



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB

Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas – CBIOL

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação - LABIIN



**Resposta inflamatória cardíaca e sistêmica em terapia de combinação
com inibidor da angiotensina II e Benznidazol durante a infecção
experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

ANA LUÍSA JUNQUEIRA LEITE

OURO PRETO- MG

2016

ANA LUÍSA JUNQUEIRA LEITE

**Resposta inflamatória cardíaca e sistêmica em terapia de combinação
com inibidor da angiotensina II e Benznidazol durante a infecção
experimental pelo *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. André Talvani

OURO PRETO- MG

Março de 2016

L533r

Leite, Ana Luísa Junqueira.

Resposta inflamatória cardíaca e sistêmica em terapia de combinação com inibidor da angiotensina II e Benznidazol durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Ana Luísa Junqueira Leite. - 2016.

IX, 75f.: il.: color; grafs.

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

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

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

CDU: 616.937



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

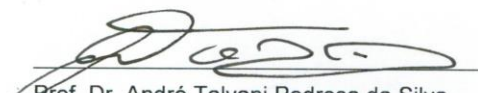
“Resposta inflamatória cardíaca e sistêmica em terapia de combinação com inibidor da angiotensina II e Benznidazol durante a infecção experimental pelo Trypanosoma Cruzi”,

Ao primeiro dia do mês de março de 2016, às 09:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Ana Luísa Junqueira Leite. 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:

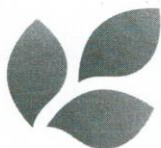

Prof.ª Dr.ª Marta de Lana
Examinadora (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Fabiana Simão Machado
Examinadora (UFMG)


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

DATA DA DEFESA: 01/03/2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela força, amparo, esperança e bênçãos em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, alicerces de minha formação, por todo amor, carinho, apoio, ensino, por não medirem esforços para que meus sonhos sejam alcançados. Não tenho palavras para expressar minha imensa gratidão. Este trabalho dedico à vocês assim como todas as minhas conquistas na vida. Sem o ensino advindo de vocês eu não seria o que sou hoje.

Ao Júlio pelo carinho, amor, compreensão, paciência e que mesmo sem entender nada do meu trabalho sempre esteve ao meu lado, incentivando-me, aguentando meus desesperos e trazendo-me paz.

Ao Professor André Talvani pela orientação repleta de ensinamentos, por toda confiança, credibilidade e por ser muito mais que um exímio orientador, um amigo. Obrigada por ter orientado não apenas a minha formação acadêmica e profissional, mas também pessoal.

À Professora Paula Melo de Abreu Vieira pela atenção, aprendizado, paciência e pela gentileza de estar sempre disposta a ajudar. Obrigada por colaborar conosco.

Ao Guilherme por todo aprendizado transmitido, amizade, auxílio e pela sua benevolência!

A todos os Prodígios do Talvani e colegas do LABIIN por tornarem o trabalho mais prazeroso, divertido e pela agradável convivência.

A todos os colegas do mestrado e do Laboratório de Doença de Chagas pela harmoniosa convivência.

À Ludmilla, uma grande irmã, pelo carinho, amizade, paciência e atenção em me escutar. Por todos os conselhos, por ser tão prestativa, tão amiga. Adoro você!

À UFOP pelo ensino gratuito e de qualidade e ao NUPEB pela oportunidade de cursar uma pós-graduação de qualidade.

Às agências financiadoras: CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP pelo fornecimento e cuidado com os animais.

Aos amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado, me dando forças e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* desencadeia um processo inflamatório promotor de alterações morfofisiológicas nas células cardíacas. Terapias farmacológicas têm sido propostas objetivando a redução desta resposta inflamatória e, conseqüentemente, dos danos cardíacos no hospedeiro infectado. Neste estudo, foram avaliadas as ações do inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) - Enalapril e do benznidazol (Bz), em monoterapia ou terapia de combinação (TC) durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectados com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* (VL-10) e tratados durante 20 dias com diferentes doses de Enalapril (25mg/Kg; 20mg/Kg e 15mg/Kg) ou Bz (100mg/Kg; 80mg/Kg e 60mg/Kg) ou Enalapril+Bz (100mg/Kg/25mg/Kg; 80mg/Kg/20mg/Kg; 60mg/Kg/15mg/Kg). A eutanásia ocorreu no 30° e 120° dia após a infecção, sendo o coração conservado para análise histopatológica e avaliação das atividades enzimáticas das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e o sangue/plasma destinado aos ensaios imunoenzimáticos (CCL2, CCL5, TNF, IL-10). A TC com o Enalapril e o Bz, administrada na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, mostrou-se promissora pela efetiva redução da parasitemia. A TC com 80mg/kg+20mg/kg foi capaz de elevar os níveis plasmáticos de IL-10 durante a fase aguda e mantê-los elevados na fase crônica. De uma forma geral, as TCs reduziram a produção plasmática de do TNF-alfa, CCL2 e CCL5 na fase aguda mantendo, em parte, este perfil durante a fase crônica. A TC não alterou a atividade das MMP-2 e MMP-9 na fase aguda e crônica, com exceção da combinação com 100+25mg/Kg, que resultou em um aumento da atividade da MMP-2 na fase crônica. Além disso, a TC reduziu o infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, e foi eficaz na redução da neoformação de colágeno neste tecido durante a fase crônica. Portanto, conclui-se que esta redução na inflamação plasmática e tecidual observada para as TCs pode levar a uma regulação parcial da inflamação resultando em redução dos danos cardíacos causados pela infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, enalapril, benznidazol, terapia de combinação, inflamação, metaloproteinases.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi infection triggers an inflammatory process capable to develop functional and morphometrical alterations in cardiac tissue. In an attempt to reduce this cardiac alteration, several pharmacological therapies (eg. inhibitors of angiotensin converting enzyme - ACE) have been proposed due their potential anti-inflammatory effects. In this study, we evaluated treatment with Enalapril (ACE inhibitor) and Benznidazole (Bz) in a single or in a combinatory therapies (CT) during acute and chronic phases of experimental *T.cruzi* infection. C57BL/6 mice were infected with VL-10 strain of *T.cruzi* and treated during 20 days with different dosages of Enalapril (15, 20, 25mg/kg), Bz (60, 80, 100mg/kg) and combinations of both (15+60;20+80;25+100mg/Kg). Serum and heart samples were processed to immunoassay (TNF, IL-10, CCL2/5), enzymatic activities of metalloproteinases (MMP-2/-9) and histopathology at the 30° and 120° days post infection. CT with Enalapril and Bz, administered in the acute phase of *T. cruzi*'s infection has shown promise for the effective reduction of parasitaemia. In general, we observed that CTs reduced plasma levels of TNF, IL-10, CCL2 and CCL5 in the acute phase of infection and, this same profile was mantained in the chronic one. CT does not alter the activity of MMP-2 and -9 in both phases of infection, exception to the MMP2 whose activity was elevated with the 100 + 25mg/kg therapy during the chronic phase. In addition, CT has reduced the inflammatory infiltration in the cardiac tissue in acute and chronic phases been effective in reducing the collagen's neogenesis in the latter phase of infection. In conclusion, we assume that treatment in combination using Enalapril and Bz may regulate the inflammatory process suggesting a potential protective effect against cardiac damages caused by experimental *T. cruzi* infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, enalapril, benznidazole, combination therapy, inflammation, metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de parasitemia de animais tratados ou não tratados com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). _____ 30
- Figura 2. TNF no plasma de animais infectados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). _____ 32
- Figura 3. IL-10 no plasma de animais infectados tratados ou não tratados com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). _____ 33
- Figura 4. Perfil da quimiocina CCL2 no plasma de animais infectados tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). _____ 34
- Figura 5. Perfil da quimiocina CCL5 no plasma de animais infectados ou não tratados com Enalapril (Ena) e/ ou Benznidazol (Bz). _____ 36
- Figura 6. Atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no tecido cardíaco de animais tratados ou não tratados com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz) na fase aguda. _ 38
- Figura 7. Atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no tecido cardíaco de animais tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). _____ 39
- Figura 8. Quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase aguda. _____ 41
- Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase aguda. _____ 42
- Figura 10. Quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. _____ 43
- Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. _____ 44
- Figura 12. Análise semi-quantitativa de neoformação de colágeno no tecido muscular do coração de camundongos infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. _____ 45
- Figura 13. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol. _____ 46

