UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação - LABIIN

Interferência da terapia com o betabloqueador Carvedilol na resposta inflamatória cardíaca aguda em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

Aline Luciano Horta

Ouro Preto

2017

ALINE LUCIANO HORTA

Interferência da terapia com o betabloqueador Carvedilol na resposta inflamatória cardíaca aguda em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani

OURO PRETO

2017

H821i Horta, Aline Luciano.
Interferência da terapia com o betabloqueador Carvedilol na resposta inflamatória cardíaca aguda em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do Trypanosoma cruzi [manuscrito] / Aline Luciano Horta. - 2017.
76f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani.

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

1. Trypanosoma cruzi. 2. Carvedilol. 3. Betabloqueador. 4. Doença de Chagas. 5. Inflamação. I. Talvani, André. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.27:561.24

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

UFOP

nupeb

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

" Interferência da terapia com o betabloqueador Carvedilol na resposta inflamatória cardíaca aguda em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*".

Aos dez dias do mês de março de 2017, às 09 horas e 30 minutos, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Aline Luciano Horta**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....aprovar..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Examinadora (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado Examinadora(UFOP)

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

DATA DA DEFESA: **10/03/2017**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - Bloco J - Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1691
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

Dedicatória

Aos meus pais Maria de Lourdes e Hudson pelo amor, confiança e incentivo de sempre.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre me guiando e iluminando e pela benção de mais uma vitória!

Manifesto profundo agradecimento aos meus pais Lourdinha e Hudson, pelo amor, apoio e confiança depositada. Por acreditarem em mim, e incentivarem os meus sonhos. Não tenho palavras para expressar minha imensa gratidão. Pai, você é pessoa com o coração mais precioso que já conheci. E agradeço especialmente à minha mãe, mulher batalhadora, alma gêmea, de coragem inigualável que não mediu esforços para me proporcionar as melhores oportunidades na vida. Amo vocês.

Agradeço o meu paidrasto Humberto, e à minha mãedrasta Ana (minha marmutinha), pelo amor, amizade e grande afinidade.

Ao meu irmão Andrezinho, meu caçula e pessoa preferida no mundo. E a toda minha família, em especial meus primos Glei e Gleia e a minha Vó Maria Lídia, segunda mãe.

Ao meu noivo Hygor, pelo amor, apoio e compreensão. Você é a melhor pessoa que eu conheço, obrigada por fazer parte da minha vida!

Agradeço o meu querido orientador, ‘’papi’’ André Talvani, um verdadeiro mestre. Que além de professor exemplar, é um querido amigo, de coração inigualável, sempre disposto a ajudar no que for possível para o nosso crescimento profissional e pessoal.
Para a realização desse trabalho, contei com a disponibilidade, apoio e colaboração de um grupo de pessoas sensacionais, que se tornaram minhas amigas. Portanto, agradeço a família LABIIN, pelos rocks, pelas brigas, pela pesquisa e por todo amor envolvido! Em especial, à Vivian e Guilherme pela co- orientação e amizade.

Aos amigos, que tornam a caminhada mais leve. Em especial, Camila, Nathane, Rafão, Naty, Pocinho, Nanda, Maca, Tassiane, Elô, Kuruko, Fake, Fabogusto e Isabela. E a todos os meus amigos do Auta de Souza, e do Novo Sol Brilhante. Muito Obrigada!

RESUMO

A resposta inflamatória gerada pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* promove alterações morfofisiológicas nas células cardíacas de hospedeiros mamíferos. Esta inflamação progressiva contribui para a geração de um quadro patológico de caráter fibrogênico culminando em possíveis alterações estruturais/ funcionais ao coração. Fármacos com propriedades cardiovasculares e prescritos no manejo clínico de indivíduos chagásicos têm sido investigados por suas ações imunomodulatórias. Nesta proposta, foram avaliadas as ações do betabloqueador Carvedilol (CV) e do benznidazol (BZ), em camundongos machos da linhagem C57BL/6, infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, e agrupados de acordo com as seguintes intervenções: (I) 15 animais infectados que não receberam tratamento (II) 15 animais tratados com 100mg/Kg/dia de BZ (III) 15 animais tratados com o CV 25mg/kg/dia (IV) 15 animais tratados com a combinação dos fármacos BZ 100mg/kg/dia e CV 25mg/kg/dia. Além disso, foram utilizados 10 animais como controle não infectado. A ação do betabloqueador (CV) 25 mg/kg e/ ou BZ 100 mg/kg, foi avaliada após 28 dias de infecção, e 23 dias de tratamento, período análogo à fase aguda. A eutanásia ocorreu no 28^0 dia, sendo o coração conservado para análise histopatológica, e avaliação de Estresse oxidativo (SOD, catalase, TBARs, proteínas carboniladas), e o sangue/plasma destinado aos ensaios imunoenzimáticos (CCL2, CCL5, TNF-alfa, IL-10), além de avaliar a parasitemia e sobrevida ao longo da infecção. Desta maneira, observou-se, que a terapia com o CV elevou a mortalidade dos animais, a parasitemia, assim como o nível das quimiocinas CCL2 e CCL5 no tecido muscular cardíaco, mas por outro lado reduziu os níveis de TNF. Em contrapartida, o CV não alterou o perfil da citocina regulatória IL-10. O tratamento em monoterapia com o CV promoveu, ainda, o aumento do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco mediante infecção pelo *T. cruzi*, em relação aos animais infectados não tratados. Conclui-se que o CV não foi capaz de oferecer proteção cardíaca ao hospedeiro mamífero durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* por elevar os mediadores inflamatórios e, consequentemente, o infiltrado inflamatório cardíaco. Outros estudos em diferentes modelos experimentais tornam-se necessários para compreender as ações pleiotrópica do CV em roedores, uma vez que em seres humanos este fármaco apresenta propriedade protetora cardíaca em indivíduos cardiopatas crônicos.

Palavras chave: *Trypanosma cruzi*, Carvedilol, inflamação, Colombiana, Benznidazol

ABSTRACT

The inflammatory response generated by *Trypanosoma cruzi* infection promotes morphophysiological changes in the cardiac cells of mammalian hosts. This progressive inflammation contributes to the generation of a pathological picture of fibrogenic character culminating in possible structural / functional changes to the heart. Drugs with cardiovascular properties and prescribed in the clinical management of chagasic individuals have been investigated for their immunomodulatory actions. In this proposal, the actions of the beta blocker Carvedilol (CV) and benznidazole (BZ) were evaluated in infected male C57BL / 6 mice with 50 trypomastigote forms of the Trypanosoma cruzi Colombian strain, and grouped according to the following interventions: (I) 15 infected animals not receiving treatment (II) 15 animals treated with 100 mg / kg / day BZ (III) 15 treated animals With CV 25mg / kg / day (IV) 15 animals treated with the combination of drugs BZ 100mg / kg / day and CV 25mg / kg / day. In addition, 10 animals were used as uninfected control. The action of beta-blocker (CV) 25 mg / kg and / or Benznidazole (BZ) 100 mg/ kg, was evaluated after 28 days of infection, and 23 days of treatment, a period analogous to the acute phase. Euthanasia occurred at 28th day, and the heart was preserved for histopathological analysis and oxidative Estresse evaluation (SOD, catalase, TBARs, carbonylated proteins), and blood / plasma for immunoenzymatic assays (CCL2, CCL5, TNF-alpha, IL -10), in addition to evaluating parasitemia and survival throughout the infection. In this way, we observed that CV therapy increased the mortality of the animals, parasitemia, as well as the level of chemokines CCL2 and CCL5 in cardiac muscle tissue, but on the other hand it reduced TNF levels. In contrast, CV did not alter the IL-10 regulatory cytokine profile. The monotherapy treatment with CV also promoted the increase of inflammatory infiltrate in cardiac muscle tissue. T. cruzi infection in relation to untreated infected animals. It is concluded that CV was unable to provide cardiac protection to the mammalian host during the acute phase of T. cruzi infection by elevating inflammatory mediators and, consequently, cardiac inflammatory infiltrate. Other studies in different experimental models become necessary to understand the pleiotropic actions of CV in rodents, since in humans this drug presents cardiac protective property in chronic cardiopathy individuals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do Carvedilol. Imagem retirada de: Pharmacology of Carvedilol (Dulin & Abraham, 2004) 28

Figura 2- Linha do tempo de tratamento 33

Figura 3. Curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* tratados ou não tratados com fármaco Carvedilol (CV), Benznidazol (BZ) e combinação de ambos os fármacos. 41

Figura 4. Curvas de mortalidade de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados ou não com Carvedilol (CV), Benznidazol (BZ), e combinação dos fármacos (BZ+CV) 42

Figura 5. Peso relativo do coração de animais C57BL/6 infectados/ não infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados ou não com Carvedilol (CV), Benznidazol (BZ), e combinação dos fármacos (BZ+CV). 43

Figura 6. Produção sérica de citocinas pró-inflamatória e regulatória (TNF, IL-10) Concentração das citocinas TNF (A), IL-10(B) no plasma de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho. 45

Figura 7. Produção sérica de quimiocinas inflamatórias CCL2 e CCL5. 46

Figura 8. Quantificação do processo inflamatório no tecido cardíaco de camundongos infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com CV e/ou Benznidazol em fase aguda. 48

Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do T.cruzi tratados ou não com CV e/ou BZ na fase aguda. 49

Figura 10. Marcadores de dano oxidativo. (A) Proteínas carboniladas (PC) e (B) Peroxidação lipídica (TBARS) em tecido cardíaco de camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6 infectados ou não com a cepa Colombiana do T. cruzi, submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ- Benznidazol

CAT- Catalase

CCC- Cardiopatia chagásica crônica

CV- Carvedilol

DTU- *Discrete Typing Unit*

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

ELISA- Ensaios imunoenzimáticos

ERONs- Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

g- Grama

HE- Hematoxilina & Eosina

IECA- Inibidores da enzima conversora de angiotensina

IFN- Interferon

IL- Interleucina

Kg- Quilograma

NFX- Nifurtimox

PBS- Tampão Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PBS-BSA- Tampão Fosfato Salino com Albumina de Soro Bovino

PBS-*Tween*- Tampão Fosfato Salino com *Tween*

PC- Proteínas carboniladas

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pg - Picograma

pH- Potencial hidrogeniônico

ROS- Espécies reativas de oxigênio

RNS- Espécies reativas de nitrogênio

SDS- Duodecil sulfato de sódio

SOD- Superóxido dismutase

TBARs- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TC- Terapia de Combinação

TNF- Fator de Necrose Tumoral

mg- Miligrama

µl- Microlitro

µm- Micrômetro

mM- Milimolar

mL- Mililitro

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO 14

1.1. O *Trypanosoma cruzi* 14

1.2. Patogenia da doença de Chagas 16

1.3. A resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* 18

1.4. Estresse oxidativo: 20

1.5. Estratégias terapêuticas *anti-Trypanosoma cruzi* 22

1.6. Os betabloqueadores adrenérgicos 24

1.7. O Carvedilol 27

2.0. OBJETIVO GERAL 30

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS 31

3.1. Animais e infecção pelo *T. cruzi* 31

3.2. Tratamento e eutanásia dos animais 31

3.3. Parasitemia 33

3.4. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) 33

3.5. Histologia 35

3.5.1. Processamento e cortes em micrótomo 35

3.5.2. Técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (HE) 35

3.5.3. Análise histopatológica 36

3.6. Estresse Oxidativo 36

3.6.1. Determinação de proteínas totais 37

3.6.2. Atividade da Superóxido dismutase- SOD 37

3.6.3. Atividade da Catalase 38

3.6.4. Proteínas Carboniladas 39

3.6.5. Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico- TBARS 39

3.7. Análise estatística dos dados 40

4.0. RESULTADOS 41

4.1. Análise da parasitemia **41**

4.2. Curvas de Mortalidade 42

4.3. Peso Relativo do Coração 43

4.4- Ensaios imunoenzimáticos 44

4.5. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco 47

4.6. Estresse Oxidativo 49

5.0. DISCUSSÃO **54**

6.0. CONCLUSÃO **61**

7.0. REFERÊNCIAS **62**

8.0. ANEXOS **75**

8.1. Artigo 1: Potential role of CV on the cardiac immune response induced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. 75

8.2. Artigo 2 : Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic *Trypanosoma cruzi*-Infected Dogs. 76

8.3. Artigo 3: Enalapril in combination with Benznidazole reduces heart inflammation and creatine kinases in mice chronically infected with the *Trypanosoma cruzi*. 77

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. O *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi descoberta no ano de 1909, pelo médico sanitarista Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, assistente do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), no Rio de Janeiro, pelo qual, foi designado na erradicação da malária entre os trabalhadores envolvidos na construção do prolongamento da estrada de ferro Central do Brasil, em regiões próximas à Lassance, no interior de Minas Gerais (Coura, 2013; Benzinger et al., 2015). A referida doença apresenta como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma* (*Schizotrypanum) cruzi*, naturalmente transmitido aos hospedeiros vertebrados por vetores da subfamília *Triatominae* (Chagas, 1909). Existem cerca de 140 espécies de triatomíneos descritas na américa latina, indicadas como vetores em potencial da doença de Chagas, sendo 52 identificadas no território brasileiro; dentre elas, a espécie *Triatoma infestans* recebe destaque por sua alta capacidade proliferativa, de infecção, e hábito doméstico (Corassa et al., 2016). Todavia, iniciativas intergovernamentais para o controle da transmissão, organizadas por países do Cone Sul, resultaram em melhorias nos serviços relacionados à saúde, condições sanitárias e desenvolvimento socioeconômico, além da erradicação em grandes áreas geográficas, desta principal espécie de triatomíneo (Dias, 2015; Corassa et al., 2016). Além da transmissão vetorial, existem outras rotas de transmissão ditas secundárias, mas não menos importantes e relevantes, como: oral, transfusão sanguínea transplante de órgãos, congênita e em menor proporção, os acidentes laboratoriais (Coura, 2010; Dias, 2016). Portanto, pelas mãos do Dr. Carlos Chagas, pela primeira vez na história da medicina moderna uma doença foi descrita por um único pesquisador, sendo este, também responsável pela identificação tanto do agente causador (*T. cruzi*), e

dos seus vetores invertebrados, como dos principais quadros clínicos da doença e, ainda, de seus possíveis reservatórios silvestres (Pérez-Molina et al., 2015).

Embora descrita por volta de 108 anos atrás, o DNA do *Trypanosoma cruzi* já foi isolado do tecido ósseo de múmias humanas no deserto do Atacama (Chile), demonstrando, assim, que a doença pode ter começado a afetar o homem há cerca de 9.000 anos atrás (Aufderheide, 2003; Dias, 2015). Desde então, este parasito tem desenvolvido estratégias evolutivas, de alta complexidade para escapar e subverter o sistema imune do hospedeiro mamífero (Cardoso et al., 2016). Dito isso, alguns casos humanos acidentais da doença poderiam ter ocorrido, como ainda o fazem hoje, quando humanos invadem o ecótopo selvagem ou quando vetores silvestres invadem ambientes domésticos (Coura, 2014).

Devido à distribuição deste parasito, e dos seus vetores ao longo da América do Sul e América Central, a moléstia também é conhecida por tripanossomíase americana (Carabarin-Lima *et al*., 2013). Contudo, processos migratórios visando melhorias na qualidade de vida contribuíram para a disseminação da doença para além dos seus limites geográficos; além das altas taxas de pacientes infectados encontrados em países da Europa (Conners, et al., 2016; Vallejo et al., 2016), Os Estados Unidos também apresenta estimativas alarmantes, pois, embora considerado país de primeiro mundo, possui cerca de 300,000 imigrantes infectados, sem triagem rigorosa dos bancos de sangue (Garcia et al., 2015). Da mesma forma, parte dos médicos não é familiarizada com a doença, além de possuir 11 espécies de triatomíneos espalhados na região sudoeste, passíveis de transmitir a doença em sua forma natural (Garcia et al., 2015; Montgomery et al., 2016).

