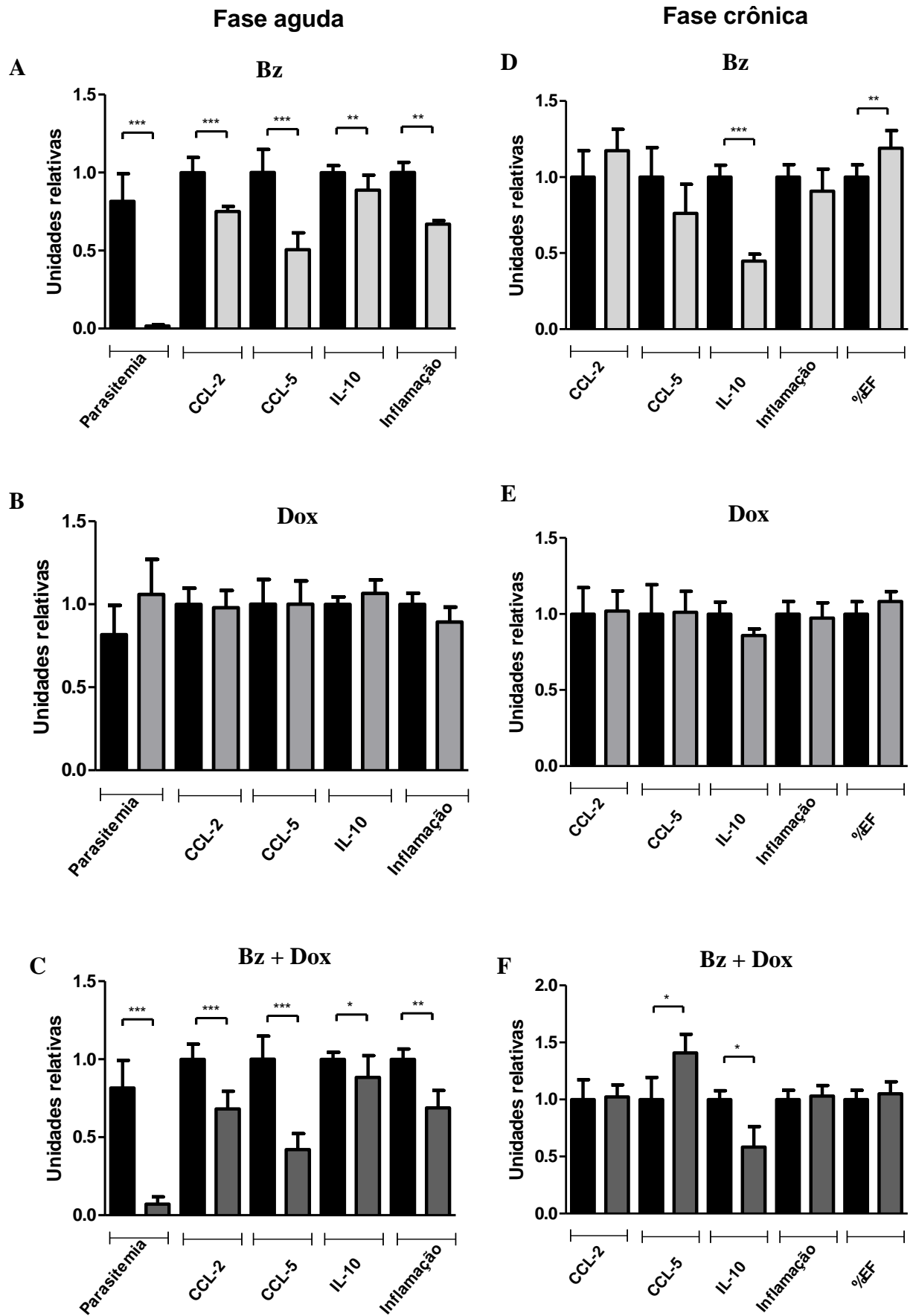


Figura 11: Resultados experimentais comparativos da parasitemia, marcadores inflamatórios (CCL-2, CCL-5 e IL-10), inflamação e fração de ejeção (%EF) de camundongos C57B /6 infectados com a linhagem VL-10 de *T. cruzi*, tratados com doxiciclina (Dox) e/ou benznidazol (Bz) na fase aguda e crônica da infecção. Camundongos tratados com Bz na fase aguda (A); Camundongos tratados com Dox na fase aguda (B); Camundongos tratados com a combinação na fase aguda (C); Camundongos tratados com Bz na fase crônica (D); Camundongos tratados com Dox na fase crônica (E); e Camundongos tratados com a combinação na fase crônica (F). **Todos os grupos infectados que receberam tratamento foram comparados com os grupos infectados não-tratados.** Os dados estão representados como média + desvio padrão, (n = 6), onde (*) ($p \leq 0,05$), (** $p \leq 0,005$) e (***) ($p \leq 0,0005$) indica diferença significativa entre os grupos (teste *t-Student*, seguido pelo pós-teste *Bonferroni*).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A DC é considerada uma doença negligenciada, e é comumente encontrada na lista de doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. Apesar de as pesquisas se concentrarem na busca de novos fármacos para o tratamento da doença, sabe-se que atualmente somente dois fármacos são utilizados clinicamente, o nifurtimox e o Bz (COURA; DE CASTRO, 2002). Esses fármacos, foram desenvolvidos há quatro décadas e são considerados eficazes principalmente na fase aguda da doença. No entanto, apresentam efeitos colaterais adversos e baixa eficácia na fase crônica da doença.

Neste sentido, tem-se a necessidade da investigação de mais opções terapêuticas, não somente em monoterapia, mas também em associação com outros fármacos com o intuito de reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento na fase crônica da doença. Com esse intuito, o nosso estudo buscou investigar a ação da doxiciclina para o tratamento da DC, um fármaco da família das tetraciclina, conhecido pela sua ação bacteriostática, mas que tem sido alvo de pesquisa para algumas doenças causadas por protozoários como a malária e a tripanossomíase africana (BRIOLANT et. al., 2010; LANDER et. al., 2013).

Sabe-se, portanto, que a progressão da DC está intimamente relacionada com a replicação do parasito na corrente sanguínea durante a fase aguda e que o Bz, utilizado como fármaco de escolha para o tratamento da DC no Brasil, é reconhecido principalmente por sua ação tripanocida. No entanto, para saber o quanto este fármaco foi eficaz na redução dos níveis de parasitemia, e a ação da Dox no controle da replicação do parasito, tanto monoterapia quanto em associação com o Bz, foi realizado uma curva de parasitemia.