LISTA DE ABREVIATURAS

Angio I- Angiotensina I

Angio II- Angiotensina II

Ang 1-7- Angiotensina 1-7

AT1- Receptor 1 de Angiotensina II

AT2- Receptor 2 de Angiotensina II

BZ- Benznidazol

CD- Grupo de diferenciação (“Cluster of differentiation”)

CC- Cardiopatia chagásica

DTU- Discrete Typing Unit

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

ELISA- Ensaios imunoenzimáticos

ENA- Enalapril

g- Grama

HE- Hematoxilina & Eosina

IECA- Inibidores da enzima conversora de angiotensina

IFN- Interferon

IL- Interleucina

Kg- Quilograma

MEC- Matriz extracelular

MMP- Metaloproteinases de matriz

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

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pg - Picograma

pH- Potencial hidrogeniônico

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SDS- Duodecil sulfato de sódio

SRAA- Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

TC- Terapia de Combinação

TNF- Fator de Necrose Tumoral

mg- Miligrama

μl- Microlitro

μm- Micrômetro

mM- Milimolar

mL- Mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	10
1.2. Aspectos inflamatórios da doença de Chagas	12
1.3. Estratégias terapêuticas na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA).....	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais e infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
4.2. Tratamento e eutanásia dos animais	24
4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	25
4.4. Processamento do tecido cardíaco para microscopia óptica.....	26
4.4.1. Avaliação histopatológica.....	27
4.5. Zimografia	28
4.6. Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Curvas de parasitemia	29
5.2. Atividade anti-inflamatória do Benznidazol e do Maleato de Enalapril.....	30
5.3. Atividade das enzimas metaloproteinases de matriz	37
5.4. Quantificação do processo inflamatório	40
5.5. Avaliação da neoformação de colágeno	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. ANEXOS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado que apresenta ciclo de vida heteroxênico (Chagas, 1909). O mecanismo de transmissão natural e de maior importância epidemiológica deste agente etiológico se dá através de insetos hematófagos (triatomíneos) da família Reduviidae, conhecidos popularmente como barbeiros (Brenner *et al.*, 1987). Entretanto sabe-se que este parasito pode ser transmitido por mecanismos não vetoriais como por via congênita, transmissão oral, por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (Dias *et al.*, 1999). Atualmente, o contágio por via oral tem apresentado grande destaque devido à ingestão de alimentos, como o açai e caldo de cana, contaminados por triatomíneos ou por suas fezes infectadas (Domingues *et al.*, 2015). Pela distribuição do parasito e dos seus vetores ao longo da América do Sul e Central, a infecção também é conhecida como tripanossomíase americana (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

A tripanossomíase americana ainda é considerada um problema médico-social e, segundo a Organização Mundial de Saúde estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina onde a infecção é endêmica (WHO, 2015). O fluxo migratório entre os países latino-americanos e os países desenvolvidos tem sido estimulado devido a problemas políticos e sócio-econômicos, o que torna a moléstia de Chagas, antes endêmica no continente ocidental, um problema de saúde global (Schmunis & Yadon, 2010) sendo transmitida por mecanismos independentes do vetor.

A doença de Chagas

A evolução natural da infecção pelo *T. cruzi* é dividida em duas fases subsequentes, aguda e crônica. A fase aguda inicia-se após a entrada e multiplicação

do parasito na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, evento constatado a partir de exames de sangue a fresco (Chagas, 1909; Coura & Borges-Pereira, 2010). No início da infecção o indivíduo pode desenvolver uma sintomatologia breve com manifestações clínicas inespecíficas como febre, mal-estar, dores de cabeça, hepatoesplenomegalia, astenia que muitas vezes passam despercebidas (Dias, 1992). No entanto, crianças e, com menor frequência, adultos podem apresentar sintomas mais graves após o período de incubação (7 a 14 dias), como os sinais de porta de entrada edema periorbital unilateral (sinal de Romaña) (Romaña, 1935) e chagoma de inoculação (Mazza e Freire, 1940), linfadenopatia, meningoencefalite e miocardite aguda (Tanowitz *et al.*, 1992). A mortalidade na fase aguda acomete de 5-10% dos indivíduos infectados. Estes casos estão associados, principalmente, a indivíduos imunodeprimidos e crianças por apresentarem miocardite aguda e meningoencefalite grave (Teixeira, *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2015). Esta fase pode durar de 30 a 90 dias. Entretanto, com o progresso da infecção o sistema imune de indivíduos imunocompetentes entra em ação e induz a redução da carga parasitária e, conseqüentemente, o controle do balanço parasito/hospedeiro (Rassi Jr *et al.*, 2010). A resposta imune é efetiva no controle da infecção mas não previne o desenvolvimento da doença para a fase crônica.