Assim, mesmo com toda informação disponibilizada pela Organização Mundial da Saúde e suas afiliadas sobre a infecção pelo *T. cruzi* e a doença de Chagas, a moléstia

permanece negligenciada do ponto de vista epidemiológico e farmacológico (Stanaway & Roth, 2015), acometendo cerca de 8 a 10 milhões de pessoas no mundo todo, principalmente em países da América latina, com uma taxa de mortalidade anual de 10 mil indivíduos (WHO, 2015; Dias, 2015).

1.2. Patogenia da doença de Chagas

O curso clínico da doença de Chagas é frequentemente dividido em duas fases: uma fase aguda e uma fase crônica, com características clínicas distintas (Botoni et al., 2013). A fase aguda da doença tem início logo após a infecção e multiplicação do parasito (Chagas, 1909). Em humanos, ela tem uma duração de cerca de 2-4 meses e é assinalada pela presença dos parasitos no sangue periférico e em diferentes tecidos do hospedeiro, apurada através de exames de sangue a fresco (Talvani et al., 2000). A maioria dos indivíduos que apresentam a infecção aguda são assintomáticos ou apresentam sintomas brandos da doença que são facilmente confundidos com outras patologias (Tanowitz et al., 2015). Porém, esta fase aguda também pode apresentar alguns indícios específicos como, por exemplo, os sinais denominados de “porta de entrada”, o sinal de romanã, evidenciado pela entrada de parasitos na conjuntiva ocular (Romanã, 1935), e o chagoma de inoculação, que desenvolve semanas após a picada inicial do tratomíneo, caracterizado por um inchaço endurecido e avermelhado no local da inoculação (Hemmige et al., 2012). Porém, em até 1% dos casos, essa fase aguda pode ocorrer de maneira grave nos indivíduos gerando quadros preocupantes, como: febre alta, arrepios, erupção cutânea, alterações da função hepática, miocardite aguda, derrame do pericárdico, insuficiência cardíaca aguda e/ou meningoencefalite, particularmente em crianças (Tanowitz et al., 2015). Tanto em modelos experimentais como em seres humanos, esta fase inicial da infecção é marcada por um estado de imunossupressão, caracterizada por uma forte inibição da resposta imune do hospedeiro

pela virulência do *T. cruzi*, fator crucial para a criação de uma infecção persistente que leva ao estabelecimento de uma fase crônica da doença (Nardy et al., 2014).

Com o desenvolvimento da resposta inflamatória durante a fase aguda, cerca de 70- 80% dos indivíduos seguem para uma fase crônica indeterminada, marcada por um equilíbrio entre parasito e hospedeiro sem danos progressivos, de excelente prognóstico, (Hemmige et al., 2012; Malik et al., 2015; Vallejo et al., 2016). Por outro lado, aproximadamente 30- 40% destes indivíduos em fase crônica podem evoluir ou entrar diretamente para uma fase determinada/sintomática da doença, à qual é didaticamente dividida em formas cardíaca, digestiva (megaesôfago e/ou megacólon), ou cardiodigestiva (Malik et al., 2015; Tanowitz et al., 2015). A forma cardíaca destaca-se dentre as demais pelo elevado número de óbitos gerados, devido à insuficiência cardíaca de diversos graus, arritmias, acidentes tromboembólicos e aneurisma de ponta do coração (Andrade et al., 2014; Tanowitz et al, 2015).

Durante a fase crônica da doença, fatores como resposta inflamatória persistente, cepa do parasito e genética do indivíduo são fatores essenciais e determinantes para a progressão da doença (Vallejo et al., 2016). Esta fase também é marcada por baixa parasitemia (não detectado facilmente por microscopia óptica convencional), e por isso, a forma de diagnóstico neste estágio da doença utiliza de anticorpos anti *T. cruzi* presentes no soro. Dentre eles, os métodos mais utilizados são: ELISA, imunofluorescência indireta, PCR, xenodiagnóstico, hemocultura (Gomes *et.al*., 2001; Malik et al. 2015; Tarleton et al., 2016). Embora, entenda-se muito pouco sobre os fatores que levam ao desenvolvimento das diferentes formas da doença (Marin-Neto e cols., 2007; Dutra & Gollob, 2008), sabe-se que diferentes fatores são indicados como possíveis causas para essa progressão. Assim, estudos voltados à investigação da

resposta imunológica do hospedeiro vertebrado frente ao *T. cruzi* são muito importantes mediante às inúmeras lacunas sobre a patologia (inflamatória) da doença de Chagas.

1.3. A resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A inflamação, do latim "inflammare" (fogo), foi descrita pela primeira vez pelos gregos, que a definiram como uma sequência de eventos: calor, vermelhidão, dor e inchaço, possuindo papel fundamental no desenvolvimento de qualquer doença. A presença do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, no organismo de mamíferos, induz a uma complexa interação entre suas moléculas e as células de defesa do hospedeiro, e desta interação, emerge uma resposta inflamatória sistêmica e focal (Rocha e Silva, 1978; Marin-Neto et al., 2007; Talvani & Teixeira, 2011).

A intensa replicação deste protozoário durante a fase aguda da infecção ativa uma resposta inflamatória inicial coordenada por células do sistema mononuclear fagocitário (ex. macrófagos) que respondem à presença de antígenos do *T. cruzi* através de uma via dependente de receptores do tipo *Toll* (TLR)-Myd88 (Bafica et al., 2006). Estes receptores, ao se ligarem a proteínas (glicosilfosfadilinositol) presentes na superfície do parasito, formam âncoras, conhecidas por GPI-mucinas (Cardoso et al., 2016), conduzindo, principalmente, à ativação de uma resposta imune do tipo TH1, secretando mediadores inflamatórios como citocinas (IL-12, TNF, IFN- gama), quimiocinas (CCL2, CCL5), óxido nítrico (NO), dentre outros, que além de eliminarem o agente agressor, e modularem o curso da doença, atuam como indicadores quantitativos de processos biológicos ou patológicos empregados para fins de diagnóstico (Pinazo et al., 2015; Guedes et al., 2016). A produção do IFN-gama, é realizada tanto por células da resposta imune inata (ex. células NK, *Natural killer cells*)

quanto por células T, que em conjunto com o TNF, ativam células do sistema fagocitário mononuclear, a produzirem o óxido nítrico (NO), molécula efetora, responsável por controlar a replicação intracelular desse protozoário (Gutierrez et al., 2009); além de acionarem quimiocinas (CCL2-MCP1, CCL5-RANTES), que ativam e recrutam novas células para o local da infecção (Teixeira et al., 2002; de Oliveira et al., 2016). Uma vez que o excesso de células pró- inflamatórias em determinado tecido por um tempo prolongado pode ser prejudicial ao hospedeiro, torna-se essencial a participação de citocinas regulatórias, como a IL-10, responsáveis por inibir e controlar a resposta imune mediante a infecção por esse protozoário (Dutra et al., 2015).

A constância desses eventos inflamatórios, ao longo do tempo, conduz à prevalência desse parasito em diferentes tecidos do hospedeiro mamífero, especialmente em tecidos musculares. Em particular, o tecido muscular cardíaco representa um dos sítios mais importantes desta interação parasito-hospedeiro. Dito isso, a infiltração maciça de células inflamatórias, seja devido à permanência do estímulo ou à ausência de mecanismos regulatórios, embora priorize a eliminação do protozoário, inevitavelmente, conduz à destruição de células hospedeiras e de plexos simpáticos e parassimpáticos, essenciais para o funcionamento autonômico cardíaco. Estas ações em conjunto, culminam em uma nova reorganização estrutural do coração, afetando negativamente sua funcionalidade, e assim, conduzindo cerca de 20- 30% dos pacientes sintomáticos nesta condição, a um quadro de cardiopatia chagásica crônica (CCC) (Prata A, 2001; Marin-Neto et al., 2007; Talvani & Teixeira, 2011; Malik et al., 2015). Nestes indivíduos, já foi demonstrada maior produção/expressão de citocinas e quimiocinas pró- inflamatórias como TNF e CCL2, e a presença dessas, estão correlacionadas com o comprometimento do coração (Dutra *et.al*., 1997 Cunha-Neto et al., 2009). Por outro lado, em indivíduos crônicos, com ausência de manifestações cardíacas e digestórias, já

foi demonstrado uma prevalência de citocinas regulatórias circulantes, como a IL-10, mostrando que, em parte, o perfil dos mediadores inflamatórios parece definir o quadro clínico na fase crônica dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Dutra et al., 2014).

No entanto, a intensidade da resposta inflamatória mediante a infecção pelo *T. cruzi*, pode decorrer de diferentes fatores como, por exemplo, a cepa do parasito, a via de infecção, além da genética e da resposta imune do hospedeiro vertebrado, capaz de direcionar o curso de evolução da doença (Machado, 2013; Magalhães et al., 2015). Dito isso, torna-se importante o desenvolvimento/utilização de fármacos, visando não apenas a destruição do parasito, mas também o equilíbrio entre a interação parasito/hospedeiro.

1.4. Estresse oxidativo:

As células, de uma forma geral, são capazes de responder a diversos ataques inflamatórios por meio de diferentes mecanismos de defesa no intuito de protegê-las, repará-las ou degradar proteínas danificadas, garantindo sua replicação e sobrevivência. O estresse oxidativo, é uma das principais estratégias de defesa da resposta inflamatória no combate a infecções parasitárias (Schirmer et al., 1987; Pérez- Fuentes et al., 2003); definido como uma excessiva produção de substâncias oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), em detrimento às substâncias antioxidantes celulares, conduzindo, assim, a uma série de mudanças fisiopatológicas (Sies, 1997). Estas espécies reativas são moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus últimos orbitais atômicos, conferindo-lhes alta reatividade (Fuentez et al., 2007).

Estudos recentes têm mostrado uma correlação entre a progressão da doença de Chagas e um aumento na produção de espécies oxidativas (Gupta et al., 2009, Ba et al., 2010; Ribeiro et al., 2013). Esta elevação possivelmente encontra-se relacionado ao

potencial dessas espécies reativas em oxidar constituintes celulares importantes, como proteínas, lipídeos e DNA, comprometendo a estrutura, função, e consequente morte celular (Wen et al., 2004; Karabacak et al., 2014). Gupta e colaboradores (2009) demonstraram que as células do tecido muscular cardíaco respondem à infecção pelo *T. cruzi*, elevando as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo esta produção ainda mais intensificada por intermédio das citocinas e quimiocinas. Todavia, embora essencial para o controle inicial da infecção, o estresse oxidativo apresenta efeitos tóxicos sobre componentes celulares do hospedeiro, contribuindo para uma maior destruição dos cardiomiócitos e possivelmente conduzindo os pacientes ao quadro de CCC, fato que contribuiria para a piora do quadro clínico cardíaco (Pérez- Fuentes et al., 2003; Gupta et al., 2009)

Em modelo experimental infectado por este protozoário já foi demonstrado um aumento de marcadores de danos oxidativos em tecido muscular cardíaco, como proteínas carboniladas (PC) e TBARs, concomitante à redução na produção da enzima antioxidante SOD e não alteração da catalase (CAT), GPx e GR (Pérez- Fuentes et al., 2002). Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), têm sido associadas a uma maior proteção celular em infecções mediadas pelo *T. cruzi* (Cardoni et al., 1990). Esta enzima promove a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, conferindo proteção às células contra essa espécie reativa e, ao lado da GPx, desempenha papel chave em combater ROS no coração (Wen et al., 2004).

Desta maneira, tem havido enorme interesse pela identificação de agentes antioxidantes exógenos que atuem, direta ou indiretamente, sobre o estresse oxidativo. Dentre eles, fármacos da classe dos betabloqueadores tem se mostrado eficiente para esse papel, amenizando os efeitos deletérios cardiovasculares gerados pelas espécies

oxidantes e, desta maneira gerando melhorias em cardiopatias de diferentes etiologias. Um estudo de Budni et al (2009), demonstrou que pacientes portadores de CCC que receberam intervenção com este fármaco CV, apresentaram redução nos marcadores de stress oxidativo (PC, TBARs), com concomitante aumento de enzimas antioxidantes, conduzindo a melhorias no prognóstico clínico dos indivíduos.

1.5. Estratégias terapêuticas *anti-Trypanosoma cruzi*

Os estudos terapêuticos para combater o *T. cruzi* deram início no começo dos anos 60 (Brener Z, 1962). No presente, apenas dois fármacos antiparasitários são lícitos para o uso humano no tratamento desta doença (Pérez-Molina et al., 2015), o nitrofurano Nifurtimox (NFX; Lampit®, Bayer) e o nitroimidazol Benznidazol (BZ) (Rochagan®, Rodanil®, Roche). Os dois compostos compartilham peculiaridades como, uma melhor tolerância quando administrados em crianças, maior toxicidade em adultos, maior eficácia durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, além de susceptibilidades diferentes entre os diferentes DTU's do parasito (Bermudez et al., 2015).

O fármaco Benznidazol (N-benzil-2- nitroimidazole-1-acetamida), é uma droga nitroheterocíclica, sintetizada no ano 1972 pelo laboratório Hoffman - La Roche, na Suíça (Salomon, 2011), e introduzida para o uso clínico em humanos a partir do ano de 1978 (Apt, 2010). É o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas em países da América latina (Morillo et al., 2015). Esta intervenção atua por meio de mecanismos complexos, que envolvem a ligação a lipídeos, proteínas e DNA do *T. cruzi*, e desta forma, inibindo a replicação (Docampo, 1990), e a cadeia respiratória deste protozoário (Apt, 2010). Por outro lado, esses mecanismos de redução, mediados pelo complexo enzimático do citocromo P450, parecem afetar não apenas macromoléculas do parasito como também do hospedeiro mamífero, e, por conseguinte

gerando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS), e nitrogênio (RNS), e dessa forma, aumentando a toxicidade do fármaco, e consequentemente os efeitos adversos, associados ao seu uso (Urbina & DoCampo, 2003; Morillo et al., 2015). Esta terapia demonstra maior eficácia quando administrada em fase aguda, ou durante a infecção congênita pelo *T. cruzi* (Malik et al., 2015), sendo a cura parasitológica avaliada por técnicas de PCR, divulgadas acima de 90% em neonatos, e de 76-85% nos demais indivíduos infectados, e a cura parasitológica, avaliada por pelo menos dois testes diferentes, com uma proporção de cura a 100% nos pacientes com doença de Chagas congênita até o primeiro ano de vida e de 76% para o restante dos indivíduos infectados (Pérez-Molina et al., 2015). Todavia, demostra-se insatisfatória quando administrada em fase crônica, demonstrando limitações quanto à penetração tecidual (Santos et al., 2012). Estudos como o BENEFIT, maior ensaio clínico proposto para avaliar o papel do BZ em reduzir a mortalidade e danos cardiovasculares em pacientes com CCC, mostrou que embora esta intervenção tenha prevenido o desenvolvimento de uma forma mais grave de cardiopatia, não foi capaz de conter a evolução clínica cardíaca (Morillo et al., 2015).

Assim, ainda que esta intervenção terapêutica atue de forma satisfatória sobre a resposta imune e controle parasitário em fase aguda, apresenta, em contrapartida, alta toxicidade e efeitos adversos (Piaggio et al. 2001; Keenan & Chaplin, 2015), tornando necessário a descoberta de novas terapias, com intuito de gerar melhorias no prognóstico desse paciente. Assim, considerando a infecção mediante o *T. cruzi* como uma patologia de caráter inflamatório progressivo crônico, intervenções utilizadas em doenças cardiovasculares de diferentes etiologias (por exemplo, beta-bloqueadores e estatinas) têm recebido especial atenção por regular, parcialmente, a resposta imune e

consequentemente, conduzindo à melhorias na função cardíaca em estudos da infecção experimental e humana pelo *T. cruzi* (Machado *et. al*., 2005).