De acordo com os nossos resultados, o tratamento específico com Bz e a combinação na fase inicial da infecção foram eficazes na redução dos níveis de parasitemia na infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos. Dessa forma, é possível sugerir que, como a carga parasitária está intimamente relacionada à resposta inflamatória, fármacos que reduzam a parasitemia possivelmente reduzirão o processo inflamatório sistêmico e/ou local (CALDAS et al., 2008).

Na fase crônica, diferentemente da fase aguda, a parasitemia é sub-patente, de maneira que o parasito não é encontrado facilmente na corrente sanguínea. Por essa razão, são

necessários métodos parasitológicos indiretos para a detecção do mesmo, dentre eles, os métodos sorológicos para reconhecimento de anticorpos do parasito (COURA & CASTRO, 2002; LANA & MARTINS-FILHO, 2015).

Por sua vez, os camundongos que evoluíram para a fase crônica da infecção foram avaliados quanto à taxa de sobrevivência. De acordo com nossos resultados, para a cepa VL-10, os camundongos infectados e tratados com a Dox em monoterapia e em combinação com Bz apresentaram menor taxa de sobrevivência, similar ao grupo infectado não-tratado. Já o grupo tratado com o Bz em monoterapia apresentou maior taxa de sobrevivência. Esse dado contradiz resultados de estudos que já demonstraram que a cepa VL-10 foi caracterizada como resistente ao tratamento com o Bz (BRENER, 1987).

Concomitantemente, a resposta inflamatória sistêmica ou local frente a infecção pelo *T. cruzi*, pode ocorrer uma resposta imune exacerbada na ausência de mecanismos de controle por parte do hospedeiro, no intuito de controlar a replicação do parasito e com isso ocasionar danos nos tecidos e a consequente morte do hospedeiro. Por outro lado, a ausência ou redução da resposta inflamatória pode conduzir a uma replicação excessiva do parasito. Logo, um equilíbrio entre estes fatores (parasito e hospedeiro) contribui para a perpetuação da doença no hospedeiro mamífero (TALVANI & TEIXEIRA, 2011).

Podemos citar a cardiopatia chagásica como um dos eventuais danos teciduais causados pela resposta imune exacerbada, observada em seres humanos. Em modelos experimentais a cardiopatia chagásica apresenta um perfil inflamatório dependente de uma série de citocinas e quimiocinas para a ativação e recrutamento das células imunes para o sítio de lesão (TALVANI et al., 2000).

No presente estudo experimental, levando em consideração as peculiaridades do modelo utilizado, avaliamos o perfil inflamatório pela análise da expressão da quimiocina CCL2 e CCL5 e da citocina IL-10, no plasma dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* durante a fase aguda e crônica da infecção. Diversos trabalhos já mostraram que tanto a expressão quanto a produção de marcadores inflamatórios estiveram aumentados na fase aguda e crônica da infecção (TALVANI et al., 2000; HARDISON et al., 2006; PENITENTE et al., 2015) e, ainda estavam relacionados com a virulência da cepa do *T. cruzi* (GUEDES et al., 2011.). Além disso, Talvani et al. (2004) demonstraram que a CCL2, assim como o TNF são marcadores não só da disfunção cardíaca, por induzirem inflamação no miocárdio do paciente chagásico. Em nosso estudo, mostramos que a monoterapia com Bz e a combinação

foram capazes de reduzir os níveis plasmáticos da quimiocina CCL2 e CCL5, na fase aguda da infecção, corroborando o estudo de Penitente & Leite *et al.*, (2015). No grupo tratado apenas com Dox, observamos um aumento nos níveis plasmáticos de quimiocinas em comparação ao grupo controle, mas não houve diferença em relação ao grupo infectado não-tratado.

Alguns autores sugerem, ao contrário de nossos resultados, que o tratamento com este fármaco levaria a um forte decréscimo na expansão clonal de células T, resultando em uma redução dos marcadores inflamatórios, principalmente citocinas e quimiocinas, produzidos por essa população celular, culminando em uma menor expressão de metaloproteinasas de matriz (MMPs) e marcadores inflamatórios (KROON & TAANMAN, 2015). Nesse sentido, a redução na expressão e produção de marcadores inflamatórios tem sido descrita para tratamentos com a Dox em modelos experimentais e humanos, como a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias na presença de baixas doses de Dox em queratinócitos humanos, CCL2 em células epiteliais pulmonares, produção de marcadores inflamatórios durante a fibrose cística de células epiteliais brônquicas e citocinas pró-inflamatórias em pacientes com tifo (CHUNG *et. al.*, 2008; BENSMAN *et. al.*, 2012; DI CAPRIO *et. al.*, 2015).

Ainda, se correlacionarmos a tripanossomíase americana com esquemas terapêuticos envolvendo a Dox, encontraremos trabalhos mostrando que o fármaco leva a um remodelamento da matrix extracelular, podendo dificultar a invasão do parasito nas células hospedeiras, além de estar relacionada, em modelo murino, com a sobrevivência de animais infectados pelo *T. cruzi* e redução da inflamação em tecido cardíaco (GUTIERREZ *et. al.*, 2008; CASTILLO *et. al.*, 2012).

Durante a fase crônica da infecção, alguns autores já demonstraram que o tratamento com o Bz induziu importante modulação do sistema imune, levando a uma redução na produção de marcadores inflamatórios e promovendo uma resposta reguladora (SATHLER-AVELAR *et. al.*, 2008). No entanto, nossos resultados foram controversos, já que o grupo tratado com a associação dos fármacos apresentou alta síntese de quimiocina CCL5. Para a quimiocina CCL2, não houve diferença entre os grupos analisados. Isso ocorreu possivelmente devido à diferença na cepa do parasita utilizado, uma vez que o processo inflamatório com a cepa VL-10 é menor em comparação com cepas mais virulentas,

consequentemente alterando a produção do mediador inflamatório (PENITENTE et. al., 2015).

Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, a monoterapia com Bz diminuiu seus níveis plasmáticos durante a fase aguda e crônica da infecção. Um fator relevante na atividade imunorreguladora dessa citocina contra a infecção por *T. cruzi* é a evidência de que o RNAm da IL-10 já é detectado 15 dias após a infecção, sugerindo sua participação desde os eventos iniciais da doença (GOLGHER & GAZZENELLI, 2004). Além disso, alguns autores sugeriram que a IL-10 tem um papel importante na infecção e controle da replicação do parasito no tecido cardíaco e outros tecidos durante a fase crônica da doença, regulando dessa forma, a resposta inflamatória do tipo Th-1 (GOMES et. al., 2003).