Na fase crônica, diferentemente da fase aguda, a parasitemia é sub-patente, de maneira que o parasito não é encontrado facilmente na corrente sanguínea. Por essa razão, são necessários métodos indiretos para a detecção do mesmo, dentre eles, os métodos sorológicos para reconhecimento de anticorpos do parasito: imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA); métodos parasitológicos: xenodiagnóstico, hemocultura; além de métodos moleculares como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Gomes *et al.*, 2001; Coura & Castro, 2002; Moreira *et al.*, 2013; Lana & Martins-Filho, 2015). As principais formas clínicas da infecção nesta fase são a indeterminada, a cardíaca, a digestiva e/ou a cardio-digestiva. A maioria dos indivíduos infectados, aproximadamente 70% dos casos (Boscardin *et al.*, 2010), desenvolvem e/ou permanecem na forma indeterminada, sendo esta caracterizada pela presença de anticorpos contra o *T. cruzi* no soro do paciente (sorologia positiva), eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, do esôfago e do cólon normais (Rassi Jr *et al.*, 2010). Nesta forma clínica, há um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro sem danos evidentes ao indivíduo. No entanto, por motivos ainda não

elucidados pode haver a evolução para as formas sintomáticas nas quais os indivíduos podem apresentar manifestações clínicas em graus variados no coração, esôfago, colón e outros tecidos (Prata, 2001).

A forma cardíaca é a responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da infecção pelo *T. cruzi* (Chapadeiro, 1999; Nunes *et al.*, 2012). Esta forma crônica sintomática é denominada de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), as complicações cardíacas resultam no remodelamento da matriz de colágeno cardíaca e subsequente fibrose, levando a um aumento do miocárdio, rigidez, disfunção diastólica e sistólica, e, finalmente, uma grave cardiomiopatia dilatada associada com arritmias ventriculares o que pode evoluir para um quadro de insuficiência cardíaca crônica ou pode levar à morte súbita, a principal causa de mortalidade em pacientes com cardiopatia chagásica (Higuchi *et al.*, 2003; Boscardin *et al.*, 2010; Malik *et al.*, 2015).

O grande desafio para a compreensão da fisiopatologia da CCC é entender a intrínseca relação existente entre o parasito (*T. cruzi*) e seus hospedeiros mamíferos (ex. o homem). Essa interação, através de mecanismos que ainda não são totalmente compreendidos, determina o grau de agressão ao miocárdio (Zhang & Tarleton, 1999; Marin-Neto *et al.*, 2007). Contudo, fatores como características genéticas e resposta imune do hospedeiro, exposição à reinfecção e carga parasitária, bem como a variabilidade genética do parasito têm sido sugeridos como determinantes na evolução dessa forma clínica (Andrade *et al.*, 1996).

A presença do parasito não só desencadeia como mantém a patogenicidade da infecção, uma vez que o *T. cruzi* presente no organismo haverá uma complexa interação de suas moléculas com células de defesa do hospedeiro. Desta interação, é montada uma resposta inflamatória que, neste contexto, torna-se fundamental, pois além de ser a estratégia utilizada pelo hospedeiro para controlar a replicação do parasito, ela faz-se responsável pelos danos causados a diferentes tecidos do organismo (Teixeira, *et al.*, 2002).

1.2. Aspectos inflamatórios da doença de Chagas

A resposta inflamatória decorrente da infecção pelo *T. cruzi* é essencial para a resistência do hospedeiro à infecção, mas também é responsável pela patologia na

doença de Chagas (Teixeira *et al.*, 2002). A ausência ou redução da resposta inflamatória pode conduzir a uma replicação excessiva do parasito. Por outro lado, uma resposta imune exacerbada, como ocorre na ausência de mecanismos de controle, pode levar a danos nos tecidos e consequente morte do hospedeiro. Logo, um equilíbrio entre estes fatores (parasito e hospedeiro) contribui para a perpetuação da doença no hospedeiro mamífero (Talvani & Teixeira, 2011).

A essência da inflamação e da patologia observada em seres humanos é também estudada em modelos experimentais, obviamente com as particularidades inerentes ao modelo utilizado. Sendo assim, a cardiopatia chagásica experimental apresenta um perfil inflamatório dependente de uma série de citocinas e quimiocinas para a ativação e recrutamento das células imunes para o sítio de lesão (Talvani *et al.*, 2000). Além disso, o processo inflamatório que ocorre devido à infecção pelo *T.cruzi* se dá, dentre outros meios, através da interação de proteínas de membrana do parasito, como as GPI-mucinas (Glicosilfosfatidilinositol- GPI), com receptores do tipo Toll (TLRs) presentes na superfície da membrana plasmática das células fagocíticas (macrófagos), principalmente (Campos & Gazzinelli, 2004; Bafica *et al.*, 2006; Nagajyothi *et al.*; 2012; Higashikuni *et al.*, 2013). Essa interação do parasito com as células do sistema mononuclear fagocitário libera vários mediadores inflamatórios, como citocinas (TNF-alfa e IL-12), quimiocinas e óxido nítrico (NO) (Brener & Gazzinelli, 1997).

O IFN-gama é outra citocina inflamatória sintetizada logo após a infecção, principalmente pelas células “*Natural Killer*” (NK) do hospedeiro em resposta ao estímulo da citocina IL-12 e pelas células CD4+ e CD8+ durante a infecção. O IFN-gama ativará as células do sistema mononuclear fagocitário e promoverá exacerbção da produção de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, além de estimular a liberação de quimiocinas (como a CCL2 e CCL5) para o recrutamento de novas células para o sítio inflamatório. Em conjunto, o TNF-alfa e o IFN-gama induzem ainda a ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) catalizadora da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos que atuará inibindo a replicação do parasito (Gutierrez *et al.*, 2009; Paiva *et al.*, 2009; Talvani & Teixeira, 2011).

Contudo, há ainda neste processo a participação das citocinas regulatórias que são responsáveis por inibir/controlar as respostas imunes do hospedeiro,

particularmente aquelas mediadas por células fagocíticas (Aliberti *et al.*, 2001; De Oliveira, 2007; Talvani *et al.*, 2009).

Estudos focados em mecanismos imunorregulatórios de pacientes com a forma indeterminada têm mostrado que, enquanto esses pacientes produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, e IFN-gama; eles também produzem citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. De fato, elevada frequência de células regulatórias, monócitos e linfócitos que produzem IL-10 são encontradas em pacientes com a forma indeterminada comparado aos indivíduos com a forma cardíaca (Souza *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2012). O balanço entre as citocinas inflamatórias/anti-inflamatórias é direcionado pelo perfil anti-inflamatório da resposta nos pacientes com a forma indeterminada (Dutra *et al.*, 2014).

Ao contrário dos eventos imunorregulatórios observados nos indivíduos com a forma indeterminada da doença, pacientes com a forma cardíaca da doença apresentam predominância de citocinas inflamatórias em relação a IL-10 (Dutra *et al.*, 2014). Uma análise *ex vivo* da expressão de citocinas mostrou que células de pacientes cardíacos apresentavam alta produção de TNF-alfa assim como de IFN-gama (Dutra *et al.*, 1997). Logo, esse infiltrado de células inflamatórias no tecido muscular cardíaco leva a destruição do miocárdio, epicárdio e endocárdio, posteriormente ocasionando a deposição de colágeno intermeando as áreas “inflamadas” na tentativa de cicatrização (fibrose) e, portanto, responsável pela diminuição da contratilidade cardíaca, massa muscular cardíaca bem como perda da inervação cardíaca (Machado *et al.*, 2005). Todas essas ações culminam em uma nova reorganização estrutural e fisiológica negativa do órgão, fazendo com que seja necessário o remodelamento do mesmo (Prata, 2001; Marin-Neto *et al.* 2007).