1.6. Os betabloqueadores adrenérgicos

Os betabloqueadores adrenérgicos constituem uma classe heterogênea de agentes, que atuam inibindo as respostas cronotrópicas, inotrópicas e vasoconstritoras à ação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina, em receptores específicos do tipo beta-adrenérgicos localizados na membrana celular (Bortolotto & Consolim- Colombo, 2010, Batlouni & Albuquerque, 2000). Estes receptores são classificados em alfa-adrenérgicos (□-AR) e beta- adrenérgicos (ß-AR), sendo descrito subtipos distintos de receptores do tipo ß-AR: ß1-AR, ß2-AR e ß3-AR, baseados em diferenças na potência dos seus agonistas (adrenalina e noradrenalina) (Lands et al., 1967; Neto et al., 2006). Os receptores ß-AR desempenham papel crucial na regulação de atividades cardiovasculares. Os três subtipos identificados (ß1-AR, ß2-AR, ß3-AR) estão presentes em músculos vascular e cardíaco, com predomínio de receptor tipo ß2- AR em músculo liso e esquelético, tipo ß1- ARs no miocárdio, e o tipo ß3- AR de efeitos metabólicos, como a lipólise no tecido adiposo (Vanhoutte & Gao, 2013). De acordo com o modelo apresentado por Dixon et al. (1987), estes receptores (ß1, ß2, ß3) apresentam sete domínios transmembrana, e encontram-se ligados às proteínas G (Neto et al., 2006), que por sua vez estão unidas à adenilato ciclase. A ligação do neurotransmissor aos receptores provoca um aumento na concentração do segundo mensageiro celular, o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Bortolotto & Consolim-Colombo, 2009), culminando em um aumento do débito cardíaco, aumento de renina pelas células justaglomerulares, e na interferência sobre a resposta inflamatória (Pauschingeret al., 2005).

O principal alvo da atividade betabloqueadora é o sistema nervoso simpático, que constitui uma das vias centrais da fisiopatologia da hipertensão arterial, tanto pelos efeitos que é capaz de gerar em tecido cardíaco e em vasos sanguíneos, quanto pelas interações com o sistema renina-angiotensina-aldosterona (Bortolotto & Consolim-Colombo, 2009). O bloqueio dos receptores do tipo ß1-AR inibe a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, anulando parcialmente seus efeitos deletérios na insuficiência cardíaca, pois, quando ativos esses receptores estimulam a secreção de renina pelas células justaglomerulares do néfron, aumentando a formação de angiotensina II, tóxica para cardiomiócitos, além de gerar vasoconstrição e liberação adicional de catecolaminas. Assim, os inibidores da enzima conversora de angiotensina e betabloqueadores demonstram atuar de forma sinérgica (Batlouni & Albuquerque, 2000). Nas últimas quatro décadas, esses fármacos têm sido considerados o marco para tratamentos como hipertensão, pelas suas supostas propriedades cardioprotetores (De Caterina & Leone, 2010). Além disso, a identificação dos efeitos prejudiciais do sistema nervoso simpático na disfunção ventricular esquerda sistólica e a efetividade do bloqueio parcial da estimulação simpática adrenérgica pelo tratamento com betabloqueadores adrenérgicos acarretou consumo crescente desses compostos em tratamentos de insuficiência cardíaca (Batlouni & Albuquerque, 2000).

Contudo, os betabloqueadores constituem uma classe complexa de fármacos, formada por diferentes agentes que distinguem entre si de forma substancial em suas propriedades farmacológicas (Di Nicolantonio et al., 2015), onde as diferenças mais importantes estão relacionadas ao grau de seletividade, sendo subdivididos em três classes (Bortolotto & Consolim- Colombo, 2010). A primeira classe, ou agentes de primeira geração são seletivos, responsáveis por realizarem o bloqueio de receptores adrenérgicos do tipo ß1-AR e ß2- AR, pouco tolerado na insuficiência cardíaca, e

devido ao efeito inotrópico negativo, se associa à resistência vascular periférica (ex: propranolol), os agentes de segunda geração, também seletivos, exercem o bloqueio em receptores do tipo ß1-AR, sem aumentar a resistência vascular periférica, e dessa forma tornando-se mais toleráveis para tratamentos de insuficiência cardíaca (ex: metoprolol) e, os de terceira geração, também chamados BB da nova geração, que realizam bloqueio não seletivo, ou seja, o bloqueio múltiplo de receptores beta- adrenérgicos, além da atividade simpatomimética intrínseca, e do bloqueio adicional do receptor □1-adrenérgico, promovendo a vasodilatação, indicando tolerabilidade maior que os fármacos mais antigos (ex: CV) (Batlouni e Albuquerque, 2000).

Nos dias de hoje, alguns tratamentos utilizados para pacientes diagnosticados com cardiopatia chagásica são semelhantes aos utilizados em pacientes portadores de outras patologias cardíacas (Issa et al., 2016), visto que na cardiopatia chagásica, as respostas neuro-hormonais e hemodinâmicas não se diferem tanto de outras cardiopatias (Botoni et al., 2007). Estes tratamentos são extensamente baseados na utilização de fármacos responsáveis pela inibição do sistema renina- angiotensina- aldosterona (ECA) e do sistema nervoso simpático (BB), porém, essas intervenções farmacêuticas, ainda não foram devidamente regularizadas (Issa et al., 2016). Alguns estudos indicam possíveis benefícios na utilização de betabloqueadores quando administrados em concomitância à infecção pelo *T. cruzi*, tanto em modelos experimentais como em humanos, observando melhora na taxa de mortalidade em fase aguda de animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com o BB CV (Pimentel et al., 2012), redução no parasitismo com o uso do BB propranolol (Fernández et al., 1999), melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo quando administrados em humanos (Botoni et al., 2007). Além disso, visto a importância da resposta inflamatória para a progressão da doença, Fatani e colaboradores (2015), também mostraram que há uma redução em

citocinas pró- inflamatórias em ratos com colites ulcerativas, quando tratados com o BB CV, sugerindo efeitos regulatórios para este fármaco. Todavia, os aspectos patológicos e fisiopatológicos da cardiopatia chagásica levantam especulações sobre a eficácia e segurança no uso dessas opções terapêuticas, especificamente com relação ao bloqueio do sistema nervoso simpático (Issa et al., 2016), pois, sabe-se que na cardiopatia chagásica é descrita a denervação do sistema nervoso simpático com redução das atividades adrenérgicas, levando-nos a questionar a real eficácia desses fármacos frente à infecção pelo *T. cruzi*.

1.7. O Carvedilol

O fármaco CV (Coreg®, Roche), é um betabloqueador adrenérgico de terceira geração, não seletivo, lipofílico, e sem atividade simpatomimética intrínseca (Leonetti & Egan, 2012), capaz de bloquear simultaneamente os receptores do tipo ß1 e ß2-adrenérgicos, resultando em melhorias na função miocárdica, além do bloqueio adicional do receptor do tipo □□- adrenérgico, que reduz a resistência vascular periférica através da vasodilatação (Dulin & Abraham, 2004). Esta capacidade de inibição múltipla indica vantagens em sua utilização quando comparado a outros betabloqueadores, devido à maior tolerabilidade (DiNicolantonio e Hackam, 2012), com efeitos hemodinâmicos similares aos IECAS, e desta forma, tornando-se fármaco de escolha para tratamentos anti-hipertensivos (Leonetti & Egan, 2012), insuficiência cardíaca (Prabhu et al., 2000), trombose (Lin et al., 2010) além de melhoras na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Gerson et al., 2002; Botoni et al., 2007; Paushingeret et al., 2005).

As particularidades do fármaco podem ser atribuídas às diferentes regiões de sua estrutura molecular (Dulin & Abraham, 2004) (Figura 1), como por exemplo, a

presença de grupos carbazol e metabólitos hidroxilados que o conferem alta atividade antioxidante (Miranda et al., 2014), através da doação direta de elétrons às Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (Budni et al., 2012). O estudo desenvolvido por Rossig et al. (2000) relata que o efeito antioxidante do fármaco é capaz de inibir a apoptose de células endoteliais, e dessa forma acarretando melhorias em pacientes portadores de insuficiência cardíaca. Estudos como o de Budni et al. (2012), mostrou que o fármaco se apresentou eficaz na atenuação do dano oxidativo gerado em pacientes portadores da doença de Chagas.

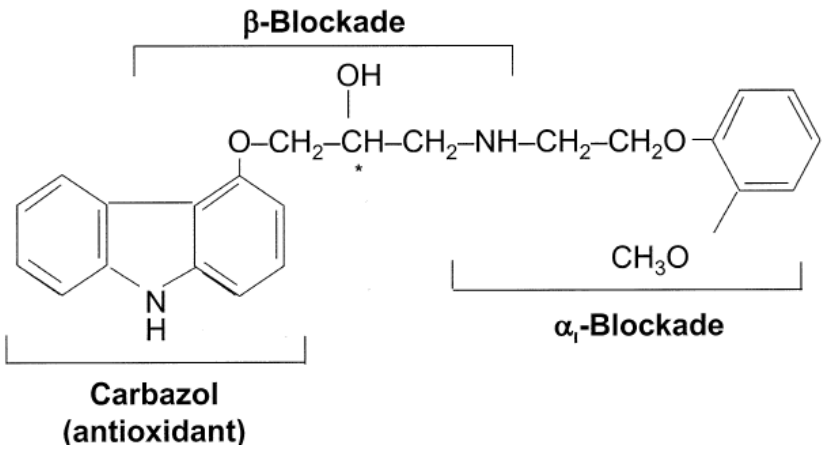


Figura 1- Estrutura molecular do Carvedilol. Imagem retirada de: Pharmacology of Carvedilol (Dulin & Abraham, 2004)

Um grande número de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas em indivíduos portadores de diferentes cardiopatias (Ohtsuka et al., 2002; Prabhu et al.,2000; Botoni et al., 2007), e dessa forma exercem função de marcadores biológicos, a fim de identificar os fatores imunológicos envolvidos na progressão da doença (Poveda et al., 2014). Alguns estudos como o de Desoky (2016), têm mostrado uma possível atividade imunomodulatória do fármaco CV. Lin et al.(2008), também mostrou isso, sugerindo interferência do fármaco na produção de citocinas pró- inflamatórias,

como na redução da citocina TNF, presente em alta quantidade em casos de progressão de insuficiência cardíaca. O CV também demonstrou atuar nos neutrófilos (Feuerstein et al.,1997), primeiras células que se deslocam para o sítio de infecção (Catelan et al., 2007), que além de serem fonte importante de radicais livres de oxigênio, também liberam citocinas e enzimas proteolíticas que podem aumentar os danos isquêmicos (Feuerstein et al.,1997). Além disso, esse betabloqueador é capaz de alterar a expressão gênica após isquemia miocárdica, pela interferência nos níveis circulantes de TNF, IL-6 e IL-1ß (Paushingeret et al.,2005; Nakano et al., 2001). Um estudo com indivíduos diagnosticados com a doença de Chagas mostrou que a associação do fármaco Enalapril (inibidor de ECA) com o betabloqueador CV, apresentou redução sérica da quimiocina pró- inflamatória CCL5, bem como uma melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Botoni et al. 2007).

Dessa forma, visto os efeitos pleiotrópicos do fármaco, e a ausência de registros em publicações científicas correlacionando sua utilização frente à infecção pelo *T. cruzi* em fase aguda, ele foi selecionado para realização de ensaios, na tentativa de elucidar algumas questões envolvendo essa relação.

2.0. OBJETIVO GERAL

Avaliar a interferência da administração diária do betabloqueador adrenérgico carverdilol e/ou Benznidazol sobre a resposta inflamatória cardíaca durante a infecção experimental de camundongos C57BL6 pelo *T. cruzi* (cepa Colombiana) em fase aguda.

2.1. Objetivos específicos:

Em camundongos isogênicos C57BL6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados ou não, com CV e/ou BZ, identificar os efeitos destes fármacos nos seguintes parâmetros:

(i) Ações anti- *T. cruzi* em fase aguda;

(ii) Sobrevida dos animais;

(iii) Peso relativo do coração

(iv) Produção plasmática de marcadores inflamatórios (TNF, IL-10, CCL2, CCL5);

(v) O infiltrado inflamatório, e a presença de ninhos de amastigota no tecido muscular cardíaco;

(vi) O estresse oxidativo no tecido muscular cardíaco

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e infecção pelo *T. cruzi*

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6 (isogênicos), com idade de 6-8 semanas e peso aproximados entre 18 a 20g, fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP) e mantidos sem restrição de água e ração. Os procedimentos adotados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, protocolo nº 2016/14.

Para a infecção, foi utilizada a cepa Colombiana do *T. cruzi*, armazenada em nitrogênio líquido, e mantida *in vivo* por sucessivas passagens em camundongos da linhagem swiss. A cepa Colombiana foi descoberta após isolamento, por hemocultura, de um indivíduo com doença de Chagas em fase crônica (humano) na Colômbia, predominando sua forma larga e nítido tropismo para os tecidos musculares cardíaco e esquelético, gerando intensa resposta inflamatória, e altos picos de parasitemia entre 20-30 dias de infecção. Atualmente, esta cepa pertence ao DTU I do *T. cruzi*, comumente relacionado à casos de cardiopatias (Brisse et al., 2000; Borges et al., 2009; Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012).

O inóculo foi realizado via intraperitoneal, com 50 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*. A coleta dos parasitos sanguíneos ocorreu próximo ao pico de parasitemia, objetivando minimizar a seleção genética de formas. O sangue foi diluído em salina 0,9% para ajuste da concentração desejada.

3.2. Tratamento e eutanásia dos animais

De acordo com as normas estabelecidas pelo CEUA, para definirmos o número de animais necessários em cada grupo experimental de tratamento, foi realizado um cálculo amostral através da utilização do programa BIOESTAT 5.1, com nível de confiança de 95%. Definindo a necessidade de serem utilizados 15 animais por grupo. Assim, foram inoculados intraperitonealmente com 50 formas tripomastigotas os seguintes grupos experimentais: (I) 15 animais que não receberam tratamento (II) 15 animais tratados com 100mg/Kg/dia de BZ (III) 15 animais tratados com o CV 23mg/kg/dia (IV) 15 animais tratados com a combinação dos fármacos BZ 100mg/kg/dia e 25mg/kg/dia. Além disso, foram utilizados 10 animais como controle não infectado.

Os animais da linhagem C57BL/6 permaneceram 28 dias infectados, e o tratamento se deu início após 72 horas de infecção, tempo estimado para a primeira replicação intracelular do parasito. Dessa forma, os animais foram tratados durante 23 dias consecutivos por via oral, através do método de gavagem. O grupo controle não infectado e o grupo controle infectado não tratado foram mantidos sob as mesmas condições dos demais grupos, recebendo tratamento com o veículo no qual os fármacos foram diluídos, PBS 1x com adição de metil- celulose para suspensão.

No 28^0 dia de infecção os animais foram eutanasiados e previamente anestesiados para a coleta de sangue pelo plexo retro-orbital com a adição de uma pequena quantidade (50ul) de anticoagulante e, posteriormente, este material foi submetido à centrifugação refrigerada para obtenção do plasma. O material foi aliquotado em dois tubos cônicos marca *eppendorff* de 1,5 ml e armazenado a -80 ^{0}C. Em sequência, cada animal foi pesado e então eutanasiado. O coração destes animais foi removido, lavado s em PBS 1x e armazenados imediatamente em formaldeído tamponado 10% para análise histopatológica. Além disso, uma secção do fígado e do

baço também foram removidos e armazenados em formaldeído para formação de um banco de material biológico a ser utilizado em trabalhos futuros.