As quimiocinas CCL2 e CCL5 têm sido amplamente associadas ao recrutamento de leucócitos (monócitos e linfócitos) para focos inflamatórios que combatem a infecção pelo parasito, mas essa infiltração inevitavelmente resulta em danos aos tecidos do hospedeiro (TALVANI et. al., 2000, TEIXEIRA et. al., 2002, PAIVA et. al., 2009). Alguns estudos, mostraram que camundongos sem o receptor CCL5 são mais suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* devido à redução da migração celular nos tecidos infectados (MACHADO et al, 2005; HARDISON et al., 2006). O CCL2 em altas concentrações foi previamente descrito no soro de pacientes chagásicos e associado a diferentes níveis de disfunção cardíaca (TALVANI, et al, 2004a). Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que a IL-10 protege contra a miocardite aguda fatal em um modelo murino de infecção por *T. cruzi* (ROFFE et. al., 2012).

Na fase aguda da infecção, a resposta imunológica exacerbada é normalmente observada no miocárdio de indivíduos infectados, levando a danos associados que em casos extremos pode levar a uma resposta inflamatória sistêmica e até mesmo à morte (LARANJA, 1949; ROSSI, 1991; GUTIERREZ et al., 2009). Por outro lado, esta resposta inflamatória, considerada necessária para o controle do parasita, pode reduzir a infiltração inflamatória e eventualmente evitar danos teciduais (MELO et. al., 2011). De modo geral, o processo inflamatório tem sido sugerido como o fator mais importante na doença de Chagas aguda e crônica, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (LANNES-VIEIRA et al. 2009, TALVANI & TEIXEIRA, 2011). Independentemente do modelo experimental estudado, a resposta inflamatória desencadeada por infecção ou dano tecidual envolve a recrutamento coordenado de componentes do sangue para o local da infecção ou lesão (RODRIGUES et. al., 2010), no entanto, ao se discutir as alterações patológicas na infecção pelo *T. cruzi*, a

diferença entre os modelos experimentais utilizados (espécies diferentes dos hospedeiros) torna-se um relevante aspecto a ser considerado.

No presente estudo, o tratamento com o Bz e com a combinação com Dox na fase aguda foi capaz de reduzir a inflamação no tecido muscular cardíaco durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. No entanto na fase crônica, o processo inflamatório não foi evidenciado. Caldas *et al.*, (2008) mostraram que o tratamento específico na fase inicial da infecção é eficaz na redução dos níveis de parasitemia na infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos, mas o seu sucesso na prevenção de alterações cardíacas na fase crônica seria cepa-dependente. Adicionalmente, estudos anteriores mostraram que a cepa VL-10 induz elevada inflamação e destruição tecidual em camundongos *Swiss* e cães (CALDAS *et al.*, 2013; BAHIA *et al.*, 2012). Todavia, em nosso estudo, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa VL-10, pode-se observar que a produção de mediadores inflamatórios no plasma, bem como o infiltrado inflamatório não foram intensos durante a fase crônica da doença, como observados para os camundongos *Swiss*.

Por outro lado, o tratamento com a Dox na fase aguda da doença, não foi capaz de reduzir o processo inflamatório. A interferência da Dox nas cardiopatias, mesmo quando administrada em doses subantimicrobianas, está relacionada à sua ação inibitória sobre as metaloproteinases da matriz (MMPs), principalmente MMP-2 e 9, evitando a ocorrência de remodelamento não fisiológico e, conseqüentemente, prevenindo doenças como lesão por isquemia/reperfusão, disfunção contrátil e inflamação da artéria coronária (LAU *et al.*, 2009; CADETE *et al.*, 2012).

Sabe-se, ainda, que o processo inflamatório decorrente da resposta imune do hospedeiro contra o *T. cruzi* na fase aguda da infecção pode levar a alterações na funcionalidade do coração, e que não existe um fármaco eficaz na fase crônica da infecção capaz de reverter o quadro clínico do paciente sem causar danos colaterais. Porém, estudos demonstram, que o tratamento com o Bz em fase aguda, mesmo sem levar a cura, proporciona melhora no quadro clínico (GARCIA-ALVAREZ *et al.*, 2010). Fato é que a infecção pelo *T. cruzi* conduz a falhas na funcionalidade do coração, principalmente no ventrículo esquerdo (MARIN-NETO *et al.* 2007; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016) e nossos dados mostraram que a infecção, levou a um débito funcional neste órgão, mas que o tratamento com o Bz e/ou Dox promoveu a melhora de alguns parâmetros ventriculares cardíaco, como a fração de ejeção.

Estudos já apontaram que a determinação da diminuição da fração de ejeção do VE se tornou uma variável importante na determinação prognóstica dos pacientes chagásicos. Além disso, MIGLIORE et al (2004) demonstraram existir uma intensa associação entre piora da função diastólica e aumento das dimensões do átrio e ventrículo esquerdo e diminuição da fração de ejeção de VE. Em relação a esse parâmetro, nossos dados mostraram que a fração de ejeção diminuiu no grupo infectado não-tratado em relação ao grupo controle, e aumentou no grupo tratado com o Bz em relação ao grupo infectado não-tratado, entretanto os demais tratamentos não resultaram em diferença significativa em relação ao grupo infectado não-tratado, portanto houve uma melhoria nesse parâmetro apenas no grupo tratado com Bz.

Em relação ao tratamento com a Dox, publicações prévias mostraram que tratamento com este fármaco levava a uma melhora da função do ventrículo durante tromboembolismo pulmonar agudo e também melhora funcional cardíaca em terapia pós-infarto do miocárdio possivelmente por promover agregação de colágeno e aperfeiçoar as ações do peptídeo natriurético atrial (NETO-NEVES et. al., 2013; FANA et. al., 2014; ZHU et. al., 2015). Nesse sentido, nossos resultados foram contrários a literatura, uma vez que os animais que receberam tratamento com a Dox, diminuíram sua massa, mas não apresentaram melhora funcional cardíaca em outros parâmetros analisados. No entanto, estudos ecocardiográficos permitem a hipótese que a massa ventricular esquerda possa ser uma variável relevante no prognóstico de portadores de insuficiência cardíaca em pacientes cardiopatas (SIMÃO FILHO, 1998). O aumento da massa do VE é um fator de risco importante para o desenvolvimento da queda da fração de ejeção e conseqüentemente ao surgimento de insuficiência cardíaca (OH JK, 2006).