O remodelamento cardíaco nada mais é do que alterações na estrutura, células e matriz extracelular (MEC) do coração em decorrência das mudanças celulares, moleculares e intersticiais (Mendes *et al.*, 2010). Constitui-se de um mecanismo adaptativo à sobrecarga hemodinâmica necessária para manter a capacidade funcional do órgão. Alterações na MEC, como mudanças no equilíbrio entre sua síntese e degradação e na continuidade da rede de colágeno fibrilar são as características essenciais do remodelamento tecidual que ocorre em muitos processos patológicos (Spinale *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2011). Nesse sentido, a manutenção da integridade e da organização da MEC é de grande importância e diversos componentes protéicos da mesma possuem importante participação no

remodelamento do tecido conjuntivo. Dentre esses componentes, destacam-se as enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs).

As MMPs são uma família de proteinases zinco-dependentes que participam da degradação e remodelamento da MEC. Essas enzimas são capazes de degradar componentes proteicos da MEC e, por isso, participam de uma variedade de processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas (Nagase *et al.*, 2006; Geurts *et al.*, 2011). Cada uma das MMPs apresenta particularidades em sua estrutura e são classificadas em grupos de acordo com seu substrato específico e com a organização de seu domínio catalítico colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e MMPs de membrana (Kupai *et al.* 2010, Geurtz *et al.* 2011).

Dentre as diferentes MMPs, MMP-2 e MMP-9 pertencem ao grupo das gelatinases, e assim são descritas pela digestão da gelatina e desnaturação do colágeno IV, da fibronectina e da elastina. Estas enzimas destacam-se por seu envolvimento em doenças cardíacas. (Li *et al.*, 2000). Schulz *et al.*(2007) mostraram que MMP-2 e MMP-9 são ativadas no coração humano após a isquemia, e suas atividades correlacionam-se negativamente com o índice de função contrátil do ventrículo esquerdo e positivamente com a duração da isquemia. Na infecção pelo *T. cruzi*, Gutierrez *et al.*(2008) mostraram que camundongos infectados por este parasito e tratados com inibidores exógenos (tetraciclina-Doxiciclina) de MMP-2 e MMP-9 apresentam decréscimo significativo na inflamação cardíaca e aumento da sobrevivência, além de níveis reduzidos de IFN- gama, TNF- alfa e óxido nítrico (NO). Sendo o coração, órgão de maior relevância para os estudos na infecção pelo *T. cruzi*, e a influência destas enzimas na resposta imune do hospedeiro, elas tornam-se, então, importantes alvos de investigação.

Entretanto, a dificuldade no estudo dos mecanismos patológicos envolvendo a infecção pelo *T. cruzi* deve-se à natureza e à evolução da resposta imune, à presença do parasito e fisiologia cardíaca do hospedeiro (em se tratando da CC). Contudo, por meio de técnicas moleculares como a PCR em tempo real, foi demonstrada a persistência do parasito nos tecidos por longo período de tempo após a infecção, havendo ainda correlação entre a carga parasitária e a intensidade da inflamação (Guedes *et al.*, 2011).

Dessa forma, como a carga parasitária está intimamente relacionada à resposta inflamatória, fármacos que reduzem a parasitemia provavelmente reduzirão, em

parte, o processo inflamatório sistêmico e/ou local, como é o caso do Benznidazol (Caldas *et al.*, 2008). Do mesmo modo, fármacos que podem atuar, direta ou indiretamente sobre a resposta inflamatória, como é o caso dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (Paula-Costa *et al.*, 2010) e das estatinas (Melo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012), também poderiam beneficiar o hospedeiro.

1.3. Estratégias terapêuticas na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Atualmente apenas dois agentes terapêuticos são aplicados no tratamento etiológico da doença de Chagas: o nitrofurano Nifurtimox (NFX; Lampit®, Bayer) e o nitroimidazol Benznidazol (Bz) (Rochagan®, Rodanil®, Roche). Em abril de 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do Bz foram cedidos ao Brasil pela Roche e aqui este fármaco foi produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (Oliveira, *et al.*, 2008). Porém, recentemente, o LAFEPE deixou de produzi-lo e repassou a responsabilidade para o Laboratório ELEA-Argentina (Sosa-Estani, 2012).

Esses fármacos utilizados no tratamento etiológico da doença de Chagas são compostos nitroheterocíclicos, caracterizados pela presença de um grupo nitro ligado a um anel aromático. Tais compostos incluem um amplo espectro de nitrofuranos e antibióticos nitroimidazólicos que são eficazes contra uma gama de infecções bacterianas e parasitárias (Wilkinson, *et al.*, 2008). No caso da doença de Chagas, eles atuam como pró-drogas sendo submetidos a uma ativação enzimática mediada pela presença do patógeno, essas reações são catalisadas por enzimas nitrorredutases, produzindo assim efeitos citotóxicos. A descoberta dessas drogas ocorreu, empiricamente, há mais de quatro décadas atrás (Buckner & Urbina, 2012).

O NFX atua através da redução do grupo nitro formando radicais nitroaniônicos que, na presença de oxigênio, levam a formação de metabólitos altamente tóxicos (espécies reativas de oxigênio -ROS), anião de superóxido, peróxido de hidrogênio, dentre outros). Tem sido mostrado que o *T.cruzi* é deficiente em mecanismos de desintoxicação para metabólitos de oxigênio, em particular o peróxido de hidrogênio, sendo assim mais sensível ao estresse oxidativo do que as células de vertebrados (Urbina & Do Campo, 2003). Porém ressalta-se que esses radicais produzidos pela ação do NFX, também são tóxicos para o homem e dentre os efeitos colaterais mais comuns a este fármaco tem-se as manifestações digestivas, como náuseas, vômitos, anorexia,

perda de peso. Também podem ser observados sintomas de toxicidade no sistema nervoso central, como alucinações, insônia e em casos raros podem ser observados quadros de convulsões. Além disso, o NFX apresenta também potencial carcinogênico. A partir da década de 1980, o NFX teve sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile, Argentina), possivelmente em razão do efeito tripanocida reduzido e devido a sua alta toxicidade (Oliveira, *et al.*, 2008).