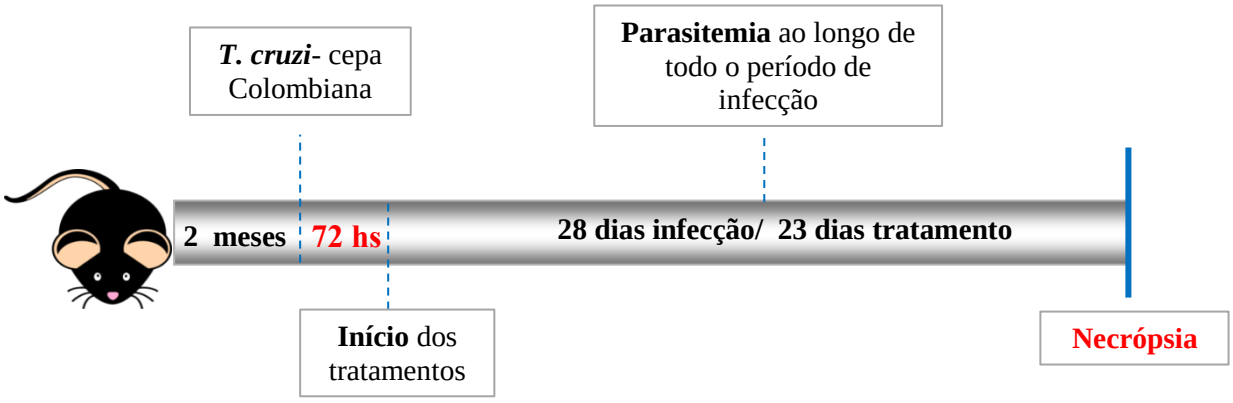


Figura 2- Linha do tempo de tratamento. *Após 8- 10 semanas de vida os animais da linhagem C57BL/6 foram infectados com 50 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do T. cruzi. Após 72hs, deu-se início as intervenções terapêuticas propostas neste estudo. Os animais foram tratados durante 23 dias e eutanasiados no* 28^0.

3.3. Parasitemia

As análises parasitêmicas foram realizadas diariamente à partir do primeiro dia de infecção, através da coleta de 5µl de sangue da veia caudal marginal dos camundongos e a quantificação das formas tripomastigotas, realizada por contagem direta em lâmina/lamínulas pela microscopia óptica diariamente, segundo a técnica descrita por Brener (1962) até o vigésimo oitavo dia de infecção, dia em que ocorreu a eutanásia desses animais.

3.4. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados utilizando-se o plasma dos camundongos infectados ou não pelo *T. cruzi* e tratados ou não com as terapias farmacológicas propostas neste trabalho. O plasma dos animais obtidos após separação

por centrifugação a 4000rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 graus Celsius. O plasma foi coletado e o precipitado descartado. Os ensaios, assim como a preparação das soluções utilizadas, foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante de cada kit imunoenzimáticos.

Para o procedimento foram utilizadas placas de 96 poços e, em cada poço adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra a proteína (anticorpo de captura), diluídos em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 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 100 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 100µl 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 2 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 20 minutos à temperatura ambiente.

O cromógeno utilizado para a revelação foi a tetrametilbenzidina (*Color Reagen*t B-R&D Systems, Minneapolis, USA), sendo 5mL deste cromógeno adicionados a 5mL de água oxigenada (H2O2- Color Reagent *A* - *R&D Systems*, Minneapolis, USA). Cem microlitros dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após 20 minutos de incubação na ausência de luz, a reação foi bloqueada a partir da adição de 100 µl de H_2SO_4 2,5M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada através de um

leitor óptico de microplacas utilizando um comprimento de onda de 450 nM, 30 minutos após a adição de H2SO4 para bloqueio das reações. 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.

Os ensaios imunoenzimáticos foram utilizados para a medição dos níveis circulantes das quimiocinas CCL5 e CCL2 (*R&D Systems*, Minneapolis, USA), ~~e~~ para as citocinas pró- inflamatórias TNF e INF-gama (Fator de necrose tumoral- *R&D Systems*, Minneapolis, USA) e para as citocinas regulatórias interleucina-10 e interleucina- 22 (*R&D Systems*, Minneapolis, USA).

3.5. Histologia

3.5.1. Processamento e cortes em micrótomo

Os animais C57BL/6 dos cinco grupos experimentais foram eutanasiados no 27º dia de infecção tendo seus corações imediatamente fixados em formaldeído tamponado 10%. Os tecidos foram processados, e então incluídos em parafina complementada com 10% de cera de abelha. Os blocos montados foram submetidos à microtomia em secções de 4µm de diâmetro para confecção das lâminas que foram, posteriormente, coradas pelo método de Hematoxilina & Eosina, para a análise do infiltrado inflamatório.

3.5.2. Técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (HE)

Para análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no tecido cardíaco dos animais, foi realizada a coloração por HE. Os cortes com com 4µm de espessura foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos em cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10 minutos em cada, e lavados em água corrente por 10 minutos e em PBS

pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado e, logo após, lavados novamente em água corrente. Depois foram corados pela Eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente, as lâminas com os cortes, foram acondicionadas em estufa à 56°C para secagem e, posteriormente submetidas a um banho de xilol durante 30 minutos. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e Entelan® (Merck, Alemanha).

3.5.3. Análise histopatológica

Para todas as análises nos cortes histológicos, as imagens foram digitalizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B com uma microcamêra acoplada e analisadas pelo programa analisador de imagens Leica QWin V3.

O processo inflamatório foi avaliado através da quantificação de todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração em 20 imagens aleatórias (área total percorrida igual a 1,5 x 10^6 μm^2). A análise dos valores obtidos foi feita pelo cálculo estatístico descritivo do conjunto de valores obtidos em cada subgrupo. Sendo o mesmo determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados ± desvio padrão, os animais infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.

3.6. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi analisado perante análise de algumas enzimas e proteínas no tecido cardíaco. Para essas dosagens, foram utilizados fragmentos homogeneizados do coração de cada animal.

3.6.1. Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do homogeneizado das amostras do tecido cardíaco pelo Método de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga às proteínas da amostra, alterando sua absorbância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Esta concentração foi representada em mg/mL.

3.6.2. Atividade da Superóxido dismutase- SOD

A superóxido dismutase é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Sua atividade foi medida no tecido cardíaco de acordo com o método de Marklund e colaboradores (Marklund, S & Marklund, G, 1974) que se baseia na capacidade da enzima SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH2PO4), fosfato de sódio dibásico (Na2HPO4), Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e DMSO (dimetilsulfóxido). Para a realização da dosagem, fragmentos de 0,5 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50mM), pH 7,0, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. A confecção das dosagens nas amostras utilizando placas de Elisa de 96 poços de baixa sensibilidade, seguiu a sequência de adições de reagentes, conforme o quadro abaixo:

Poço	Amostra	Tampão	MTT	Pirogalol
Branco	_	144 µl	6 µl	_
Padrão	_	127 µl	6 µl	15 µl
Amostra	30µl	99 µl	6 µl	15 µl

As amostras foram então incubadas por 5 minutos em estufa a 37 °C. Logo após, 150 µL de DMSO foram adicionados às mesmas para parar a reação. As absorbâncias foram lidas no leitor de ELISA em um comprimento de onda de 570 nm. Para o cálculo da atividade de SOD, foi subtraído o resultado obtido da amostra pelo valor encontrado do branco e, a seguir, foi dividido esse valor pelo encontrado da subtração do padrão pelo branco. Esta concentração foi representada em U/mg de proteína.

3.6.3. Atividade da Catalase

A atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a uma absorbância de 240nm, representada por U/mg de proteína (Aebi, 1984), que consiste na decomposição do H2O2 pela enzima observada durante 1 minuto por espectrofotometria a 240 nm. Para a preparação da amostra biológica, 100 mg do tecido cardíaco foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno, foi adicionado 50 µL de tampão fosfato 0,1 mM (pH 7,2) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho-maria a 30 ºC por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL da amostra e 900 µL de H2O2 (10 mM). As absorbâncias foram lidas, exatamente a cada minuto, durante 3 minutos. A água destilada é utilizada como branco. A atividade

da CAT foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido da primeira e da última absorbância lida (absorbância final - absorbância inicial). O coeficiente de extinção molar utilizado foi o do H2O2 (39,4 M-1 cm-1). Esta concentração foi representada em U/mg de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H2O2 por minuto.

3.6.4. Proteínas Carboniladas

A oxidação de proteínas por EROs leva à formação de derivados carbonílicos, que podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. Para determinar da concentração de proteína carbonilada utilizamos o método descrito por (Levine et al., 1994). Para a reação foi utilizado um homogeneizado de tecido cardíaco dos camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6, em solução de KPE na concentração de 100mg/ml, onde 0,5ml dessa solução foram precipitadas com 0,5ml de TCA a 1% e centrifugado a 5000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e foi adicionado ao pellet 0,5ml de DNPH em HCL para que esse sistema permanecesse em incubação por 1 hora com passagens no vórtex a cada 15 minutos. Em seguida foram adicionados 0,5ml de TCA a 1% e levado para nova centrifugação. Ao *pellet* foi acrescentado 1 ml de solução 1:1 de etanol/acetato de etila e levado novamente para centrífuga. A seguir 1 ml de solução de SDS a 6% foi adicionado ao tubo e centrifugado. Desta vez foi descartado o pellet e o sobrenadante foi levado para leitura em espectrofotômetro em cubeta de quartzo.

3.6.5. Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico- TBARS

As concentrações de TBARS, assim como de proteína carbonilada funcionam como marcadores indiretos de danos oxidativos a lipídeos e proteínas, respectivamente.

A determinação da concentração de TBARS foi baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico em se ligar a lipídeos oxidados, formando malondialdeído. Essa dosagem foi realizada conforme descrito por Buege & Aust (1978). Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato, ph 7,4 e em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em um tubo foram adicionados 500 µL de homogeneizado, 230 µL de ácido tricloroacético (TCA) 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico (HCL) 0,23N, 230µL de TBA 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 123 µL de BHT 5 Mm dissolvidos em etanol. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriados em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10000 g e o sobrenadante retirado foi lido no espectrofotômetro a 535 nm, zerado com água destilada. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar (□ = 1,56x 105 L x mol-1 x cm-1), seguindo a lei de Lambert Beer. Essa concentração foi representada em nmols/mL

3.7. Análise estatística dos dados

Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism,* onde os dados foram analisados utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov* para confirmar os padrões de normalidade. Após confirmada a normalidade, os dados foram analisados pelo teste OneWay ANOVA para múltiplas comparações (*Turkey test*), e twoWAY ANOVA para análise da parasitemia. As diferenças foram consideradas significativas se o P foi igual ou menor que 0,05.

4.0. RESULTADOS

4.1. Análise da parasitemia

Posterior à infecção, os animais foram submetidos à primeira avaliação através do método da parasitemia, que ocorreu durante 27 dias.

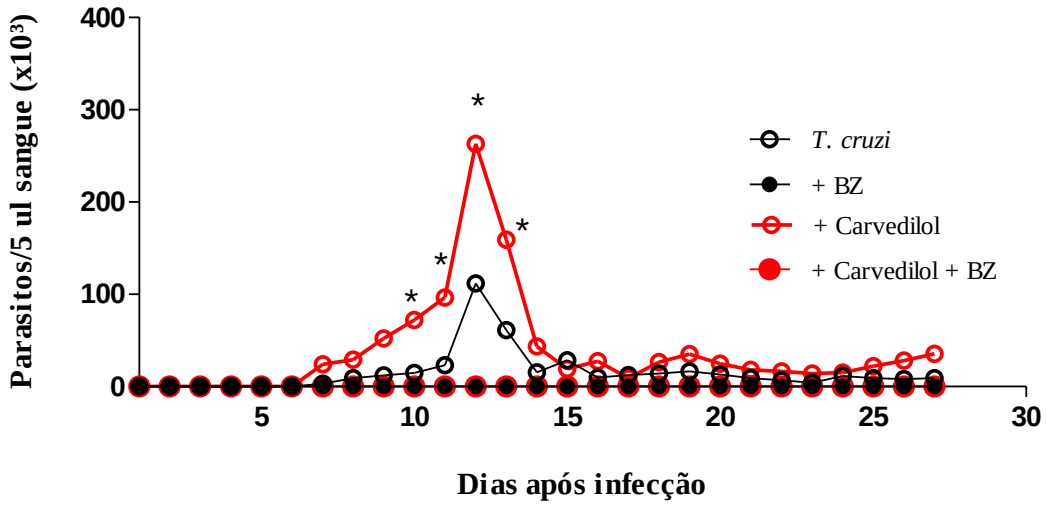


Figura 3. Curvas de parasitemia de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* tratados ou não tratados CV, BZ e combinação de ambos os fármacos. *Curvas referentes a 28 dias de infecção e 23 dias de tratamento. Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/ dia referente a cada grupo. *p<0,05 comparação entre a curva que representa o tratamento com CV, demais fármacos e grupo infectado não tratado.*

Desta forma, de acordo com a curva de parasitemia (figura 3), nota-se que os parasitos no sangue começaram a ser detectados a partir do 7° dia de infecção, com diferença significativa entre os grupos demonstrada estatisticamente do 10º ao 13º dia de infecção. As formas tripomastigotas presentes na circulação sanguínea dos animais tratados com o CV apresentou-se elevada quando comparada aos outros grupos de tratamento, inclusive quando comparada ao grupo de animais infectados que não receberam tratamento, sendo as diferenças com esse grupo observadas a partir do 11º ao 13º dia de infecção, demonstrando uma provável atuação deste fármaco sobre a resposta

imune desses animais. Já a terapia realizada com o fármaco BZ, grupo controle de tratamento, e a terapia realizada com combinação dos fármacos BZ e CV, mantiveram a curva de parasitemia zeradas durante todo o período de avaliação.

4.2. Curvas de Mortalidade

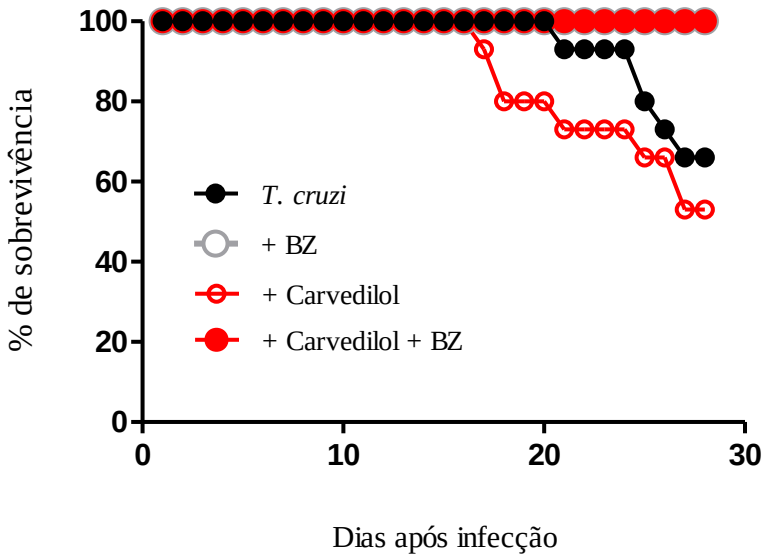


Figura 4. Curvas de mortalidade de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados ou não com CV, BZ e associação (BZ+CV). *Curvas referentes ao período compreendido entre o 1º e o 28 º dia de infecção, quando eutanasiados.*

A taxa de mortalidade foi determinada para os grupos de animais infectados, submetidos ou não aos tratamentos (figura 4). Assim, observa-se que a taxa de sobrevida foi de 100% nos grupos de animais infectados e tratados com o fármaco benznidazol, ou com a combinação benznidazol e CV. Já o grupo de animais infectados que não receberam tratamento, apresentou aproximadamente 66% de seus animais vivos até o 28º dia de infecção (dia da necrópsia), e justamente o grupo que recebeu o

tratamento com o betabloqueador apresentou o menor número de animais vivos ao final de 28 dias, com uma taxa de sobrevida de aproximadamente 53% até o dia da eutanásia.

4.3. Peso Relativo do Coração

O resultado da massa relativa do coração encontra-se representado pela figura 5, e após análise, observa-se um aumento na relação peso coração/corporal nos animais infectados pelo *T. cruzi*, no entanto não houve diferença comprovada estatisticamente entre o grupo de animais infectados não tratados em relação aos outros grupos, independentes da terapêutica farmacológica. Todavia, nota-se que o grupo de animais que recebeu tratamento com o CV foi o único que apresentou diferença estatística significativa em relação o controle não infectado.