Outro parâmetro analisado utilizando as medidas ecocardiográficas foi a variação fracional da área. Para esse parâmetro analisado, o grupo infectado não-tratado foi menor comparado ao grupo controle. Podemos sugerir, neste caso, que esse resultado está diretamente relacionado com a massa do ventrículo esquerdo, uma vez que para o grupo infectado não-tratado sua massa aumentou em relação ao controle, e, portanto, sua elasticidade conseqüentemente diminuiu, levando a uma queda da fração de ejeção.

Em relação ao volume sistólico de ejeção, tanto o grupo infectado não-tratado quanto os grupos que receberam tratamento, tiveram o seu volume reduzido em relação ao controle. Apesar de esse parâmetro analisado não ter apresentado diferença dos grupos tratados em relação ao grupo infectado não-tratado individualmente, sua importância reside no fato de que

seu resultado é utilizado para o cálculo da fração de ejeção, juntamente com o volume diastólico final e portanto, independe desta diferença.

Ao analisar o volume diastólico final, observamos que houve uma diminuição significativa nos grupos tratados com Bz e no grupo tratado com a combinação dos fármacos, em comparação com o grupo infectado não-tratado e com o grupo controle, diferentemente do volume sistólico final, no qual essa diferença é observada apenas em comparação com o grupo infectado não-tratado. Esse resultado sugere que tanto no grupo tratado com o Bz quanto no grupo que recebeu o tratamento com a associação dos fármacos, o volume de sangue no ventrículo esquerdo ao fim da contração não alterou em relação ao controle, mas diminuiu em relação ao grupo infectado não-tratado, confirmando uma disfunção cardíaca no grupo infectado não-tratado e uma melhora funcional cardíaca nos grupos que receberam os tratamentos com o Bz em monoterapia e em combinação com a Dox.

Por outro lado, alguns autores sugerem que a diminuição no volume diastólico final (volume de sangue logo antes do início da contração do coração) pode ser o resultado de uma diminuição na complacência e relaxamento diastólico ventricular diminuído na cardiopatia hipertrófica chagásica, conseqüentemente, o volume de ejeção ventricular pode ser gravemente reduzido (VASAN,1999). É importante acrescentar que, ao contrário de estudos anteriores que sugerem ser a disfunção diastólica mais precoce do que a disfunção sistólica na doença de Chagas, o estudo com Doppler tecidual tem demonstrado que a disfunção sistólica também se apresenta precocemente na cardiopatia chagásica e que, provavelmente, os métodos para análise da função sistólica nestes estudos não eram sensíveis o bastante para a detecção de anormalidades contráteis menos pronunciadas (BARROS et al, 2001).

Enfim, diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar a cardiomiopatia na doença de Chagas, suas conseqüências fisiológicas e funcionais que alteram o quadro clínico do paciente na fase crônica da doença. Bem como, tem sido investigado fármacos que atuem indiretamente e diretamente sobre a resposta imune do hospedeiro, eliminando o parasito durante a fase aguda e dessa forma, minimizando os danos teciduais observados durante a cardiomiopatia chagásica. Sabemos que o Bz é o fármaco mais utilizado disponível para o tratamento da DC, no entanto, seu efeito na fase crônica da doença é ainda controverso, pois quando não ocorre a eliminação de toda a carga parasitária ainda na fase aguda da doença, o paciente pode evoluir para a fase crônica. Segura *et al.* (1994), não observaram diminuição significativa na miocardite em camundongos tratados com Bz durante a fase crônica da

infecção, enquanto no trabalho de Andrade *et al.* (1989), quando a cura parasitológica foi alcançada, os camundongos tratados com Bz tiveram uma diminuição da incidência de miocardite.

Nossos dados mostraram que o tratamento com o Bz, e com a combinação com Dox causou uma diminuição na carga parasitária, em alguns marcadores inflamatórios (CCL-2, CCL-5 e IL-10), na inflamação, durante a fase aguda da infecção, bem como em alguns parâmetros cardíacos durante a fase crônica. Neste sentido, podemos sugerir que o Bz administrado em monoterapia ou em associação com a Dox é capaz de atuar minimizando os danos cardíacos, característica da DC. Ao passo que a Dox, em monoterapia precisa ser melhor investigada, principalmente na fase crônica da infecção.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A monoterapia com Bz e, parcialmente a terapia em combinação com Dox, quando administrada na fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, mostrou-se promissora na redução da parasitemia, marcadores inflamatórios plasmáticos, inflamação no tecido muscular cardíaco durante a fase aguda do presente modelo de infecção pelo *T.cruzi*, cepa VL-10, em camundongos C57BL/6, bem como melhora na alguns parâmetros ecocardiográficos, como fração de ejeção e volume sistólico, durante a fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

8. Referências

7. REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1961–1967, 1996.
- AMERICA, L. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 6, p. 33–44, 2015.
- ANAVEKAR N.S., SKALI H., BOURGOUN M., GHALI J.K., KOBER L., MAGGIONI A.P., et al. Usefulness of right ventricular fractional area change to predict death, heart failure, and stroke following myocardial infarction (from the VALIANT ECHO study). **Am J Cardiol**;101:607-12, 2008.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES A. L. Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benzonidazole and nifurtimox. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.22, p.113–118,1989.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Opinion: The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 9 out. 2005.
- ANDRADE, Z. A. A Patologia Da Doença De Chagas No Homem. **Ass. Soc. Belge Méd. Trop.**, 1985.
- ARAU, F. F. DE; SATHLER-AVELAR, R.; OTA M.; ANTAS, R.Z.; ASSIS, J.; GOMES, S. et al. Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas ' Disease. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5, n. 5, p. 1–8, 2011.
- BAHIA, M. T.; DE ANDRADE, I. M.; MARTINS, T. A.; DO NASCIMENTO, Á. F.; et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 6, 1870. 2012.
- BARROS MV, ROCHA MO, RIBEIRO AL, MACHADO FS. Doppler tissue imaging to evaluate early myocardium damage in patients with undetermined form of Chagas' disease and normal echocardiogram. **Echocardiography** 18(2): 131-136; 2001.
- BENVENUTI, L. A.; BELLOTTI, G.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; HIGUCHI, M. L.; PILEGGI, F.; REIS, M. M. Association of an Increase in CD8+ T Cells with the Presence of *Trypanosoma cruzi* Antigens in Chronic, Human, Chagasic Myocarditis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 485–489, 1997.
- BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 30 jun. 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.
- BENSMAN T.J., NGUYEN A.N., RAO A.P., BERINGER P.M. Doxycycline exhibits anti-inflammatory activity in CF bronchial epithelial cells. **Pulm Pharmacol Ther.** v.25, p.377-82, 2012.
- BESTETTI RB, MUCCILLO G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol.** 60(2): 187-193,1997.