No Brasil, o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas é o Bz e sua introdução para utilização clínica em seres humanos ocorreu em 1978. O Bz parece atuar através de um mecanismo diferente (redução) do NFX, que envolve a modificação covalente das macromoléculas (como por exemplo, DNA, RNA, citocromo P450 e outras proteínas) do parasito provocada pelos radicais aniônicos produzidos pela nitroredução (Urbina & DoCampo, 2003). Esse fármaco inibe a síntese de proteínas; os metabólitos reduzidos presentes nas uniões covalentes com as macromoléculas interagem com o DNA do parasito inibindo a replicação do mesmo e ainda, o Bz inibe a cadeia respiratória do patógeno (Apt, 2010). O Bz atua tanto contra as formas circulantes (tripomastigotas) quanto às formas teciduais (amastigotas) do *T. cruzi*. E a produção de radicais livres pelo Bz é menor do que com o NFX.

Contudo, o Bz também apresenta reações adversas relacionadas à sua administração, embora sejam um pouco mais amenas em relação ao NFX, tais como, reações de hipersensibilidade que ocasionam dermatites, toxicidade hepática, intolerância digestiva, edemas e depressão da medula óssea que leva ao abandono imediato do tratamento (Salomon, 2011).

O tratamento com o Bz durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* produz cura parasitológica em aproximadamente 70% dos pacientes (Marin-Neto *et al.*, 2009). Todavia, o tratamento da doença de Chagas na fase crônica da infecção apresenta baixa eficácia terapêutica, sendo esta a fase em que os indivíduos normalmente são diagnosticados.

Um estudo denominado BENEFIT foi proposto para avaliar o papel desta terapia na redução da mortalidade e nos danos cardiovasculares em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (Marin-Neto *et al.*, 2009). O BENEFIT é um estudo multicêntrico, randomizado no qual a avaliação dos pacientes com a forma cardíaca da doença foi realizada entre os anos de 2004 à 2011. Porém, recentemente, Morillo & Marin-Neto *et al.* (2015) mostraram que o tratamento com o Bz, nestes pacientes crônicos, reduziu

significativamente a detecção de parasitos circulantes mas não reduziu a evolução clínica cardíaca (Lana *et. al.*, 2009; Machado-de-Assis *et. al.*, 2012). Contudo, vários fatores podem ter interferido nestes achados, com o genótipo do parasito; o paciente antes de receber esta terapia apresentava baixo risco de aparecimento de danos cardíacos; o tratamento com o Bz pode ter sofrido interação com outras terapias mais prolongadas (como tratamento de infecções crônicas – tuberculose, lepra, etc); e ainda esta terapia pode ter ocorrido numa fase mais precoce da doença em alguns indivíduos (Morillo & Marin-Neto *et. al.*, 2015).

Por outro lado a administração do Bz durante a fase crônica da infecção experimental com *T. cruzi* foi capaz de prevenir o desenvolvimento de uma forma mais grave de cardiopatia, em parte, pela redução da carga de parasitas, em parte pela ação sobre a regulação do sistema imune do hospedeiro (Olivieri *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2005). De fato, estudos anteriores *in vitro*, demonstraram que o Bz atua na regulação negativa do gene da NOSII promovendo a inibição do óxido nítrico e também promove a inibição do NF-kB em macrófagos após estimulação com lipopolissacárideo e IFN-gama (Piaggio *et. al.*, 2001). Este efeito imunomodulatório do Bz é capaz de inibir a produção das citocinas inflamatórias, produção de óxido nítrico e também o recrutamento de leucócitos para o coração durante a infecção pelo *T. cruzi* em humanos e modelos experimentais (Sathler-Avelar *et. al.*, 2006; Daliry *et. al.*, 2014).

Vários estudos demonstram também, que apesar do tratamento do Bz ser insuficiente para atingir a cura parasitológica na maioria dos casos crônicos, ele reduz a carga parasitária interferindo, dessa forma, na evolução clínica da doença (Viotti *et. al.*, 1994; Tarleton *et. al.*, 2007). A exemplificar, Lana *et. al.*(2009) mostraram que o tratamento com o Bz durante a fase crônica da doença melhorou o prognóstico dos indivíduos de uma área endêmica que apresentavam a forma indeterminada.

Embora a terapia com o Bz durante a fase crônica possa apresentar melhorias na evolução clínica cardíaca associada à doença de Chagas, atualmente terapias aplicadas para doenças cardiovasculares de diferentes etiologias (por exemplo, beta-bloqueadores, estatinas e em particular os inibidores das enzima conversora de angiotensina) ganharam novo interesse por regularem, parcialmente a resposta imune e induzir melhoria na função cardíaca ventricular em estudos da infecção experimental e humana pelo *T. cruzi* (Machado *et. al.*, 2012).

1.4. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA)

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha importante papel na regulação da pressão arterial e na manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico. Esse sistema é estimulado, principalmente, pelas seguintes condições presentes na insuficiência cardíaca: restrição de sódio, contração do compartimento intravascular (desidratação, hemorragia), hipotensão arterial. A diminuição do volume plasmático e a redução de sódio estimulam os rins a liberarem a renina, esta enzima catalisa a conversão do angiotensinogênio, produzido no fígado, em angiotensina I. A angiotensina I é um peptídeo inativo, desprovido de ação vascular, logo a mesma é convertida em angiotensina II (angio II) a partir da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) encontrada no endotélio capilar dos pulmões e no endotélio vascular de vários órgãos (Ribeiro & Florêncio, 2000;).

A angiotensina II apresenta importante papel na regulação da pressão arterial e também na regulação da resposta inflamatória vascular através da ativação e recrutamento de células inflamatórias para o sítio inflamatório, além das lesões arteriais (tromboembolismo) (Ferrario & Strawn, 2006). A angio II induz uma variedade de eventos vasculares, como a vasoconstrição a partir da síntese de aldosterona, ativação endotelial, proliferação de células, quimioatração de monócitos a partir da liberação de citocinas e quimiocinas, aumentando assim o estresse oxidativo e suprimindo a síntese de óxido nítrico (Cunha *et. al.*, 2005). Ang II através de sua ligação ao receptor AT1 promove a retenção renal de sódio e água, vasoconstrição, hipertrofia cardíaca do músculo liso, aumento na contratilidade cardíaca, atividade aumentada do sistema nervoso simpático, aumento na proliferação, diferenciação e crescimento celular (Gemhardt *et. al.*, 2005; Boim *et. al.*, 2011; De Mello e Frohlich *et. al.*, 2014). Todavia, quando a Ang II se liga ao receptor AT2 ocorre a estimulação do desenvolvimento fetal e da diferenciação celular, proteção isquêmica, modulação da matriz extracelular, reparo tecidual, apoptose, vasodilatação, inibição do crescimento e proliferação celular (Gemhardt *et. al.*, 2005; Boim *et. al.*, 2011; De Mello e Frohlich *et. al.*, 2014). Tanto a atividade da ECA quanto a concentração de angiotensina II são responsáveis por desencadear respostas inflamatórias.