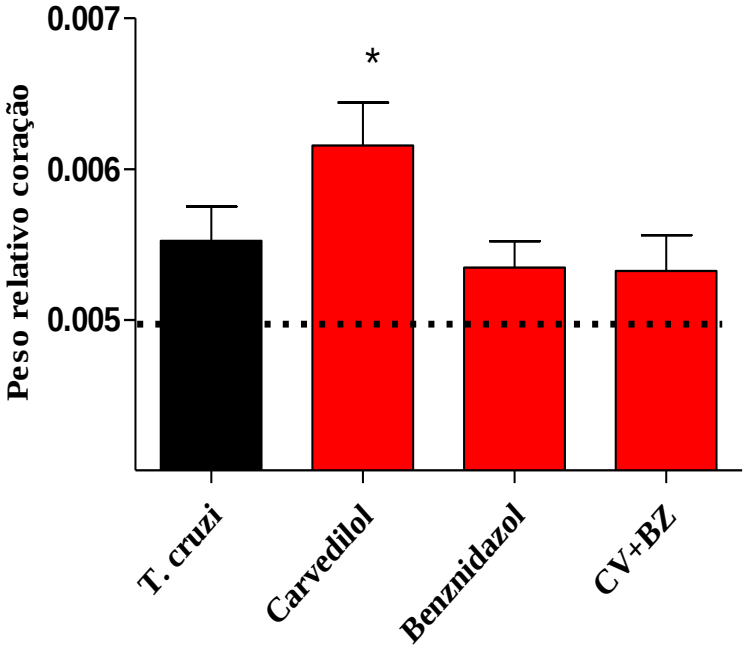
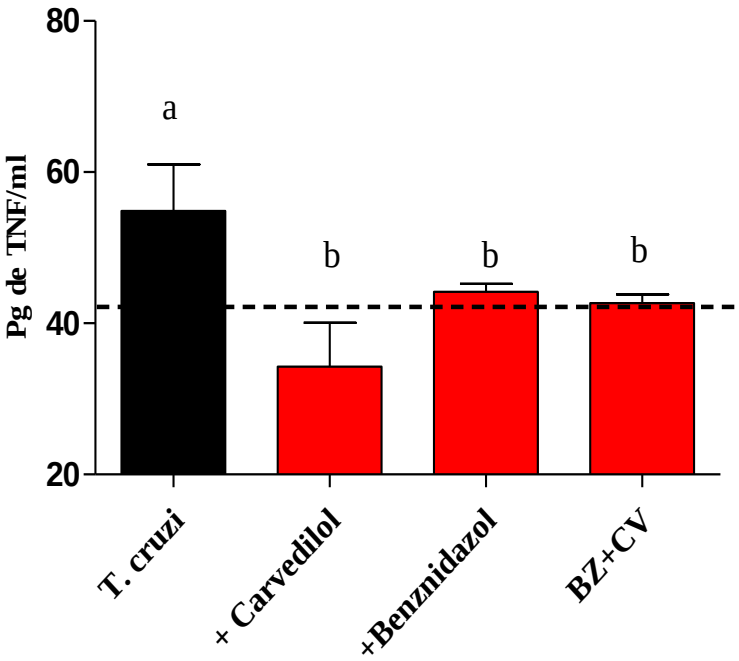


Figura 5. Peso relativo do coração de animais C57BL/6 infectados/ não infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados ou não com CV, BZ, e associação (BZ+CV). *Medida obtida a partir do peso do coração dividido pelo peso corporal do*

*animal. Barra em preto representa o grupo de animais infectados/ não tratados, barras em vermelho representam grupos que receberam intervenção terapêutica. Linha tracejada representa o peso relativo do coração de animais normais; * para diferença significativa em relação ao grupo controle não infectado p<0,05.*

4.4- Ensaios imunoenzimáticos

A resposta imune advinda dos diferentes tratamentos também foi avaliada neste estudo por meio de ensaios imunoenzimáticos para a citocina inflamatória TNF regulatória IL-10 bem como para as quimiocinas CCL2 e CCL5.



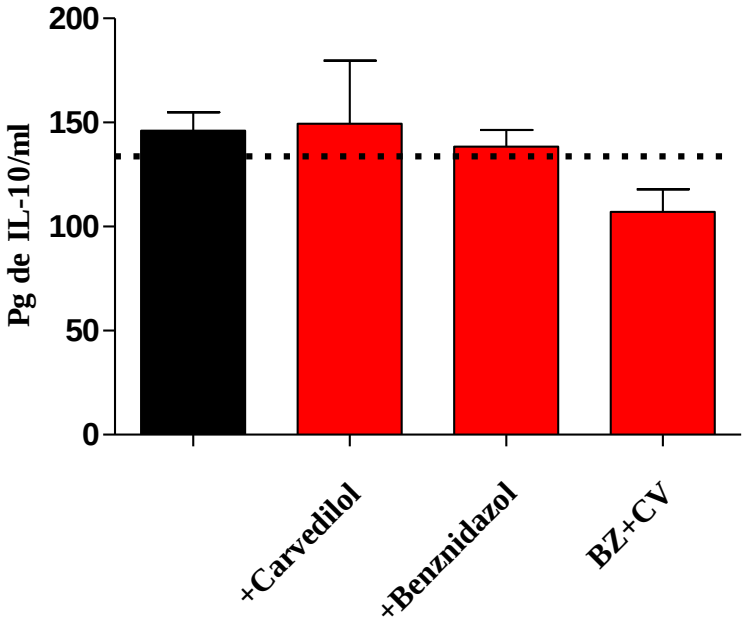


Figura 6. Figura 6: Produção sérica de citocinas pró-inflamatória e regulatória (TNF, IL-10) Concentração das citocinas TNF (A), IL-10(B) no plasma de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho. *Barra em preto representa o grupo de animais infectados/ não tratados, barras em vermelho representam grupos que receberam intervenção terapêutica. Linha tracejada representa a concentração sérica dessas citocinas em animais normais. Letras diferentes para diferenças estatísticas com p<0,05.*

Ao observar a produção plasmática da citocina pró-inflamatória TNF (figura 6a), nota-se que houve uma redução dos níveis dessa para os animais tratados com a dose de 25mg/kg/dia do CV, comparado ao grupo de animais infectados que não recebeu tratamento, apresentando diferenças estatísticas significativas. O mesmo perfil pode ser observado para os animais tratados com a dose de 100mg/kg/dia de benznidazol.

Já os níveis da citocina regulatória IL-10 (figura 6b), mostraram-se inalterados, sem diferença estatística comprovada entre os diferentes grupos.

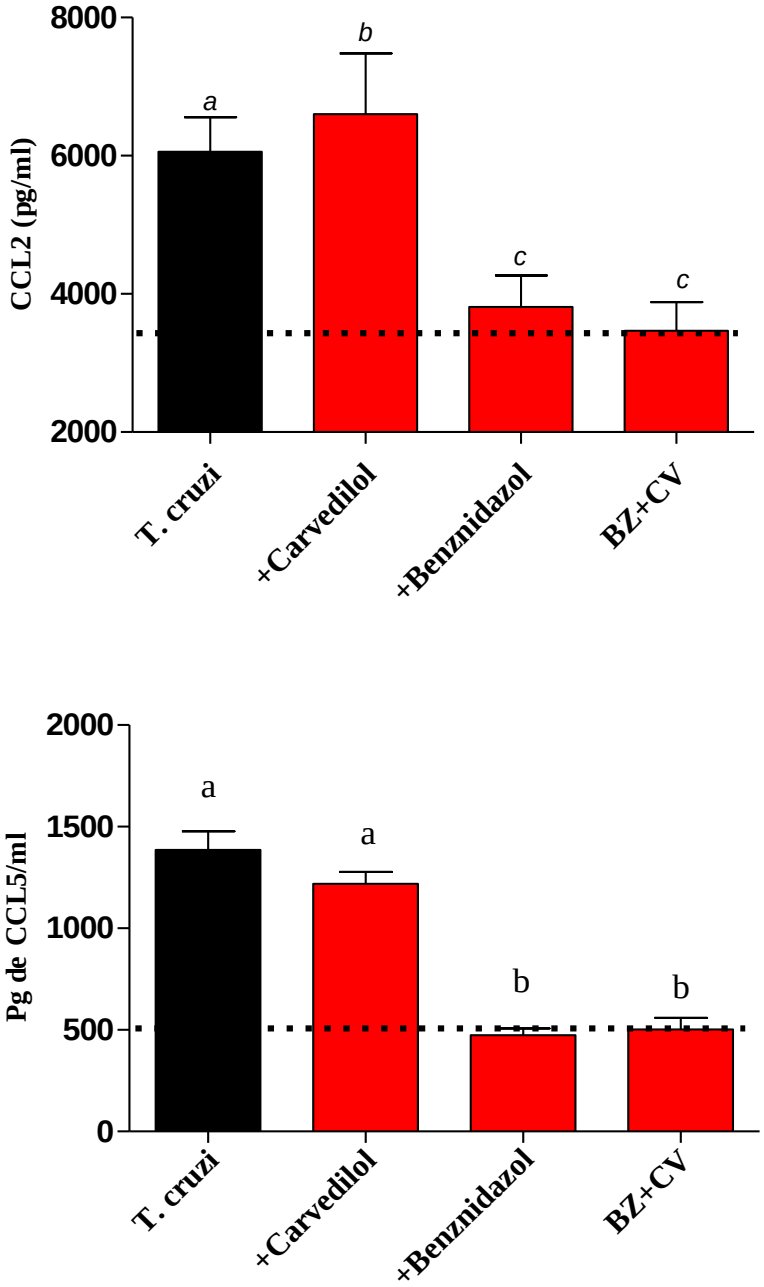


Figura 7. Produção sérica de quimiocinas inflamatórias CCL2 e CCL5. *Concentração das quimiocinas CCL2 (A), CCL5 (B) no plasma de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do T. cruzi submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho. Barra em preto representa o grupo de animais infectados/ não tratados, barras em vermelho representam grupos que receberam intervenção*

terapêutica. Linha tracejada representa a concentração sérica dessas citocinas em animais normais. Letras diferentes para diferenças estatísticas com P<0,05.

Ao correlacionar os níveis circulantes das quimiocinas CCL2/MPC-1 (figura 7a) e CCL5/RANTES (figura 7b) entre os diferentes grupos, nota-se que a infecção foi capaz de elevar de maneira significativa o nível plasmático das quimiocinas. Observa-se que apenas a terapias com o fármaco Benznidazol e a associação foram capazes de reduzir os níveis circulantes de CCL2 e CCL5, assemelhando-se aos níveis observados no grupo controle não infectado.

4.5. Análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco

O efeito dos tratamentos em monoterapia e em associação também foi analisado em face das alterações histopatológicas, durante os 28 dias de infecção, período correspondente à fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi.* (figuras 8 e 9). Após análise de morfometria do tecido cardíaco de animais pertencentes à linhagem C57BL/6, observou-se que os animais infectados que não receberam tratamento apresentaram inflamação difusa moderada (figura 8). Todavia, após 23 dias de tratamento, a monoterapia com o fármaco CV mostrou um aumento significativo dos núcleos celulares em relação aos demais grupos (figura 8), retratando processo inflamatório do tipo focal intenso (figura 9). Já, o grupo de animais tratados com o fármaco BZ, manteve o número de núcleos celulares semelhante ao observado para os animais não infectados, ou seja não apresentando inflamação (figura 8 e 9). Todavia, ressalta-se que o grupo que recebeu a associação apresentou pequeno aumento de núcleos celulares, exibindo inflamação do tipo focal discreta.

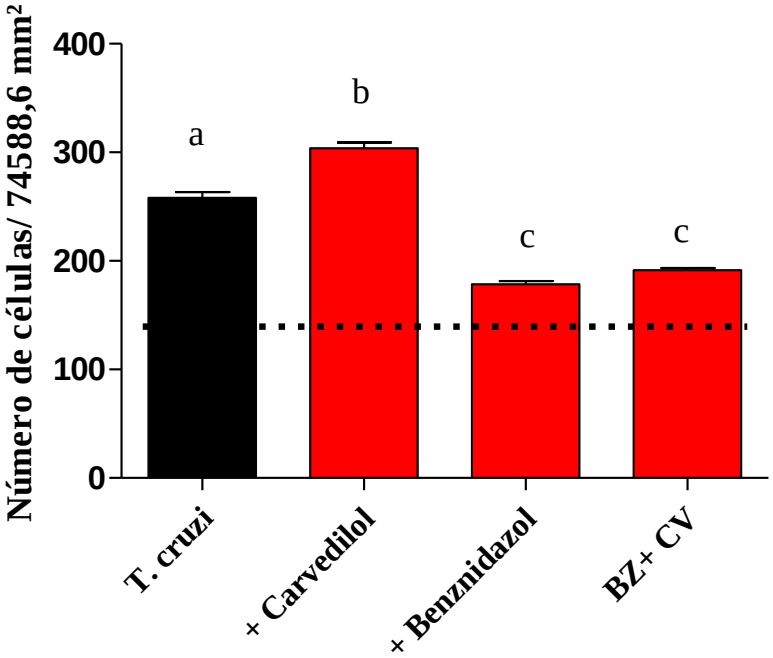


Figura 8. Quantificação do processo inflamatório no tecido cardíaco de camundongos infectados pela cepa Colombiana do Trypanosoma cruzi tratados ou não com CV e/ou Benznidazol em fase aguda. *Análise do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais infectados não tratados e tratados com BZ, CV e combinações. Letras diferentes representam diferença significativa com p* <0,05. *A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados.*

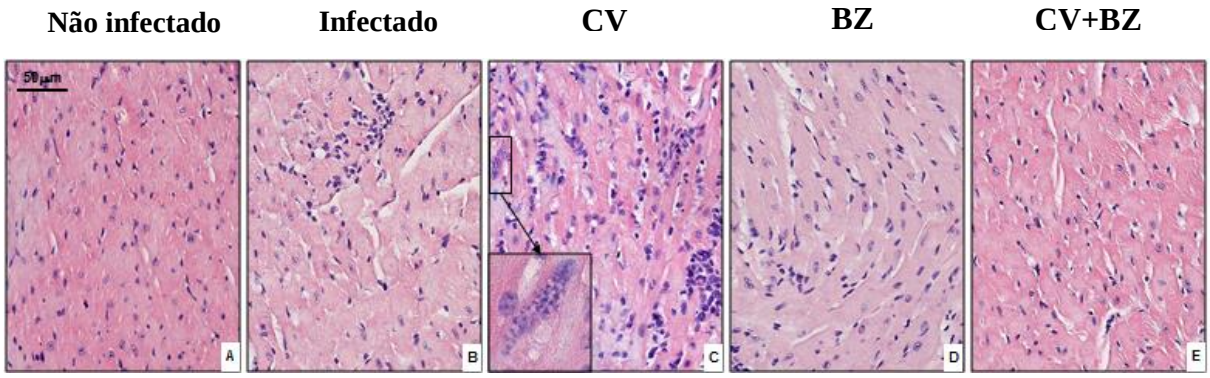


Figura 9. Análise qualitativa do coração. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T.cruzi* tratados ou não com CV e/ou BZ na fase aguda. *(A) Aspecto histológico cardíaco normal em animais não infectados; (B) Infiltrado inflamatório moderado e focal de animais infectados e não tratados; (C) Infiltrado intenso e focal de animais infectados e tratados com 25mg/kg de CV; (D) Ausência de infiltrado inflamatório de animais infectados e tratados com as doses 100 de BZ; (E) Processo inflamatório discreto e focal de animais infectados e tratados com a associação de CV e BZ nas doses de 25mg/Kg e 100 mg/Kg; Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm*

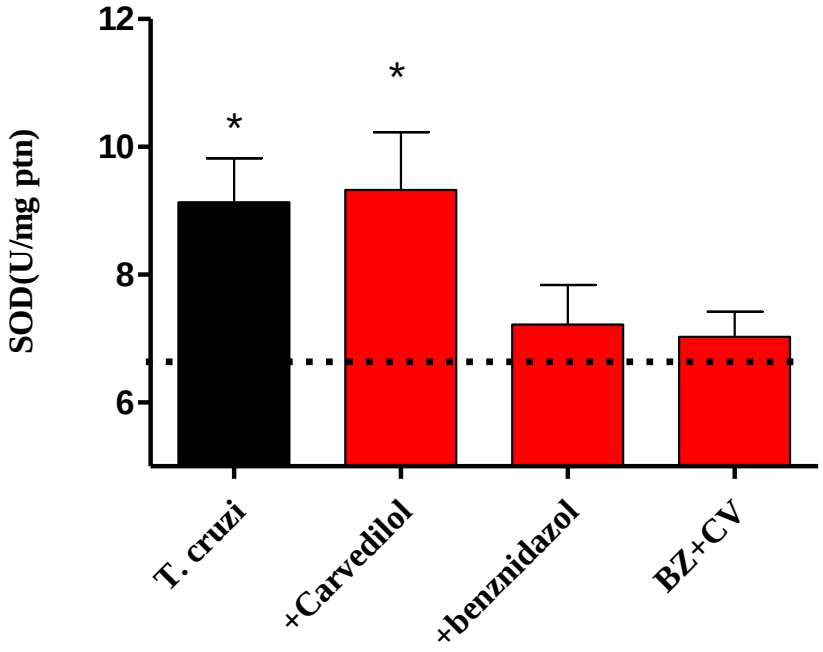
4.6. Estresse Oxidativo

O Estresse Oxidativo foi realizado através da análise da atividade das enzimas antioxidantes e dos marcadores de dano oxidativo, sumarizados na tabela abaixo:

Tabela 1: Quadro descritivo de marcadores de estresse oxidativo

Enzima/Proteína	Sigla	Função
Catalase	CAT	Antioxidante/ $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Superóxido dismutase	SOD	Antioxidante/ Converte ânion superóxido em H_2O_2
Proteína Carbonilada	PC	Marcador de dano oxidativo de proteínas
Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico	TBARS	Marcador de dano oxidativo de lipídeos

Após análise do gráfico referente à atividade da enzima antioxidante SOD (figura 10A), notou-se um aumento da atividade dessa enzima no grupo de animais infectados e tratados com o fármaco CV, em relação aos demais grupos infectados, entretanto, este aumento não é observado estatisticamente. Todavia, o grupo infectado não tratado e o grupo que recebeu a monoterapia com CV apresentaram diferenças significativas com $P < 0,05$, quando comparado ao grupo de animais pertencentes ao grupo controle não infectado. O mesmo perfil pode ser observado em relação à atividade da enzima antioxidante CAT (figura 10B),onde um aumento significativo em sua produção é observado apenas no grupo que recebeu o tratamento com o CV em relação ao grupo controle infectado/não tratado.