- BRAZÃO, V.; FILIPIN, M. D. V.; CAETANO, L. C.; TOLDO, M. P. A.; CAETANO, L. N.; PRADO, J. C. Trypanosoma cruzi: The effects of zinc supplementation during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 549–554, abr. 2008.
- BRENER, Z. Immunity to Trypanosoma cruzi. **Advances in parasitology**, v. 18, p. 247–92, 1980.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–10, out. 1997.
- BRIOLANT, S.; ALMERAS, L.; BELGHAZI, M.; BOUCOMONT-CHAPEAUBLANC, E.; WURTZ, N.; FONTAINE, A.; GRANJEAUD, S.; FUSAÏ, T.; ROGIER, C.; Pradinescorresponding B. Plasmodium falciparum proteome changes in response to doxycycline treatment. **Malaria Journal**, v. 9, n. 141, 2010.
- BUSTAMANTE, J. M.; BIXBY, L. M.; TARLETON, R. L. NIH Public Access. v. 14, n. 5, p. 542–550, 2011.
- CADETE V.J., SAWICKA J., JASWAL J.S., LOPASCHUKG.D., SCHULZ R, SZCZESNA-CORDARY D, SAWICKI G. Ischemia/reperfusion-induced myosin light chain 1 phosphorylation increases its degradation by matrix metalloproteinase 2. **FEBS J.** v. 279, p. 2444-54, 2012.
- CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; DA MATTA GUEDES, P.M.; BAHIA, M.T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitol.Res.** v. 103, n. 2, p. 413-421, 2008.
- CALDAS, I. S.; GUEDES, P. M. M.; DOS SANTOS, F. M.; DINIZ, L. F.; et al. Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. **Trop Med Int Health.** v.18, p.75-84, 2013.
- CASTILLO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; DUASO, J.; GALANTI N.; JAÑA, F.; FERREIRA J.; CABRERA, G.; MAYA, J. D.; KEMMERLING U. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. **Placenta**, v. 33, p. 991-997, 2012.
- CASTRO, E. Chagas' disease: Lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 1, p. 16–23, 2009.
- CASTRO, M. M.; KANDASAMY, A. D.; YOUSSEF, N.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 6, p. 551–560, dez. 2011.
- CHAGAS, C. **Nova Tripanozomíase humana.pdf.** , [s.d.].
- CHEUNG, P.Y.; SAWICKI, G.; WOZNIAK, M.; WANG, W.; RADOMSKI, M. W.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. **Circulation.** v. 101, n. 15, p. 1833-9, 2000.
- CHUNG D.R., LEE Y.S, LEE S.S. Kinetics of inflammatory cytokines in patients with scrub typhus receiving doxycycline treatment. **J Infect.** v.56, p.44-50, 2008.
- COURA, J. R. Morbidade da Doença de Chagas.pdf. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1983.

- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.
- CUTRULLIS, R.; MOSCATELLI, G. F.; MORONI, S.; VOLTA, B. J.; CARDONI, R. L.; ALTSCHEH, J. M.; CORRAL, R. S.; FREILIJ, H. L.; PETRAY, P. B. Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in trypanosoma cruzi-infected children. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 2–6, 2011.
- DALIRY, A.; CALDAS, I. S.; DE FIGUEIREDO DINIZ, L.; TORRES, R. M.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazole. **International Journal of Cardiology**, v. 170, n. 3, p. e66–e67, 2014.
- DE ALMEIDA, E. A.; RAMOS, A. N.; CORREIA, D.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Rede Brasileira de Atenção e Estudos na Co-infecção Trypanosoma cruzi/HIV e em outras condições de imunossupressão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 605–608, 2009.
- DE ALMEIDA, E. A.; RAMOS JÚNIOR, A. N.; CORREIA, D.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980 - 2010). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 762–770, 2011.
- DE PAULA COSTA, G.; SILVA, R. R.; PEDROSA, M. C.; PINHO, V.; DE 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**, v. 32, n. 3, p. 202–208, 1 mar. 2010.
- DE PAULA COSTA, G.; LOPES, L. R.; DA SILVA, M. C.; HORTA, A. L.; PONTES, W. M.; MILANEZI, C. M.; GUEDES, P. M. M.; DE LIMA, W. G.; SCHULZ, R.; DA SILVA, J. S. TALVANI, A. Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic Trypanosoma cruzi-Infected Dogs. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.
- DE OLIVEIRA, L.F.; ROMANO, M.M.; DE CARVALHO, E.E.; MEJIA CABEZA, J.; SALGADO, H.C.; FAZAN JÚNIOR, R.; COSTA, R.S.; DA SILVA, J.S.; HIGUCHI M. L.; MACIEL, B.C.; CUNHA-NETO, E.; MARIN-NETO, J.A.; SIMÕES, M.V. Histopathological Correlates of Global and Segmental Left Ventricular Systolic Dysfunction in Experimental Chronic Chagas Cardiomyopathy. **J Am Heart Assoc.** v.5(1), p.2786, 2016.
- DESFORGES, J. F.; KIRCHHOFF, L. V. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) -- A Tropical Disease Now in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 9, p. 639–644, 26 ago. 1993.
- DI CAPRIO R., LEMBO S., DI COSTANZO L., BALATO A., MONFRECOLA, G. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. **Mediators Inflamm.** v.2015, p.329-418, 2015.
- DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 147–156, 1989.
- DIAS, J. C. P. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S43–S59, 2000.
- DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; GAZZINELLI, G. Cytokine mRNA Profile of Peripheral

Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection z y. p. 74–80, 1997.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 12, p. 581–7, 1 dez. 2005.

FACTOR, S. M.; SONNENBLICK, E. H. The pathogenesis of clinical and experimental congestive cardiomyopathies: recent concepts. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 27, n. 6, p. 395–420, [s.d.].

FANA, X.Z.; ZHU, H.J.; WU, X.; YAN, J.; XU, J.; WANG, D.G. Effects of doxycycline on cx43 distribution and cardiac arrhythmia susceptibility of rats after myocardial infarction. **Iran J Pharm Res. Spring**. v.13(2), p.613-21, 2014.

FERNANDEZ-MESTRE MT, MONTAGNANI S, LAYRISSE Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? **Hum Immunol**, v. 65, p. 725-728, 2004.

FRASCH, A. C. C.; REYES, M. B. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. **Parasitology Today**, v. 6, n. 4, p. 137–139, abr. 1990.

GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F. V.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; ANTONIO, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P.; RODRIGUES, M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas ' Disease Decreases Cardiac Alterations Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas ' Disease Decreases Cardiac Alterations. v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

GARCIA-ALVAREZ, A.; SITGES, M.; PINAZO, M.J.; REGUEIRO-CUEVA, A.; POSADA, E.; POYATOS, S.; ORTIZ-PÉREZ, J.T.; HERAS, M.; AZQUETA, M.; GASCON, J.; SANZ, G. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 4(9), p. 826, 2010.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L. SHER, A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1 out. 1992.

GOMES J.A.; BAHIA-OLIVEIRA L.M.; ROCHA M.O.; MARTINS FILHO O.A.; GAZZINELLI G.; CORREA OLIVEIRA R. evidence that development of severe cardiomyopathy in human chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, 71 (3):1185-93, 2003,

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and Acquired Immunity in the Pathogenesis of Chagas Disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399–409, 7 ago. 2004.

GRIFFIN, M. O.; FRICOVSKY, E.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 299, n. 3, p. C539-48, set. 2010.

GUEDES, P. M.; SILVA, G. K.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 9(5):609-20. 2011.

- GUTIERREZ, F. R. S.; LALU, M. M.; MARIANO, F. S.; MILANEZI, C. M.; CENA, J.; GERLACH, R. F.; SANTOS, J. E. T.; TORRES-DUEÑAS, D.; CUNHA, F. Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J. S. Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 10, p. 1468–1476, 2008.
- GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**. v.31, p.673-685, 2009.
- HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R.; CARPENTER, P. M.; KUZIEL, W.; LANE, T. E.; MANNING, J. E. The CC Chemokine Receptor 5 Is Important in Control of Parasite Replication and Acute Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Society**, v. 74, n. 1, p. 135–143, 2006.
- H S RASSR, R.; RASSI, A.; L, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clin. Cardiol**, v. 23, p. 883–889, 2000.
- JOKS, R.; DURKIN, H. G. Non-antibiotic properties of tetracyclines as anti-allergy and asthma drugs. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 6, p. 602–609, dez. 2011.
- KROON A.M., TAANMAN J.W. Clonal expansion of T cells in abdominal aortic aneurysm: a role for doxycycline as drug of choice? **Int J Mol Sci**. v. 16, p.11178-95, 2015.
- LANA, M. D.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts and polemics or time to change old concepts. **BioMed Research International**.v.10.1155/2015/652985, 2015.
- LANNES-VIEIRA J., SILVERIO J.C., PEREIRA I.R., VINAGRE N.F., CARVALHO C.M.E., PAIVA C.N., SILVA A.A. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokines receptors - how to make a dream come true. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104 (Suppl. I), p. 226-235, 2009.
- LARANJA, F. S. Evolução dos conhecimentos sobre a cardiopatia da doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.v. 47, p. 605-669, 1949.
- LAU A.C.; DUONG T.T.; ITO S.; WILSON G.J.; YEUNG R.S. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity improves coronary outcome in an animal model of Kawasaki disease. **Clin Exp Immunol**, v. 157(2):300-9, 2009
- LEE A.A., MCCULLOCH A.D. Multiaxial myocardial mechanics and extracellular matrix remodeling mechanochemical regulation of cardiac fibroblast function. **Adv Exp Med Biol**, v. 430, p. 227-40, 1997.
- LEÓN, H.; BACZKÓ, I.; SAWICKI, G.; LIGHT, P.E.; SCHULZ, R. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents peroxynitrite-induced contractile dysfunction in the isolated cardiac myocyte. **Br J Pharmacol**. v. 153, n. 4, p. 676-83, 2008.
- LI, R.; LUO, X.; PAN, Q.; ZINEH, I.; ARCHER, D. F.; WILLIAMS, R.S.; CHEGINI, N. Doxycycline alters the expression of inflammatory and immune-related cytokines and chemokines in human endometrial cells: implication in irregular uterine bleeding*. **Human Reproduction**, v. 21, n. 10, p. 2555–2563, out. 2006.
- LONGO, P. W. Considerações a propósito de cinco casos de motora. 1989.

- MACHADO FS, KOYAMA NS, CARREGARO V, FERREIRA BR, MILANEZI CM, TEIXEIRA MM, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**. v.191(4), p. 627-36, 2005.
- MARIN-NETO, J. A.; Rassi, A.; Morillo, C. A.; Avezum, A.; Connolly, S. J.; Sosa-Estani, S.; ROSAS, F.; YUSUF, S. BENEFIT Investigators Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American heart journal**, v. 156, n. 1, p. 37–43, 1 jul. 2008.
- MARIN-NETO J.A., CUNHA-NETO E., MACIEL B.C., SIMÕES M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease: **Circulation**. v.115, p. 1109-1123, 2007.
- MELO, L.; CALDAS, I. S.; AZEVEDO, M. A.; GONÇALVES, K. R.; DA SILVA DO NASCIMENTO, A.; FERNANDO; 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 325–331, 2011.
- MIGLIORE RA, ADANIYA ME, TAMAGUSUKU H, LAPUENTE A. Assessment of diastolic function in Chagas' disease with pulsed doppler tissue imaging. **Arch Cardiol Mex**; 74(1): 31-38, 2004.
- MIYAZAKI, Y.; HAMANO, S.; WANG, S.; SHIMANOE, Y.; IWAKURA, Y.; YOSHIDA, H. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1150–1157, 2010.
- MONCAYO, A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 401–404, 1999.
- MORILLO, C.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S. J.; YUSUF, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.
- MORRIS, S.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; BILEZIKIAN, J. P. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. **Circulation**, v. 82, n. 6, p. 1900–9, 1990.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 2, p. 301–307, fev. 1992.
- NAGAJYOTHI, F.; MACHADO, F. S.; BURLEIGH, B.; JELICKS, L.; SCHERER, E.; MUKHERJEE, S.; LISANTI, M. P.; WEISS, L. M; GARG, N. J. TANOWITZ, H. B. Disease. v. 14, n. 5, p. 634–643, 2013.
- NATTAN-LARRIER L. Infections a` Trypanosomes et voies de penetrations des virus. Bull de la **Soc de Pathol Ex**. v.14, p.537–42, 1921.
- NETO-NEVES, E.M.; SOUSA-SANTOS, O.; FERRAZ, K.C.; RIZZI, E.; CERON, C.S.; ROMANO, M.M.; GALI, L.G.; MACIEL, B.C.; SCHULZ, R.; GERLACH,