Os inibidores da ECA (IECAs) atuam no SRAA impedindo a conversão de angiotensina I (angio I) em angiotensina II (angio II), além de inibirem a degradação da bradicinina, um potente vasodilatador, que tem sua atividade aumentada (Giestas *et al.*, 2010;) Já foi mostrado que o tratamento com esses fármacos reduz a hipertrofia cardíaca e a morbidade cardiovascular em pacientes hipertensos (Ocaranza & Jalil, 2012).

Os IECAs são capazes de promover melhora clínica em quadros clínicos comumente encontrados em pacientes chagásicos, como isquemia, trombose, déficit nas funções endoteliais e disfunções cardíacas, além de promover regulação da resposta inflamatória (Konstam *et al.*, 1992). Um estudo com pacientes chagásicos mostrou que a associação dos inibidores da ECA (Enalapril) seguido pelo beta-bloqueador adrenérgico (Carvedilol) apresentou redução sérica da quimiocina CCL5 e do peptídeo natriurético tipo-B (BNP), bem como uma melhora na fração ventricular esquerda (Botoni *et al.* 2007), sugerindo benefícios na função cardíaca e nos *status* clínico desses pacientes. Na infecção experimental com o *T.cruzi*, o Captopril, um exemplo de inibidor da ECA, demonstrou ser capaz de amenizar a miocardite durante a fase aguda em modelo murino, mas não foi capaz de reduzir aspectos como mortalidade, parasitemia e carga parasitária tecidual nesses animais (Leon, *et. al.*, 2003).

O Maleato de Enalapril, outro fármaco do grupo dos inibidores da ECA, é uma pró-droga que não origina atividade biológica direta. Após a sua administração, ele é metabolizado, no fígado e nos rins, em seu metabólito ativo, o Enalaprilato, um eficiente inibidor da ECA (MacFadyen *et al.*, 1993). Paula-Costa *et al.* (2010) demonstraram que o tratamento com doses de 25mg/kg desta droga em animais isogênicos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* foi capaz de reduzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a miocardite ao final da fase aguda. Além disso, esse tratamento mostrou redução dos parasitos circulantes e teciduais nesses animais, bem como da replicação de formas epimastigotas *in vitro* de forma dose-dependente. Outro estudo mais recente utilizando a combinação deste fármaco com o Bz mostrou que em modelo murino infectado pela cepa VL-10 do *T. cruzi* foi capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios, a carga parasitária no tecido muscular cardíaco bem como os níveis de proteínas relacionadas ao dano cardíaco (Penitente & Leite *et. al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O parasitismo tecidual do *T. cruzi* interfere diretamente na gênese e no desenvolvimento do processo inflamatório e este, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica. Tal fato ocorre em função do processo inflamatório ser condicionante à destruição das miocélulas cardíacas levando a formação de fibrose e alteração funcional do órgão. Neste sentido, fármacos que atuem restringindo as ações angiotensina II, denominados inibidores da enzima conversora da angiotensina II (ex: maleato de Enalapril), quando administrado na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* mostrou-se capaz de reduzir a produção de alguns mediadores inflamatórios circulantes, e o recrutamento celular para o tecido muscular cardíaco e a parasitemia. Estes achados reforçaram alguns estudos realizados em seres humanos onde a associação dos inibidores da ECA com outros fármacos (ex. beta-bloqueadores) também reduziram a produção de mediadores inflamatórios em pacientes chagásicos com melhora funcional dos parâmetros ventriculares. Em paralelo, o papel “protetor” do Benznidazol (Bz), único fármaco disponível no Brasil para o tratamento etiológico da doença, não deve ser descartada, principalmente por sua ação direta e indireta sobre a resposta imune, além de reduzir a carga parasitária, curar animais e pessoas infectadas por alguns tipos de cepas do parasito e amenizar as alterações fisiopatológicas em animais experimentais infectados pelo *T. cruzi*. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento em combinação com Enalapril (ENA) e Benznidazol durante a fase aguda proporcionou melhoras na fase crônica, com a redução do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco, redução significativa das quimiocinas (CCL2 e CCL5) e dos marcadores de disfunção cardíaca (proteínas C-reativa, creatina quinase, creatina quinase MB) na circulação (Penitente & Leite *et al.*, 2015). Portanto, acredita-se que a terapia em combinação utilizando o fármaco antiparasitário (Bz) e o inibidor da enzima conversora da angiotensina tragam benefícios morfofuncionais ao coração de hospedeiros mamíferos infectados pelo *T. cruzi* e por isso estudos desta natureza merecem novas investigações utilizando modelos experimentais, tais como camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

Avaliar a resposta inflamatória cardíaca e sistêmica em camundongos isogênicos (C57BL/6) infectados pela cepa “VL-10” do *Trypanosoma cruzi* submetidos ao tratamento com Enalapril e/ou Benznidazol.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Avaliar as ações anti-*T.cruzi* do Enalapril associado ou não ao Benznidazol durante a fase aguda da infecção experimental com a cepa “VL-10” deste parasito.
2. Quantificar os marcadores inflamatórios circulantes (TNF, IL-10, CCL2, CCL5) em animais isogênicos C57BL/6 infectados e tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol.
3. Avaliar a atividade das enzimas metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) no tecido muscular cardíaco de animais tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol por meio de zimografia.
4. Analisar o processo inflamatório no tecido muscular cardíaco após o tratamento com Enalapril e/ou Benznidazol.
5. Determinar o efeito do tratamento com Enalapril e/ou Benznidazol, de forma concomitante ou sequencial, sobre a neoformação de colágeno no miocárdio na fase crônica da infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas adultas com idade de 6-8 semanas pesando 18-20g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantidos sem restrição de água e ração. Os procedimentos adotados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal pré-estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, protocolo nº 2010/56.

Foram utilizados parasitos da cepa “VL-10” do *T. cruzi* armazenados em nitrogênio líquido e mantidos *in vivo* por sucessivas passagens em camundongos da linhagem Swiss, mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP).

A cepa VL-10 pertence ao grupo *T. cruzi* II (DTU II) (Moreno *et al.*, 2010), a mesma foi isolada de paciente que apresentava a forma indeterminada da doença de Chagas no estado de Minas Gerais (Schlemper *et al.*, 1986). Esta cepa foi previamente caracterizada por Filardi e Brener (1987) como resistente ao tratamento com o Benznidazol

A infecção dos animais foi feita com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas retiradas de camundongos Swiss utilizados na manutenção da cepa deste parasito. A coleta dos parasitos sanguíneos ocorreu próximo ao pico máximo de parasitemia. O sangue foi diluído em salina 0,9% para ajuste da concentração desejada, o inóculo foi calculado segundo Brener (1962) e realizado por via intraperitoneal.

Ressalta-se que os experimentos aqui relatados foram feitos em duplicata para analisar a reprodutibilidade dos dados de maneira que antes da realização dos experimentos definitivos para eutanásia houve avaliação da curva de parasitemia da cepa estudada.