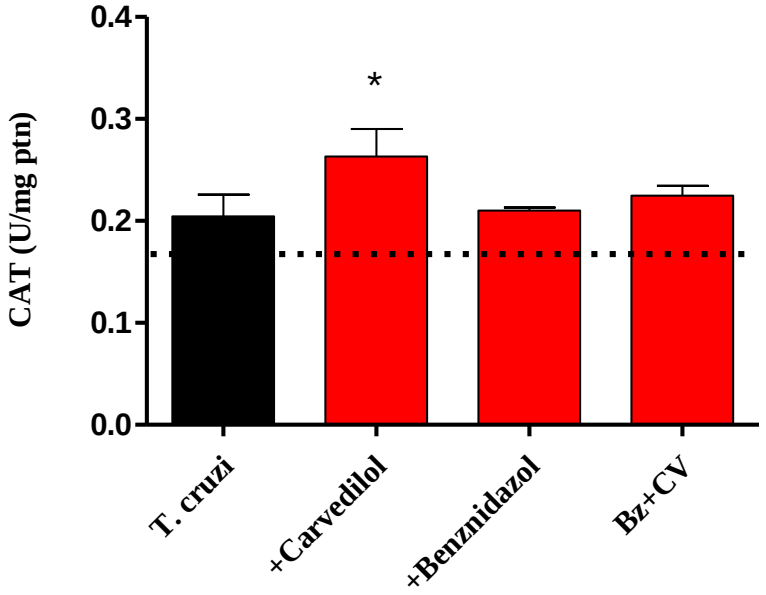
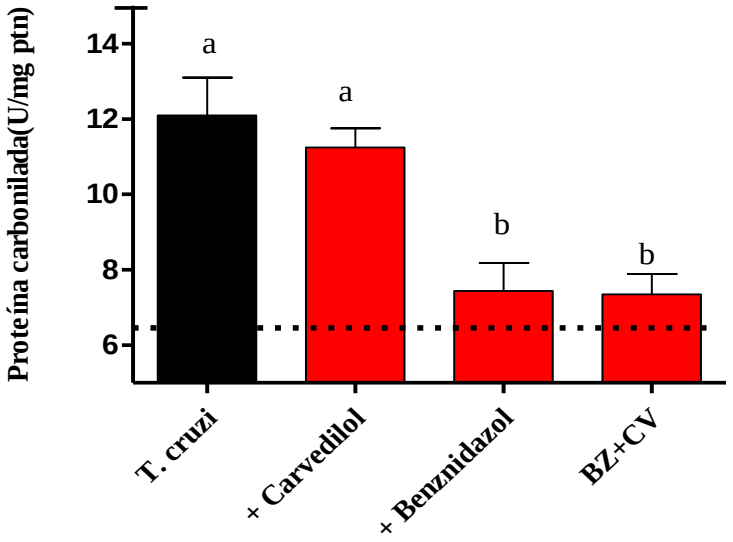


Figura 10: Atividade das enzimas antioxidantes (A) Superóxido Dismutase (SOD), e Catalase (CAT) (B) em tecido cardíaco de camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6 infectados ou não com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho. *A atividade da CAT e da SOD foram avaliadas por teste bioquímico específico. Dados são expressos como a média ± desvio padrão, * indica diferença estatística dos grupos infectados não tratados e infectado tratado com CV em relação ao controle não infectdo, com p<0,05. A linha tracejada indica a atividade dessas enzimas antioxidantes em animais não infectados.*

Já em relação aos marcadores de dano oxidativo, ao analisar os dados referentes à proteínas carboniladas, notou-se que o grupo de animais infectados não tratados e animais que receberam a monoterapia com o fármaco CV apresentaram maior índice de dano oxidativo de proteínas, exibindo diferença estatística quando comparados aos grupos infectados tratados com a monoterapia BZ, com a associação BZ+CV, e grupo controle não infectado. Um perfil diferente pode ser verificado quando analisamos os

níveis de TBARS (Figura 11B) entre os diferentes grupos, pois observamos não haver diferença estatística entre os grupos infectados que receberam intervenção terapêutica. Porém, os grupos que receberam tratamento se diferem de forma significativa dos animais que pertencem ao grupo controle não infectado. De uma maneira similar, ao que foi demonstrado na análise da proteína carbonilada (Figura 11A), o grupo infectado não tratado exibiu um maior índice de peroxidação lipídica quando comparado aos demais grupos infectado/tratados ou controle/não infectado.



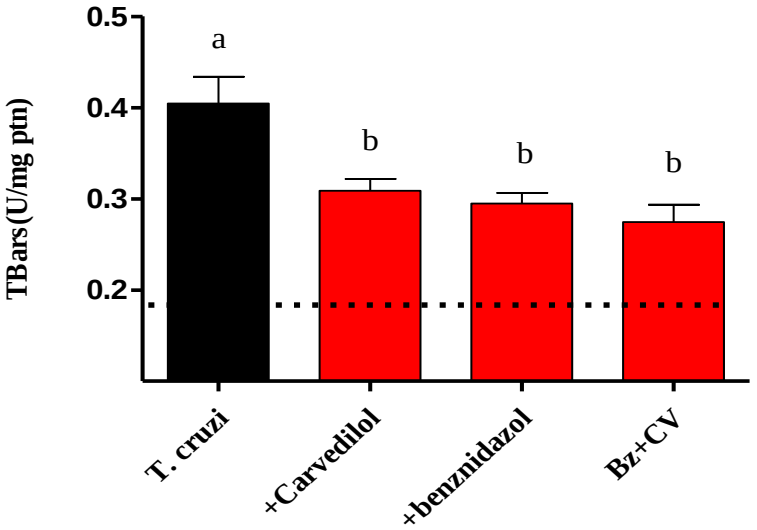


Figura 10. Marcadores de dano oxidativo (A) Proteínas carboniladas (PC) e (B) Peroxidação lipídica (TBARS) em tecido cardíaco de camundongos pertencentes à linhagem C57BL/6 infectados ou não com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, submetidos ou não aos tratamentos propostos nesse trabalho. *A atividade da PC e TBARS foram avaliadas por teste bioquímico específico. Dados são expressos como a média ± desvio padrão (n = 5 por grupo), onde letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos de animais infectados com p<0,05. A linha tracejada indica a atividade dessas enzimas em animais não infectados.*

5.0. DISCUSSÃO

O CV é um antagonista adrenérgico prescrito para o tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca congestiva. Porém, nos dias de hoje pesquisadores têm mostrado que este fármaco também é capaz de modular a resposta imune, interferindo na produção sérica de alguns marcadores inflamatórios (Pauschigueret et al., 2004; Nessler et al., 2008). No presente estudo, demonstramos que o CV administrado diariamente em concomitância com a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos C57BL6 foi capaz, num período inferior a 30 dias, de elevar o nível de parasitos circulantes e da produção plasmática de quimiocinas inflamatórias, como CCL2 e CCL5, bem como o recrutamento leucocitário para o sítio cardíaco. Por outro lado, a intervenção reduziu sobrevida dos animais tratados e a produção plasmática do TNF, citocina inflamatória com papel relevante para o processo inflamatório inicial.

Há inúmeros relatos dos benefícios gerados pelo uso em longo prazo desse fármaco, porém, o tratamento inicial com este betabloqueador requer cautela devido aos efeitos prejudiciais relacionados à sua dosagem, sendo necessário iniciar o tratamento com dosagens menores, e aumentar gradualmente ao longo do tempo (Taneva et al., 2016). Neste trabalho, utilizamos a dose de 25mg, dosagem alvo demonstrada na literatura e recomendada para tratamentos de hipertensão essencial, angina de peito e insuficiência cardíaca, com resultados satisfatórios em humanos (Frishman, 1998; Weiss et al., 1998). Esta mesma dosagem, é relatada para avaliação do efeito imunomodulatório em modelo experimental (cães e ratos) em cardiopatias de diferentes etiologias (Wendt, 2007; Mctavish et al., 2012).

Existem poucos trabalhos na literatura envolvendo a administração de CV no tratamento de modelos experimentais. Pimentel et al (2012), já retrataram que o tratamento com este fármaco é capaz de aumentar a sobrevida de hamsters sírio,

infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, em fase aguda de infecção; estudos utilizando outros betabloqueadores (ex. atenolol e propranolol) também já denotaram um aumento na sobrevida de animais alusivos à linhagem Swiss e Balb/c, infectados pelas cepas Y e CA-1 respectivamente, do *T. cruzi*, além de exibirem redução do parasitismo no tecido muscular cardíaco (Fernández et al., 1998; Sterin- Borda et al., 1999). Um grande número de citocinas pró- inflamatórias estão aumentadas em indivíduos cardiopatas (Matsumura et al., 2002). Neste contexto, o CV, também demonstra atuar na redução sérica dessas citocinas, como TNF e IL-6, sugerindo melhoras no prognóstico clínico em modelos experimentais portadores de disfunções cardíacas de diferentes etiologias e em ratos com colite ulcerativa (Mizuochi etal., 2007; Li et al., 2005; Kurum et al., 2007; Tatli et al., 2008; Fatani et al., 2015); um estudo de Botoni et al (2007), já evidenciou os efeitos pleiotrópicos desse fármaco quando administrado em pacientes portadores de CCC, onde uma redução na concentração sérica do TNF e da quimiocina CCL5, sugeriu melhoras na fração de ejeção do ventrículo esquerdo nesses pacientes.

Desse modo, ao avaliar a concentração sérica do TNF neste estudo, notou-se uma redução no grupo que recebeu o tratamento com o CV, quando comparado às outras intervenções terapêuticas. Este dado, corrobora com achados de outros trabalhos que avaliaram a sua concentração plasmática frente à cardiopatias de diferentes etiologias. Por outro lado, sabe-se que durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, a resposta inflamatória gerada é imprescindível para definir o prognóstico clínico/patológico do hospedeiro infectado. Assim, é sabido que tanto o TNF, quanto IFN-gama e IL-12, são essenciais para o controle da replicação desse protozoário, principalmente via ativação de células mononucleares produtoras de óxido nítrico (Vespa et al., 1994; Aliberti et al., 1996; Talvani et al., 2000). Estudos em camundongos TNF KO, demonstraram que estes animais se tornaram extremamente susceptíveis à

infecção pelo *T. cruzi*, reforçando a importância da produção desse marcador inflamatório para o controle de parasitos na circulação (Campos & Gazzinelli 2004; Dutra et al., 2014). Sendo assim, a utilização do fármaco CV no início do processo inflamatório induzido pelo *T. cruzi*, em modelo animal, fosse mais promissora numa etapa tardia da infecção visto que esta citocina está intimamente associada ao desenvolvimento de lesões cardíacas em pacientes portadores de CCC, com uma produção periférica predominante deste marcador quando comparado à pacientes indeterminados ou assintomáticos da doença (Talvani & Teixeira et al., 2011; Keating et al., 2015). Por outro lado, não se poderia desmerecer seu potencial papel na fase inicial da infecção por este protozoário onde os principais eventos inflamatórios estão ocorrendo em concomitância à sua acelerada replicação. Ainda que no presente estudo tenhamos visto uma resposta pró-inflamatória intensificada em presença da terapia aguda com o CV, desconhecemos o curso clínico destes animais após 90 ou 100 dias de vida. E ainda, não podemos ignorar que as variabilidades por trás da genética do hospedeiro utilizado ou mesmo do parasito empregado neste estudo podem atuar como fatores determinantes para os resultados encontrados.

Levando em consideração esta nova gama de fatores direcionadores da evolução da infecção, observou-se que a taxa de mortalidade do grupo que recebeu o CV também se apresentou maior, contrário ao observado em outros trabalhos que relataram uma melhora na sobrevida de animais tratados com este fármaco em fase aguda (Pimentel et al., 2012). Sabe-se, que o *T. cruzi* apresenta uma alta variabilidade genética, sendo classificado em 6 diferentes DTU's (*Discrete typing Units*), denominados TcI- TcVI (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2011). A cepa Colombiana, utilizada nesse trabalho, pertence ao grupo *T. cruzi* I (DTU I), resistente ao fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas (BZ) e apresentando tropismo cardíaco. Possivelmente

estas características genéticas intrínsecas ao parasito aliadas à resposta imune do hospedeiro (roedor) exerceu enorme influência sobre o curso da infecção. Sendo assim, a ausência de fatores regulatórios, ou a persistência do estímulo induzido pelo aumento de parasitos circulantes em animais infectados e tratados com o betabloqueador, podem ter culminado no aumento das quimiocinas inflamatórias CCL2 e CCL5 e na não alteração da citocina regulatória IL-10. As quimiocinas se inserem neste contexto apresentado papel essencial no recrutamento celular para o sítio inflamatório, sendo comumente associadas à infecção pelo *T. cruzi* (Talvani et al., 2000). A CCL2, além de secretada por uma grande variedade celular, torna-se essencial para o recrutamento de monócitos em diversos tecidos, especialmente o cardíaco (Talvani et al., 2004; Paiva et al., 2009). Porém, em altas concentrações foi previamente evidenciada no plasma de indivíduos chagásicos, correlacionada com diferentes graus de disfunção cardíaca (Talvani et al. 2004a). Dito isso, o aumento no número de parasitos circulantes associados ao grupo tratado com o CV talvez atue como estímulo para maior produção da quimiocina CCL2, objetivando maior recrutamento leucocitário, no intuito de eliminar o protozoário. Outro aspecto interessante, é que sua alta concentração plasmática foi correlacionada com indícios de disfunção miocárdica, tornando-se responsável pela geração de miocardites, através da retenção de leucócitos no sítio de infecção, o que posteriormente pôde conduzir à destruição tecidual (Paiva et al., 2009). Desta forma, sua alta produção neste grupo, paradoxalmente pode, também, estar associada à maior mortalidade observada.