- R.F.; TANUS-SANTOS, J.E. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates right ventricular dysfunction and improves responses to dobutamine during acute pulmonary thromboembolism. **J Cell Mol Med.** v.17(12), p.1588-97, 2013.
- OH JK, SEWARD, JB, TAJIK, A.J. The Echo Manual. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**; p. 110-9, 2006.
- PAIVA C.N., 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.** v.86, p. 1239-1246, 2009.
- PENITENTE, A. R.; LEITE, A. L. J.; DE PAULA COSTA, G.; SHRESTHA, D.; HORTA, A. L.; NATALI, A. J. NEVES, C. A.; TALVANI, A. Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. v. 93, n. 5, p. 976–982, 2015.
- PERDIGÃO OLIVIERI, B.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAÚJO-JORGE, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3790–3796, 2002.
- PÉREZ-FUENTES, R.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; ORDÓÑEZ-TOQUERO, G.; GOMEZ-ALBINO, I.; RAMOS, J.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSAS, H.; ROMERO-DÍAZ, M.; PULIDO-PÉREZ, P.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, M. C. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 101, n. 2, p. 123–132, 18 mar. 2007.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; PEREZ, A. M.; NORMAN, F. F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1347–1356, nov. 2015.
- PETKOVA, S. B.; HUANG, H.; FACTOR, S.M.; PESTELL, R.G.; BOUZAHZAH, B.; JELICKS, L.A.; WEISS, L.M.; DOUGLAS, S.A.; WITTNER, M. Tanowitz, H.B. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 499–511, maio 2001.
- PETRUS, L. C.; OLIVEIRA, VALÉRIA M.C.; PEREIRA, G. G.; LARSSON, M. H. M. A. Avaliação dos fluxos das valvas aórtica e pulmonar com ecocardiografia Doppler pulsátil em cães clinicamente saudáveis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.7, p. 586-592, julho 2010.
- PIAGGIO, E.; SANCEAU, J.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E. Trypanocidal Drug Benznidazole Impairs Lipopolysaccharide Induction of Macrophage Nitric Oxide Synthase Gene Transcription Through Inhibition of NF- κ B Activation. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3422–3426, 2001.
- POTENTIALLY, A. et al. NIH Public Access. v. 23, n. 1, p. 18–28, 2012.
- PRATA, A.; NAKAO, F.; ARDENGH, J.C.; PILLEGGI, F. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 1 set. 2001.
- RAMASAWMY R, CUNHA-NETO E, FAE KC, MARTELLO FG, MÜLLER NG, CAVALCANTI VL, IANNI B, MADY C, KALIL J, GOLDBERG AC. The monocyte

- chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 43, p. 305-311, 2006.
- REIS, M. M.; HIGUCHI, M. D. L. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1996, p. 509–518, 2000.
- RODRIGUES C. M., VALADARES H.M.S., FRANCISCO A.F., ARANTES J.M., CAMPOS, C.F., TEIXEIRA-CARVALHO A., et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. 5–10, 2010.
- ROFFE, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P. M. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, 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. J Immunol. January**, v. 15, n. 1882, 2012.
- ROSSI, M. A. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic chagasic cardiopathy. **Can J Cardiol**. V.7, p. 287-94, 1991.
- SANTOS L.; EDUARDO C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M. H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 457–465, 1997.
- SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L.; BORGES, J. D.; LANA, M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DIAS, J. C P; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 5, p. 554–563, 2006.
- SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; MASSARA, R.L.; DE LANA, M.; PINTO DIAS, J.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes Infect**. v.10(2), p.103-13, 2008.
- SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to Nifurtimox and Benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.101, p. 888-894, 2011.
- SEGURA, M. A.; DE RASPI, E.M.; BASOMBRI, M.A. 1994. Reversibility of muscle and heart lesion in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 89, p.213–216, 1994.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. & CARVALHO, N. B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**. v.54, p.845-52, 2012.
- 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 513–521, 2012.

- SIMÃO FILHO C. Remodelamento ventricular esquerdo em cardiomiopatias de diferentes etiologias na sua forma dilatada. Estudo morfológico comparativo em peças anatómicas. **Tese (Doutorado)**. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
- SMILACK, JERRY D.; PLAZZA-HEPP, T.D.; GLRARDI, L.S.; MOLEDLNA, N.R.; JANSEN, P.L. MARIE, J. VAN. The Tetracyclines. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 7, p. 727–729, 1 jul. 1999.
- SVS Brasil - **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Aspectos epidemiológicos-Casos de Doença de Chagas aguda, 2000–2010. Brasil, Fonte: SVS/MS, dados até 2011. Available at:http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt531454, 2011.
- TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. **Advances in Parasitology**, v. 76, p.171-194, 2011.
- TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAJLOWSKY, V; et al. 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 and Infection**, v. 2, p.851-866, 2000.
- TALVANI A, ROCHA MO, BARCELOS LS, GOMES YM, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clin Infect Dis**, v.38, p.943-50, 2004a.
- TALVANI A, ROCHA MO, RIBEIRO AL, CORREA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J Infect Dis**. v.189, p. 214-220, 2004b.
- TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 11, n. 1, p. 7–9, jan. 1995.
- TEIXEIRA M.M., GAZZINELLI R.T., SILVA J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 262-265, 2002.
- THIHAULT G., LACOMBE M.J, SCHNAPP L.M,LAÇASSE A., BOUZEGHRANE F., LAPALME G. Upregulation of alpha(8)beta(1) integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growili factor beta 1. **Am I Physiol**, v. 281, n. 5, p. 1457-67, 2001.
- TOSTES JÚNIOR, S.; LOPES, E. R.; PEREIRA, F. E.; CHAPADEIRO, E. Miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos CD4+ e dos CD8+ no exsudato inflamatório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 3, p. 127–134, 1994.
- TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 4, p. 505–11, abr. 1996.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, jul. 2010.
- URBINA, J. A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149–156, 1 jan. 2015.
- VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, S. MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENA, S. D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas

disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805–9, 2000.

VASAN RS, LARSON MG, BENJAMIN EJ, EVANS JC, REISS C, LEVY D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. **J Am Coll Cardiol**; 33: 1948-55,1999.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 724, 16 maio 2006.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected “evidence” by evidence-based medicine. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 4, p. 717–726, 10 ago. 2007.

WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). **WHO**, 2017.

ZOGHBI WA, QUINONES MA. Determination of cardiac output by Doppler echocardiography: a critical appraisal. **Herz**;11: 258,1986.