4.2. *Tratamento e eutanásia dos animais*

Inicialmente através do cálculo amostral utilizando o programa BIOESTAT 5.0 com nível de confiança de 95% e *p*-valor igual a 0,05, definiu-se a necessidade de utilização de 10 animais por grupo sendo 10 grupos diferentes no estudo. O mesmo foi realizado em duplicata.

A conduta terapêutica para as combinações baseou-se, inicialmente, em doses máximas retiradas da literatura correspondentes a cada fármaco (Filardi & Brener, 1984; Diniz *et. al.*, 2013; Paula-Costa *et. al.*, 2010) e, sequencialmente, doses seguindo um decréscimo proporcional de “1:4” igualmente aplicado a cada um dos respectivos fármacos. Dessa forma, monoterapias com cada fármaco foram testadas, da mesma forma que em combinação, objetivando interferências sob os aspectos inflamatórios e antiparasitários.

Três grupos de animais foram tratados com diferentes doses de Benznidazol – Bz - (60mg/Kg; 80mg/Kg e 100mg/Kg), três grupos tratados com o fármaco Enalapril – ENA- (15mg/Kg; 20mg/Kg e 25mg/Kg), três grupos foram tratados com as diferentes combinações de Bz e ENA, respectivamente, (60/15mg/Kg; 80/20mg/Kg; 100/25mg/Kg) e um grupo tratado com o veículo, solução na qual os fármacos foram diluídos, constituída por PBS com adição de metil-celulose para sua suspensão.

Os animais foram tratados durante 20 dias consecutivos por via oral (gavagem), iniciado no dia da positivação da infecção. As análises parasitológicas foram realizadas diariamente através da coleta de 5µl de sangue da veia caudal dos camundongos e a quantificação das formas tripomastigotas foi realizada segundo a técnica descrita por Brener (1962) até o trigésimo dia de infecção.

A eutanásia dos animais ocorreu no 31º (durante a fase aguda) e 121º dias (durante a fase crônica) após a infecção. A coleta de sangue foi realizada para obtenção de soro e a eutanásia para obtenção de tecido muscular cardíaco.

O sangue foi coletado com pipeta Pasteur pelo plexo retro-orbital com adição de pequena quantidade de anticoagulante e, posteriormente, submetido à centrifugação refrigerada para obtenção de plasma. O material foi aliquotado em 2 tubos cônicos marca *ependorff* de 1,5 ml e armazenado a -80°C.

Em sequência, cada animal foi pesado e então eutanasiado. O coração destes animais foi removido, lavado em PBS 1x e armazenado imediatamente em formaldeído tamponado 10% para análise histopatológica.

4.3. 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 propostas neste trabalho. Os ensaios, assim como a preparação das soluções utilizadas, foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante de cada kit imunoenzimático.

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 Reagent B-R&D Systems, Minneapolis, USA*), sendo 5mL deste cromógeno adicionados a 5mL de água oxigenada (H_2O_2 - *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 aplicados para a medição dos níveis das quimiocinas CCL5 e CCL2 (*R&D Systems*, Minneapolis, USA), para a citocina inflamatória TNF-alfa (Fator de necrose tumoral- *R&D Systems*, Minneapolis, USA) e para a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (*R&D Systems*, Minneapolis, USA).

4.4. *Processamento do tecido cardíaco para microscopia óptica*

Os animais dos 10 grupos experimentais foram eutanasiados no 31º e 121º dia após a infecção. Durante esse procedimento os fragmentos do coração foram coletados e imediatamente fixados em formaldeído tamponado à 10%. Os tecidos foram processados e 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 (infiltrado inflamatório) e pela técnica de Tricômico de Masson (neoformação de colágeno).

i. Técnica de Hematoxilina & Eosina (HE)

Para análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório no tecido cardíaco dos animais foi realizada a coloração por HE. Secções com 4µm de espessura foram desparafinizadas 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 entellan.

ii. Técnica de Tricrômico de Masson

Para a observação do tecido conjuntivo fibroso e, por conseguinte, determinação da fibrose cardíaca, os cortes do tecido cardíaco foram corados pela técnica de tricômico de Masson. Após desparafinização e hidratação dos cortes histológicos, estes foram corados com hematoxilina por 2 minutos, lavados em água corrente e corados durante 5 minutos em solução contendo 90ml Sudam 1% em solução alcoólica, 10ml fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1ml de ácido acético glacial. Logo após, os cortes foram lavados em água corrente, corados durante 10 minutos em solução composta de 2,5g ácido fosfotúngstico, 2,5g ácido fosfomolibdico em 100ml de água destilada e, novamente, lavados em água corrente. Em seguida os cortes foram imersos por 5 minutos, em uma solução final contendo 2,5g azul de anilina, 2ml de ácido acético glacial em 100ml água destilada, lavados e submetidos à solução de água acética 10% durante 5 minutos. Após a realização do último processo de lavagem os cortes foram para a estufa (56°C) e, posteriormente, submetidos à montagem similar à HE.

4.4.1. Avaliação histopatológica

Para todas as análises presentes nos cortes histológicos, as imagens foram digitalizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada e processadas por meio do 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 ($1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) obtidas através da objetiva de 40x. O mesmo foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados \pm desvio padrão. Os animais infectados com o *T. cruzi* que apresentavam valores de quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca. A avaliação da neoformação de colágeno foi feita de forma semi-quantitativa. Para todas as análises foi utilizada objetiva de 20x. O grupo de animais não infectados, grupo controle, onde não foi observado neoformação de colágeno, foi classificado como ausente quanto à presença de fibrose. A partir desse dado os animais dos outros grupos, tratados com enalapril e benznidazol bem como suas combinações, foram avaliados e a presença de neoformação

de colágeno foi classificada quanto a intensidade em ausente, discreta, moderada e intensa; e quanto a localização em focal ou difusa.

4.5. Zimografia

A quantificação da atividade de MMP-2 e MMP-9 foi realizada pelo método de zimografia em fragmentos de tecido cardíaco. Para tal utilizou-se géis contendo 1mg/ml de gelatina (Sigma) e 5 ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% diluídos em 50 ml de água. Em cada gel foram utilizados padrões de peso molecular para MMP-2 e MMP-9 recombinantes. Realizou-se a corrida por eletroforese a 110V e 35mA. Após a eletroforese, o SDS foi removido com duas lavagens consecutivas em Triton-X-100 a 2,5%. O gel foi incubado por 12 horas à temperatura de 37°C, em solução de Tris 50mM para que houvesse degradação do substrato pelas respectivas enzimas. Após a incubação, o gel foi corado por 1 hora em Comassie Blue (0,5g de Comassie Blue, 200ml de metanol, 50ml de ácido acético) e em seguida descorado em solução contendo 250 ml de etanol e 80 ml de ácido acético por tempo suficiente para visualização das bandas. A imagem do gel foi obtida e a quantificação das bandas foi realizada pelo *software ImageJ 1.49* utilizando o método da densidade integrada (expresso em unidade arbitrária). Para normalização entre os géis, foram utilizadas células da linhagem HT 1080 como controle positivo das reações.