Da mesma forma, a quimiocina CCL5/RANTES também possui participação reconhecida no processo de recrutamento leucocitário para os sítios de inflamação (Sullivan et al., 2011). Botoni e colaboradores (2007) demonstraram que a associação dos inibidores da ECA (enalapril) seguida de betabloqueadores adrenérgicos (CV)

apresentou uma redução sérica dessa quimiocina (CCL5) e do peptídeo natriurético (BNP) em indivíduos com cardiopatia chagásica crônica, sugerindo melhora na função cardíaca e no *status* clínico dos avaliados. Em contrapartida ao estudo clínico mencionado, em nosso estudo observamos que a monoterapia com o betabloqueador não foi capaz de reduzir a concentração plasmática da CCL5, mantendo-a elevada com concentração sérica semelhante à observada nos animais pertencentes ao grupo controle infectado que não recebeu nenhuma das intervenções terapêuticas propostas nesse estudo. Apesar de contribuir para o controle da replicação parasitária em fase recente de infecção, esta quimiocina também está associada a processos de disfunção cardíaca em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* (Talvani et al. 2004b). Vale ressaltar que neste trabalho a terapia com o benznidazol foi utilizada como tratamento controle positivo por ser considerado o único fármaco disponível para tratamento da doença de Chagas em países da América latina. Assim, os resultados obtidos através de sua utilização corroboram com outros estudos do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa que demonstraram uma redução do processo inflamatório associado à terapia do BZ em modelo experimental, sendo capaz de igualar todos os parâmetros avaliados aos animais não infectados. Em particular, a cepa Colombiana utilizada nesse estudo apresenta resistência a este fármaco, mas seu papel como modulador parcial das vias inflamatórias têm ganhado notório conhecimento nos últimos anos, fato que justificaria a redução da concentração plasmática dos marcadores inflamatórios avaliados e uma consequente preservação do tecido cardíaco (Penitente et al., 2015).

Com relação ao infiltrado inflamatório, destaca-se a infiltração maciça de células inflamatórias no tecido muscular cardíaco em animais tratados em monoterapia com CV, quando comparado ao grupo de animais do grupo controle infectado. Esses resultados se justificam, uma vez que a cepa Colombiana apresenta tropismo cardíaco e

de musculatura esquelética, exibindo grande inflamação tecidual, capaz de conduzir o hospedeiro vertebrado a altas taxas de mortalidade (Talvani et al, 2000; Paula-Costa et al, 2010). Borges e colaboradores (2009) demonstram resultados semelhantes ao analisar o infiltrado inflamatório de camundongos C57BL/6 infectados com esta cepa, quando comparando a outras estirpes do *T. cruzi* presentes no mesmo estudo, mostrando através de seus resultados uma inflamação de maior intensidade e maior taxa de mortalidade nos animais infectados com a Colombiana; com processo inflamatório mais intenso relatado no 20°, 23° e 30 dias de infecção (Magalhães et al., 1991). Além disso, o estudo de Borges e al (2009) já mostrou que uma alta concentração sérica de CCL2 pode estar correlacionada a um aumento de infiltrado inflamatório do tipo focal no tecido muscular cardíaco, corroborando com os achado observado neste estudo no grupo que recebeu a intervenção com betabloqueador. Desta maneira, a utilização desta cepa, aliada à alta produção plasmática de quimiocinas no grupo tratado com o betabloqueador, podem ter conduzido a um aumento do infiltrado inflamatório observado no grupo tratado com CV.

Finalmente, o estresse oxidativo, encontra-se envolvido no desenvolvimento de uma série de doenças inflamatórias (Pérez- Fuentes et al., 2002), e embora não esteja ainda elucidado, estudos têm mostrado que o fármaco CV possui propriedades antioxidantes, e isso se dá principalmente à sua estrutura carbazol, e metabólitos hidroxilados presentes em sua molécula; esses metabólitos gerados conferem a ele capacidade antioxidante ainda maior quando comparados ao próprio CV (Budni et al., 2009). No presente estudo, observamos que o TBARS, um marcador de dano oxidativo, apresentou-se reduzido no grupo que recebeu o tratamento com o fármaco CV, igualando-se aos grupos que receberam tratamento com benznidazol e/ou associação e ao grupo controle não infectado. O potencial antioxidante desse fármaco pode estar

associado à sua capacidade de se ligar ao Fe (III) e Cu (II), impedindo a oxidação de lipídios e proteínas mediada por esses metais de transição, o que poderia explicar a diminuição dos biomarcadores de danos em lipídios (TBARS) (Budni et al., 2009), no entanto não demonstrou atuar sobre as concentrações dos marcadores de danos a proteínas. Este fármaco também não demonstrou atuar sobre a produção das enzimas antioxidantes SOD e Catalase, contrapondo-se à trabalhos como o de Budni et al (2009), onde o CV foi capaz de aumentar a produção desses antioxidantes mediante a infecção pelo *T. cruzi*, e por consequência a proteção celular. Dessa maneira, o CV administrado durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, não se demonstrou eficaz em atenuar o estresse oxidativo gerado.

Sumarizando, a monoterapia com o fármaco CV, demonstrou atuar sobre a resposta inflamatória de animais C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana, porém a intervenção sugere prejuízos ao hospedeiro, não se demonstrando efetiva na redução do parasitismo sanguíneo. Além disso, a redução do marcador plasmático TNF, concomitante ao aumento das quimiocinas CCL2 e CCL5, parece ter contribuído para o aumento do recrutamento leucocitário para o tecido muscular cardíaco, bem como uma atuação não eficaz nos marcadores de danos oxidativos e produção de enzimas antioxidantes durante a fase aguda da infecção experimental por este protozoário.

6.0. CONCLUSÃO

O CV apresentou papel imunomodulador frente a infecção pelo *T. cruzi* porém, quando administrado durante a fase inicial da infecção, refletiu em não controle do parasitismo sanguíneo, aumento da resposta inflamatória sistêmica e aumento da taxa de mortalidade nos animais infectados.

7.0. REFERÊNCIAS

Aliberti, J.C.; Cardoso, M.A.; 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. Infect Immun. 64(6):1961-7. 1996

Apt, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Design, Development and Therapy. 4:243-253. 2010.

Aufderheide, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F.; Allison, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101(7), 2034-2039. 2004.

Ba, X.; Gupta, S.; Davidson, M.;Garg, N.J.Trypanosoma cruzi induces ROS-PARP-1-RelA pathway for up regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. J Biol Chem 285: 11596–11606. 2009.

Bafica, A.; Santiago, H. C.; Goldszmid, R.; Ropert, C.; Gazzinelli R.T.; Sher, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 177:3515-3519. 2006.

Batlouni, M.: Albuquerque, D. C. Bloqueadores beta-adrenérgicos na IC. Arq Bras Cardiol. 75, (nº 4), 2000.

Benziger, C. P.; Ribeiro, A. L. P.; Narula, J. After 100 years, the diagnosis, treatment, and control of Chagas disease remains a challenge. Glob Heart. 10(3), 137-8. 2015.

Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J. P.; Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta tropica. 156, 1-16. 2016.

Bortolotto, L. A.; Consolim-Colombo, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. Rev Bras Hipertens. 16(4):215-220, 2009.

Botoni F. A.; Poole-Wilson P. A.; Ribeiro A. L.; Okonko D. O.; Oliveira B. M.; Pinto A. S.; Teixeira M. M.; Teixeira A. L.; Reis A. M.; Dantas J. B.; Ferreira C. S.; Tavares W. C.; Rocha M. O. A randomized trial of CV after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. Am Heart J. 153:544.e1-8. 2007.

Botoni, F. A.; Ribeiro, A. L. P.; Marinho, C. C.; Lima, M. M. O.; Nunes, M. D. C. P.; Rocha, M. O. C. Treatment of Chagas cardiomyopathy. Bio Med research international, 2013.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop*. 4: 389-396. 1962.

Brigelius-Flohe, R. Commentary: oxidative stress reconsidered. Genes Nutr. 4:161–163. 2009.

Budni, P.; Pedrosa, R. C.; Dalmarco, E. M.; Dalmarco, J. B.; Frode, T. S.; Wilhelm Filho, D. CV enhances the antioxidant effect of vitamins E and C in chronic Chagas heart disease. Arquivos brasileiros de cardiologia. 101(4), 304-310. 2013.

Budni, P.; Pedrosa, R. C.; Garlet, T. R.; Dalmarco, E. M;, Dalmarco, J. B.; Lino, M. R. D. O.; Simionato E. L.; Amara J. A.; Frode T. S.; Wilhelm Filho, D. CV attenuates oxidative Estresse in chronic Chagasic cardiomyopathy. Arquivos brasileiros de cardiologia, 98(3), 218-224. 2012.

Campos, M.A.; Gazzinelli, R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. Mediators Inflamm., 13: 139-43. 2004

Carabarin-Lima, A.; González-Vázquez, M. C.; Rodríguez-Morales, O. et al. Chagas disease (American Trypanosomiasis) in Mexico: an update. Acta Tropica. 127, 2:126–135. 2013.

Cardoni, R.L., Rottenberg, M.E., Segura, E.L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. Cell Immunol. 128, 11–21. 1990.

Cardoso, M. S.; Reis-Cunha, J. L.; Bartholomeu, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. Frontiers in immunology. 6. 2016.

Chagas, C. Nova Tripanozomíase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotripanum cruzi. n. gen., n. SP. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1:159-218. 1909.

Conners, E. E.; Vinetz, J. M.; Weeks, J. R.; Brouwer, K. C. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. Acta tropica, 156, 68-78. 2016.

Corassa, R. B.; Aceijas, C.; Alves, P. A. B.; Garelick, H. Evolution of Chagas disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. Perspectives in Public Health. 1757913916671160. 2016.

Coura, J. R.; Dias, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104, 31-40. 2009

Coura, J. R; Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica. 115, 5-13. 2010.

Coura, J. R. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 46(4), 389-390. 2013.

De caterina, A. R.; Leone, A. M. Why β-blockers should not be used as first choice in uncomplicated hypertension. The American journal of cardiology, 105(10), 1433-1438. 2010.

De Oliveira, T. B.; Pedrosa, R. C.; Filho D. W. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. Int J Cardiol. 116: 357–363. 2007.

De Oliveira, A. P.; Ayo, C. M.; Mimura, K. K. O.; Oliani, S. M.; Bernardo, C. R.; Camargo, A. V.; Ronchi, L. S.; Borim, A. A.; Campos, D. E.; Júnior, E,; Brandão, D. E.; Mattos, C. C.; Castiglioni, L.; Bestetti, R. B.; Cavasini, C. E.; De mattos L. C. Plasma concentrations of CCL3 and CCL4 in the cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease. Cytokine, 91, 51-56. 2017.

Desoky, E.; Ehab, S. ‘’Drug Therapy of Heart Failure: An Immunologic View,’’ American Journal of Therapeutics, vol. 18, no. 5, pp. 416- 425, 2011

Dinicolantonio, J. J.: Hackam, D. G. CV: a third-generation β-blocker should be a first-choice β-blocker. Expert review of cardiovascular therapy, 10(1), 13-25. 2012.

Dinicolantonio, J. J.; Fares, H.; Niazi, A. K.; Chatterjee, S.; D'ascenzo, F.; Cerrato, E.; Biondi-zoccai, G.; Lavie, C. J.; Bell, D. S.; O'keefe, J. H. β-Blockers in hypertension, diabetes, heart failure and acute myocardial infarction: a review of the literature. Open Heart, 2(1), e000230. 2015.

Dixon, R. A.: Sigal, I. S.; Rands, E.; Register, R. B.; Candelore, M. R.; Blake, A. D.; Strader, C. D. Ligand binding to the β-adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. Nature, 326(6108), 73-77. 1987.

Docampo, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol. 73: 1–27. 1990

Dulin, B.; Abraham, W. T. Pharmacology of CV. The American journal of cardiology, 93(9), 3-6. 2004.

Dutra, W. O.; Gollob, K. J.; Pinto-Dias, J. C.; et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with Trypanosoma cruzi chronic infection. Scand J Immunol. 45: 74-80. 1997.

Dutra, W. O.; Gollob, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Current opinion in infectious diseases. 21(3), 287. 2008.

Fatani, A. J.; Al-hosaini, K. A.; Ahmed, M. M.; Abuohashish, H. M.; Parmar, M. Y.; Al-rejaie, S. S. CV Attenuates Inflammatory Biomarkers and Oxidative EEstressee in a Rat Model of Ulcerative colitis. Drug development research, 76(4), 204-214. 2015.

Fernández, R.; Enders, J.; Rivarola, W.; Palma, J.; Paglini, P. Experimental Chagas' disease: effects of propanolol upon cardiac beta-receptors. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 48(2):93-8. 1998

Feuerstein, G. Z.; Bril, A.; Ruffolo, R. R. Protective effects of CV in the myocardium. The American journal of cardiology. 80(11), 41L-45L. 1997.

Flávia Nardy, A.; Freire-De-Lima, C. G.; Morrot, A. Immune evasion strategies of Trypanosoma cruzi. Journal of immunology research. 2015.

Garcia, M. N.; Hernandez, D.; Gorchakov, R.; Murray, K. O.; Hotez, P. J. The 1899 United States kissing bug epidemic. PLoS Negl Trop Dis, 9(12), e0004117. 2015.

Gerson, M. C.; Craft, L. L.; Mcguire, N.; Suresh, D. P.; Abraham, W. T.; Wagoner, L. E. CV improves left ventricular function in heart failure patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and a wide range of sympathetic nervous system function as measured by iodine 123 metaiodobenzylguanidine. Journal of nuclear cardiology, 9(6), 608. 2002.

Guedes, P. M. M.; De andrade, C. M.; Nunes, D. F.; DE Sena, N.; Queiroga, T. B. D.; Machado-coelho, G. L. L.; Nascimento M. S.; Do-valle-matta M. A.; DA Câmara A. C.; Chiari E.; Galvao, L. M. Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 10(4), e0004669. 2016.

Gomes, Y. M.; Pereira, V. R.; Nakazawa, M.; Rosa, D. S.; Barros, M. D. N. D.; Ferreira, A. G.; Goldenberg, S. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96(4), 497-501. 2001.

Gupta, S.; Bhatia, V.; Wen, J.J.; Wu, Y.; Huang M. H. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. Free Radic Biol Med 47: 1414–1421. 2009**.**

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. 31:673-685. 2009.

Hemmige, V.; Tanowitz, H.; Sethi, A. Trypanosoma cruzi infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. International journal of dermatology, 51(5), 501-508. 2012.

Issa, V.S.; Ayub-Ferreira, S.M.; Lage, M.T.; Oliveira, Jr.; Nicolau, J.; Bocchi, E.A. Therapeutical Implications of Clinical Characteristics of Patients With Chagas Cardiomyopathy and Decompensated Heart Failure. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 34: 4. 2015.

Keenan, M.; Chaplin, J.H. A new era for chagas disease drug discovery? Prog Med Chem. 2015;54:185-230. 2015.

Kurum, T.; Tatli, E.; Yuskel, M. Effects of CV on plasma levels of pro inflammatory cytokines in patients with dilated ichemic and noninschemic dilated cardiomyopathy. Tex Heart Inst J. 34(1):52-9. 2007

Lands, A. M.; Ludnena, F. R.; Buffo, H. Y. Differentiation of receptors responsive to Isoporoterenal. Life Sci., 6, 2241. 1967.

Leonetti, G.; Egan, C. G. ‘’ Use of CV in hypertension: an update,’’ Vascular Health and Risk Management. 8, 307–322. 2012.

Lin, P. Y.; Shen, H. C.; Chen, C. J.; Wu, S. E.; Kao, H. L.; Huang, J. H.; Wang D. L.; Chen, S. C. The inhibition in tumor necrosis factor-α-induced attenuation in endothelial thrombomodulin expression by CV is mediated by nuclear factor-κB and reactive oxygen species. Journal of thrombosis and thrombolysis, 29(1), 52. 2010.

Maçao, L. B.; Wilhelm, F. D.; Pedrosa, R. C.; Pereira, A.; Backes, P.; Torres, M. A.; et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. Int J Cardiol. 15: 43-49, 2007.