ZORNOFF, L. A. M.; SKALI, H.; PFEFFER, M. A.; ST. JOHN SUTTON, M.; ROULEAU, J. L.; LAMAS, G. A.; PLAPPERT, T.; ROULEAU, J. R.; MOYÉ, L. A.; LEWIS, S. J.; BRAUNWALD, E. SOLOMON, SCOTT D. RIGHT ventricular dysfunction and risk of heart failure and mortality after myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 9, p. 1450–1455, 2002.

ZHU, H.; SUN, X.; WANG, D.; HU, N.; ZHANG, Y. Doxycycline ameliorates aggregation of collagen and atrial natriuretic peptide in murine post-infarction heart. **Eur J Pharmacol**. v. 5, p.754:66-72, 2015.

9. ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Protocolo CEUA aprovado (2016/63)



MINISTÉRIO D A EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propo.ufop.br



OFÍCIO CEUA N°. 110/2017, de 22 de agosto de 2017

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) André Talvani Pedrosa da Silva
DECBI/UFOP

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo n°. 2016/63, intitulado "*Avaliação da terapia de combinação entre Doxiciclina e Benznidazol durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi.*".

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA n° 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1388 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2016/63, intitulado "Avaliação da terapia de combinação entre Doxiciclina e Benznidazol durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). André Talvani Pedrosa da Silva foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Camundongos C57BL/6	112	30 dias	Macho	CCA UFOP

Restrição de dieta: () sim (x) não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 30/11/2019

Ouro Preto, 22 de agosto de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

9.2. Artigo submetido para publicação:

Journal: International Journal of Cardiology

Manuscript Details

Manuscript number	IJC_2019_623
Title	Benznidazole reduces inflammation while doxycycline improves cardiac function in mice infected with the VL-10 strain of the <i>Trypanosoma cruzi</i>
Article type	Original article

Abstract

Background. Chagas heart disease is the most important clinical manifestation of *Trypanosoma cruzi* infection. Pharmacological therapies have been proposed aiming to reduce inflammatory response and cardiac damage in infected hosts. In this study, we investigated the role of doxycycline (Dox), in a sub-antimicrobial dose, in monotherapy and in combination with benznidazole (Bz), during the acute and chronic phases of infection with the VL-10 strain of *T. cruzi*. Methods and results. C57BL/6 mice were treated for 20 days with Dox (30 mg/kg), Bz (100 mg/kg), or both drugs in combination starting 9 days after infection. Parasitemia was measured during the acute phase and the animals were monitored for 12 months, after which echocardiography analysis was performed. Blood samples were obtained from euthanized mice for CCL2, CCL5, IL-10 analysis, and cardiac fragments were collected for histopathological evaluation. Dox treatment did not ameliorate parasitological and inflammatory parameters in the animals. In contrast, Bz administration reduced parasitemia, plasma levels of CCL2 and CCL5, and cardiac infiltration during acute infection, and reduced the level of IL-10 at 12 months. Dox was able to improve the ejection fraction and reduce the left ventricle mass in the chronic phase, while Bz treatment ameliorated the ejection fraction, but negatively affected left ventricle volume. No marked data was observed in combination therapy. Conclusion. Dox did not affect the immune parameters studied, but did ameliorate cardiac functionality, while Bz modulated immune parameters and was partially effective in improving cardiac parameters

Keywords	<i>Trypanosoma cruzi</i> ; VL-10 strain; inflammation; benznidazole; doxycycline; echocardiography
Taxonomy	Biomarkers, Heart Failure, Basic Science
Manuscript category	Original clinical research studies, basic science/translational research papers
Manuscript region of origin	South America
Corresponding Author	Andre Talvani
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal de Ouro Preto
Order of Authors	Ana Claudia Alvarenga, Guilherme De Paula Costa, Cyntia Silva Ferreira, Isalira Peroba Rezende Ramos, Mariáurea Sarandy, Ana Paula Menezes, Breno de Mello Silva, katiane nogueira, Antonio Campos De Carvalho, Andre Talvani, Reggiani Gonçalves

Abstract

Background. Chagas heart disease is the most important clinical manifestation of *Trypanosoma cruzi* infection. Pharmacological therapies have been proposed aiming to reduce inflammatory response and cardiac damage in infected hosts. In this study, we investigated the role of doxycycline (Dox), in a sub-antimicrobial dose, in monotherapy and in combination with benznidazole (Bz), during the acute and chronic phases of infection with the VL-10 strain of *T. cruzi*. *Methods and results.* C57BL/6 mice were treated for 20 days with Dox (30 mg/kg), Bz (100 mg/kg), or both drugs in combination starting 9 days after infection. Parasitemia was measured during the acute phase and the animals were monitored for 12 months, after which echocardiography analysis was performed. Blood samples were obtained from euthanized mice for CCL2, CCL5, IL-10 analysis, and cardiac fragments were collected for histopathological evaluation. Dox treatment did not ameliorate parasitological and inflammatory parameters in the animals. In contrast, Bz administration reduced parasitemia, plasma levels of CCL2 and CCL5, and cardiac infiltration during acute infection, and reduced the level of IL-10 at 12 months. Dox was able to improve the ejection fraction and reduce the left ventricle mass in the chronic phase, while Bz treatment ameliorated the ejection fraction, but negatively affected left ventricle volume. No marked data was observed in combination therapy. *Conclusion.* Dox did not affect the immune parameters studied, but did ameliorate cardiac functionality, while Bz modulated immune parameters and was partially effective in improving cardiac parameters.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*; VL-10 strain; inflammation; benznidazole; doxycycline; echocardiography.

Benznidazole reduces inflammation while doxycycline improves cardiac function in mice infected with the VL-10 strain of the *Trypanosoma cruzi*.

Ana Cláudia Alvarenga Carneiro¹, Guilherme de Paula Costa¹, Cyntia Silva Ferreira², Isalira Peroba Rezende Ramos⁵, Mariáurea Matias Sarandy⁴, Ana Paula de Jesus Menezes¹, Breno de Mello Silva², Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira³, Antônio Carlos Campos de Carvalho⁵, Reggiani Vilela Gonçalves⁴, André Talvani^{1,*}.

¹Laboratório de Immunobiologia da Inflamação, ²Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microorganismos, ³Laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental, Departamento Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. ⁴Laboratório de Patologia Experimental, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa Minas Gerais, Brasil. ⁵Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

***Corresponding author:**

André Talvani
Laboratory of Immunobiology of Inflammation
DECBI/ICEB, Campus Morro do Cruzeiro
Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil,
Phone # 55 31 3559-1767 talvani@ufop.edu.br