Machado, F. S.; Koyama, N. S.; Carregaro, V.; Ferreira, B. R.; Milanezi, C. M.; Teixeira, M. M.; Rossi, M. A.; Silva, J. S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with Trypanosoma cruzi. J.Infect.Dis. 191:627-636. 2005.

Machado, F. S.; Tanowitz, H. B.; Ribeiro, A. L. Pathogenesis of Chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative estresse. 2013.

Magalhães, J.B.; Andrade, S.G. Behavior of Trypanosoma cruzi strains after passage in different triatominae species. Rev Soc Bras Med Trop.24(4):209-16. 1991.

Magalhães, L. M.; Viana, A.; Chiari, E.; Galvão, L. M.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of Trypanosoma cruzi. PLoS Negl Trop Dis, 9(7), e0003816. 2015.

Malik, L. H.; Singh, G. D.; Amsterdam, E. A. Chagas heart disease: An update. The American journal of medicine. 128(11), 1251-e7. 2015.

Marin-Neto, J. A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B. C.; Simões, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. Circulation. 115:1109-1123, 2007.

Miranda, C. P.; Botoni, F. A.; Rocha, M. O. D. C. Immunopharmacological approach of CV in chronic Chagas heart disease. Arquivos brasileiros de cardiologia, 103(4), 358-358. 2014.

Montgomery, S. P.; Parise, M. E.; Dotson, E. M.; Bialek, S. R. What Do We Know About Chagas Disease in the United States? The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 95(6), 1225-1227. 2016.

Moreno, M.; D'avila, D. A.; Silva, M. N.; Galvão, L. M.; Macedo, A. M.; Chiari, E.; Gontijo, E. D.; Zingales, B. Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. Mem.Inst.Oswaldo Cruz. 105:918-924. 2010.

Morillo, C. A.; Marin- Neto, A; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas Cardiomyopathy. The New England Journal of Medicine. 373, 14: 1295-306.

Nessler, J.; Nessler, B.; Kitliński, M.; Stepniewski, M.; Piwowarska, W. Restrictive left ventricular filling pattern and its effect on the clinical course of systolic heart failure in patients receiving CV. Cardiol J, 15(4), 329-37. 2008.

Neto, M. A.; Rascado, R. R.; Bendhack L. M. Receptores β-adrenérgicos no sistema cardiovascular. Medicina, Ribeirão Preto, X Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular 39 (1): 3-12, jan./mar. 2006.

Ohtsuka, T.; Hamada, M.; Hiasa, G.; Sasaki, O.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Shigematsu, Y.; Hiwada, K. Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology, 37(2), 412-417. 2001.

Paiva, C.N.; Figueiredo, R.T.; Kroll-Palhares, K.; Silva, A.A.; Silvério, J.C.; Gibaldi, D.; Pyrrho, A.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. 86(5):1239-46. 2009.

Paula-Costa, G., Silva, R.R., Pedrosa, M.C., Pinho, V., de Lima, W.G., Teixeira, M.M., et al. Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-Trypanosoma cruzi activity during acute phase of experimental Chagas disease. Parasite Immunol. 32, 202–208, 2010.

PAUSCHINGER et al. CV improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. Eur J Heart Fail. 7: 444-52. 2005.

Penitente, A.R.; Junqueira-Leite, A.L.; Paula-Costa, G.; Shrestha, D.; Horta, A.L.; Natali, A.J.; Neves, C.A.; Talvani, A. Enalapril in combination with Benznidazole reduces heart inflammation and creatine kinases in mice chronically infected with the *Trypanosoma cruzi.* Am J Trop Med Hyg. 93:976-82. 2015.

Pérez-Molina, J. A.; Perez A. M.; Norman, F. F.; Monge-Maillo, B.; López-vélez, R. Old and new challenges in Chagas disease. Lancet Infect Dis. 15, 1347–56. 2015.

Péres-Fuentes, R.; Juegan, J. F.; Barnabé, C.; et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. Inter J Parasitol. 33: 293-299. 2003.

Piaggio, E.; Roggero, E.; Pitashny, M.; Wietzerbin, J.; Bottasso, O. A.; Revelli, S. S. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on Trypanosoma cruzi-infected rats. Parasitology research, 87(7), 539-547. 2001.

Pimentel et al. The effect of beta-blockade on myocardial remodelling in Chagas' cardiomyopathy. Clinics (São Paulo). 67: 1063-1069. 2012.

Pinazo, M. J.; Thomas, M. C.; Bustamante, J.; Almeida, I. C. D.; Lopez, M. C.; Gascon, J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 110(3), 422-432. 2015.

Prabhu, S. D.; Chandrasekar, B.; Murray, D. R.; Freeman, G. L. β-Adrenergic Blockade in Developing Heart Failure. Circulation, 101(17), 2103-2109. 2000..

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Rev. 1, 92-100. 2001.

Rocha E Silva, M. A brief survey of the history of inflammation. Agents Actions 43, 86–90. 1978

Roffê, E.; Rothfuchs, A.G.; Santiago, H.C.; Marino, A.P.; Ribeiro-Gomes, F.L.; Eckhaus, M.; Antonelli, L.R. Murphy, P.M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection. J Immunol. 188(2):649-60. 2015.

Romanã C. Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina. Publication no. 22, 17-28, 1935.

Rössig, L.; Haendeler, J.; Mallat, Z.; Hugel, B.; Freyssinet, J. M.; Tedgui, A.; Dimmeler S.; Zeiher, A. M. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of CV. Journal of the American College of Cardiology, 36(7), 2081-2089. 2000.

Salomon, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to Nifurtimox and Benznidazole delivery systems. Journal of Pharmaceutical Sciences. 101, 888-894. 2011.

Santos, F. M.: Lima, W. G.: Gravel, A. S.: Martins, T. A.: Talvani, A.: Torres, R. M.: Bahia, M. T. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. Journal of antimicrobial chemotherapy, 67(8), 1987-1995. 2012.

Schirmer, R.H., Schollhammer, T., Eisenbrand, G., Krauth-Siegel, R.L. Oxidative stress as a defence mechanism against parasitic infections. Free Radic. Res. Commun. 3: 3–12. 1987

Sies, H. Oxidative EEstressee: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 82: 291–295. 1997

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, 107(4), 513-521. 2012.

Stanaway, J. D.; Roth, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. Global Heart, 10(3), 139-144. 2015.

Sullivan, N.L.; Eickhoff, C.S.; Zhang, X.; Giddings, O.K.; Lane, T.E.; Hoft, D.F. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal Trypanosoma cruzi protection and B cell activation. J Immunol.187(3):1358-68. 2011

Talvani, A.; Ribeiro, C. S.; Aliberti, J. C.; Michailowsky, V.; Santos, P. V.; Murta, S. M.; Silva, J. S. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. Microbes and Infection. 2(8), 851-866. 2000.

Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. 2004a. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis. 38: 943-950.

Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. 2004b. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. J Infect Dis. 189: 214-220

Talvani, A.; Teixeira, M. M. Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. Advances in parasitology. 76, 171. 2011.

Taneva, B.; Caparoska, D. The Impact of Treatment with Beta-Blockers upon Mortality in Chronic Heart Failure Patients. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 4(1), 94. 2016

Tanowitz, H. B.; Machado, F. S.; Spray, D. C.; Friedman, J. M.; Weiss, O. S.; Lora, J. N.; Nagajyothi, J.; Garg, D. N.; Nunes , M. C. P.; Ribeiro, A. L. P. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. Expert review of cardiovascular therapy. 13(12), 1393-1409. 2015.

Tatli**,** E.; Kurum, T.; Aktoz, M.; Buyuklu, M. Effects of CV on right ventricular ejection fraction and cytokines levels in patients with systolic heart failure. Int J Cardiol. 2008 Apr 10;125(2):273-6.

Teixeira, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Silva, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. Trends in parasitology, 18(6), 262-265. 2012..

Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitology. 19:495-501. 2003.

Vallejo, A.; Monge-maillo, B.; Gutiérrez, C.; Norman, F. F.; López-vélez, R.; Pérez-Molina, J. A. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. Acta tropica. 164, 117-124. 2016.

Vanhoutte, P. M.; Gao, Y. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. Current opinion in pharmacology, 13(2), 265-273. 2013.

Ventura-Garcia, L.; Roura, M.; Pell, C.; Posada, E.; Gascón, J.; Aldasoro, E.; Munhoz, J.; Pool, R. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. PLoS Negl Trop Dis. 7(9), e2410. 2013.

Vespa, G.N.; Cunha, F.Q.; Silva, J.S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. Nov;62(11):5177-82. 1994

Viotti, R.; Vigliano, C.; Armenti, H.; Segura, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J. 127, 151-162. 1994.

Weiss, R.; Ferry, D.; Pickering, E.; Smith, L.K.; Dennish, G.; Krug-Gourley, S.; Lukas, M.A. Effectiveness of three different doses of CV for exertional angina. CV-Angina Study Group. Am J Cardiol. 15;82(8):927-31. 1998.

Wen, J.J.; Garg, G. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection. Free Radic Biol Med. 37:2072–81. 2004.

WHO. "Chagas disease (American trypanosomiasis)". Fact sheet N°340. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/. 2015.

Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R. S. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz.104, 7: 1051-1054. 2009.

Zingales, B.; Miles, M.A.; Campbell D.A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A.M.; Teixeira M.M.; Schijman, A.G.; Llewellyn, M.S.; Lages-Silva, E.; Machado, C.R.; Andrade S.G.; Sturm, N.R. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 12(2):240-53. 2011.

8.0. ANEXOS

8.1. Artigo 1: Potential role of CV on the cardiac immune response induced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*.

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2017, Article ID 9205062, 7 pages
http://doi.org/10.1155/2017/9205062

Research Article

Potential Role of Carvedilol in the Cardiac Immune Response Induced by Experimental Infection with *Trypanosoma cruzi*

Aline Luciano Horta,[1] Ana Luisa Junqueira Leite,[1] G. Paula Costa,[1] Vivian Paulino Figueiredo,[1] and André Talvani[1,2,3,4]

[1] *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*
[2] *Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*
[3] *Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*
[4] *Programa de Pós-Graduação em Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*

Correspondence should be addressed to Vivian Paulino Figueiredo; vivian_figueiredo@yahoo.com.br and André Talvani; talvani@nupeb.ufop.br

Received 4 November 2016; Revised 6 February 2017; Accepted 19 February 2017; Published 9 March 2017

Academic Editor: Graciela Russomando

Copyright © 2017 Aline Luciano Horta et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Trypanosoma cruzi causes a cardiac infection characterized by an inflammatory imbalance that could become the inciting factor of the illness. To this end, we evaluated the role of carvedilol, a beta-blocker with potential immunomodulatory properties, on the immune response in C57BL/6 mice infected with VL-10 strain of *T. cruzi* in the acute phase. Animals ($n = 40$) were grouped: (i) not infected, (ii) infected, (iii) infected + carvedilol, and (iv) not infected + carvedilol. We analyzed parameters related to parasitemia, plasma levels of TNF, IL-10, and CCL2, and cardiac histopathology after the administration of carvedilol for 30 days. We did not observe differences in the maximum peaks of parasitemia in the day of their detection among the groups. The plasma TNF was elevated at 60 days of infection in mice treated or not with carvedilol. However, we observed a decreased CCL2 level and increased IL-10 levels in those infected animals treated with carvedilol, which impacted the reduction of the inflammatory infiltration in cardiac tissue. For this experimental model, carvedilol therapy was not able to alter the levels of circulating parasites but modulates the pattern of CCL2 and IL-10 mediators when the VL10 strain of *T. cruzi* was used in C57BL6 mice.

8.2. Artigo 2 : Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic *Trypanosoma cruzi*-Infected Dogs.

Research Article

Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic *Trypanosoma cruzi*-Infected Dogs

Guilherme de Paula Costa,[1] Laís Roquete Lopes,[1] Maria Cláudia da Silva,[2] Aline Luciano Horta,[1] Washington Martins Pontes,[1] Cristiane M. Milanezi,[2] Paulo Marcos da Mata Guedes,[3] Wanderson Geraldo de Lima,[1,4] Richard Schulz,[5] João Santana da Silva,[2] and Andre Talvani[1,4,6]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*
[2]*Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil*
[3]*Universidade Federal do Rio Grande do Norte Federal, Natal, RN, Brazil*
[4]*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*
[5]*Departments of Pediatrics & Pharmacology, Cardiovascular Research Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada*
[6]*Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil*

Correspondence should be addressed to Andre Talvani; talvani@nupeb.ufop.br

Received 2 April 2016; Revised 14 July 2016; Accepted 4 August 2016

Academic Editor: Sandra Helena Penha Oliveira

Copyright © 2016 Guilherme de Paula Costa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Chemokines (CKs) and chemokine receptors (CKR) promote leukocyte recruitment into cardiac tissue infected by the *Trypanosoma cruzi*. This study investigated the long-term treatment with subantimicrobial doses of doxycycline (Dox) in association, or not, with benznidazole (Bz) on the expression of CK and CKR in cardiac tissue. Thirty mongrel dogs were infected, or not, with the Berenice-78 strain of *T. cruzi* and grouped according their treatments: (i) two months after infection, Dox (50 mg/kg) 2x/day for 12 months; (ii) nine months after infection, Bz (3,5 mg/Kg) 2x/day for 60 days; (iii) Dox + Bz; and (iv) vehicle. After 14 months of infection, hearts were excised and processed for qPCR analysis of Th1 (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, and CXCL11), Th2 (CCL1, CCL17, CCL24, and CCL26), Th17 (CCL20) CKs, Th1 (CCR5, CCR6, and CXCR3), and Th2/Th17 (CCR3, CCR4, and CCR8) CKR, as well as IL-17. *T. cruzi* infection increases CCL1, CCL2, CCL4, CCL5, CCL17, CXCL10, and CCR5 expression in the heart. Dox, Bz, or Dox + Bz treatments cause a reversal of CK and CKR and reduce the expression of CCL20, IL-17, CCR6, and CXCR3. Our data reveal an immune modulatory effect of Dox with Bz, during the chronic phase of infection suggesting a promising therapy for cardiac protection.

8.3. Artigo 3: Enalapril in combination with Benznidazole reduces heart inflammation and creatine kinases in mice chronically infected with the *Trypanosoma cruzi*.

Copyright © 2015 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene
doi:10.4269/ajtmh.15-0237

Am. J. Trop. Med. Hyg., 93(5), 2015, pp. 976–982
doi:10.4269/ajtmh.15-0237
Copyright © 2015 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*

Arlete Rita Penitente,† Ana Luísa Junqueira Leite,† Guilherme de Paula Costa, Deena Shrestha, Aline Luciano Horta, Antônio J. Natali, Clóvis A. Neves, and Andre Talvani*

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil; Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil; Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Abstract. The protozoan *Trypanosoma cruzi* triggers an inflammatory process in mammalian heart causing events such as fibrosis, changes in the architecture and functionality in this organ. Enalapril, an angiotensin II-converting enzyme inhibitor, is a drug prescribed to ameliorate this heart dysfunction, and appears to exert a potential role in immune system regulation. Our aim was to evaluate the chronic cardiac inflammatory parameters after therapeutic treatment with enalapril and benznidazole in C57BL/6 mice infected with the VL-10 strain of *T. cruzi*. After infection, animals were treated with oral doses of enalapril (25 mg/kg), benznidazole (100 mg/kg), or both during 30 days. Morphometric parameters and levels of chemokines (CCL2, CCL5), IL-10, creatine kinases (CKs), and C-reactive protein were evaluated in the heart and serum at the 120th day of infection. Enalapril alone or in combination with benznidazole did not change the number of circulating parasites, but reduced cardiac leukocyte recruitment and total collagen in the cardiac tissue. Interestingly, the combination therapy (enalapril/benznidazole) also reduced the levels of chemokines, CK and CK-MB, and C-reactive proteins in chronic phase. In conclusion, during the chronic experimental *T. cruzi* infection, the combination therapy using enalapril plus benznidazole potentiated their immunomodulatory effects, resulting in a low production of biomarkers of cardiac lesions.