4.6. Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram representados pela mediana ou média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* e os dados foram analisados utilizando o teste *Kolmogorov-Smirnov* para confirmar os padrões de normalidade. De acordo com a natureza dos dados, para comparação entre os grupos foram realizados os testes *Mann Withney* e teste-t. Os testes *Kruskal-Wallis* e *OneWay ANOVA* foram utilizados para múltiplas comparações com pós-teste de Dunns ou *Tukey-Kramer*. Diferenças significativas entre os grupos foram definidas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. *Curvas de parasitemia*

Durante o período de parasitemia patente observou-se que o fármaco Benznidazol (Bz) foi capaz de reduzir a parasitemia em todas as doses avaliadas (FIG.1A), quando comparado com o grupo controle de animais infectados não tratados. Contudo, ao avaliar os efeitos do fármaco Maleato de Enalapril (ENA) observou-se que não houve diferença estatística entre as doses de ENA avaliadas e o grupo controle. No entanto, foi possível observar próximo ao pico de parasitemia (19º dia de infecção) uma redução da parasitemia naqueles animais que receberam a dose de 25mg/kg de ENA (FIG.1B), no entanto nos dias subsequentes este grupo apresentou parasitemia mais elevada, sugerindo então uma ação do fármaco sobre estes parasitos. No estudo das combinações, observou-se que as diferentes associações apresentaram um perfil similar àquele observado com os tratamentos com Bz (FIG.1C), sendo a parasitemia inferior à curva controle dos animais sem tratamento.

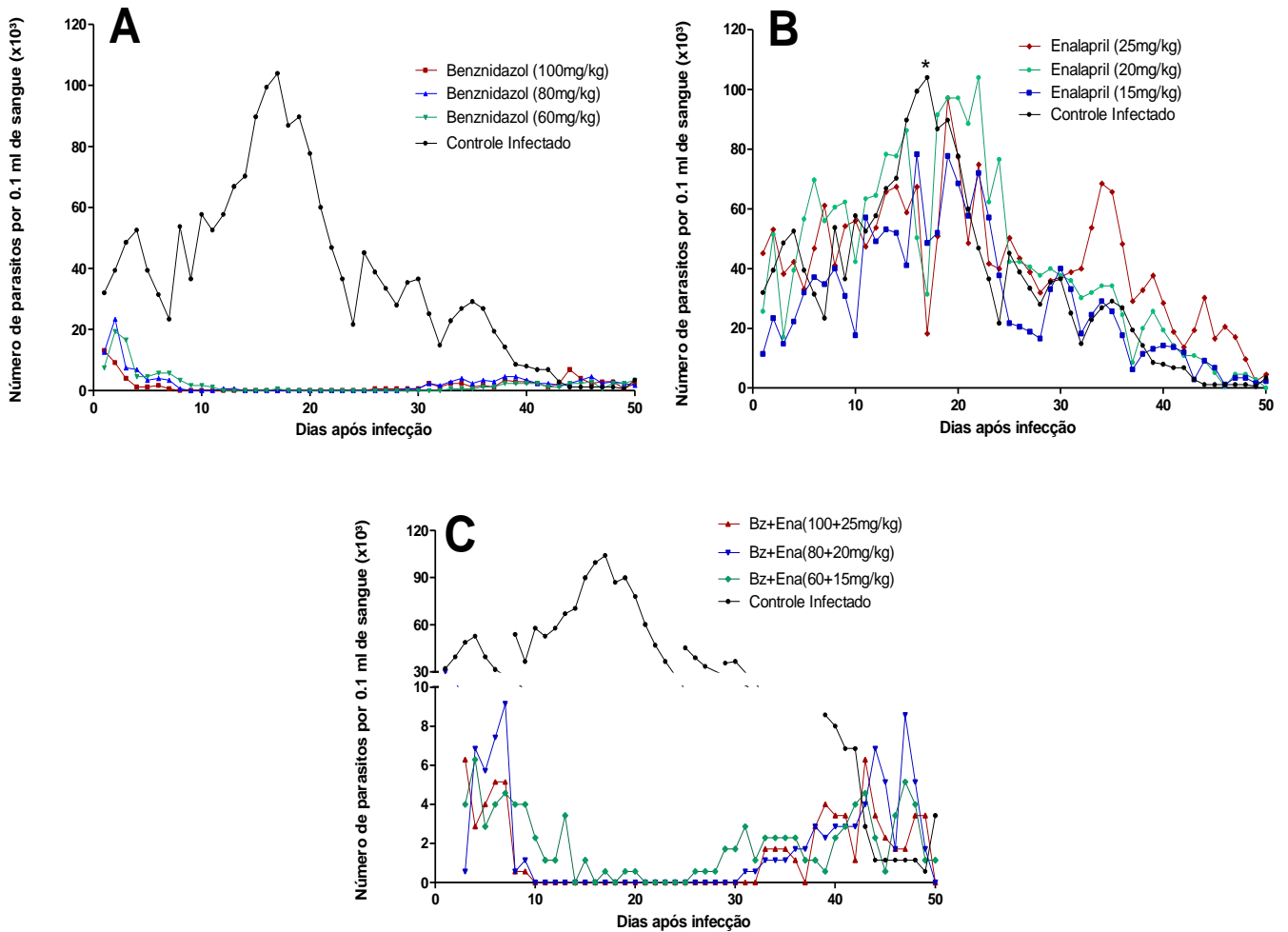


Figura 1. Curva de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). Grupos de 10 animais foram tratados com Bz (A), Ena (B) e combinações (C). Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/dia referente a cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle infectado e não tratado.

5.2. Atividade anti-inflamatória do Benznidazol e do Maleato de Enalapril

A resposta imune advinda dos diferentes tratamentos foi também avaliada neste estudo por meio de ensaios imunoenzimáticos para citocinas inflamatórias (TNF) e regulatória (IL-10), bem como para as quimiocinas (CCL2 e CCL5).

Quanto a produção plasmática da citocina TNF observou-se, na fase aguda, uma redução dos níveis da mesma nos animais tratados com as doses de 100mg/kg e 60mg/kg de Bz (FIG.2A) comparado com o grupo infectado não tratado. O mesmo perfil foi observado para os animais tratados com as doses de 25mg/kg e 15mg/kg de ENA (FIG.2B). Na avaliação das combinações de fármacos, todos os tratamentos

inibiram a produção desta citocina inflamatória (FIG.2C). Contudo, na fase crônica, não foram observadas diferenças significativas na síntese de TNF frente aos tratamentos com as diferentes doses de Bz (FIG.2D) e as associações (FIG.2F). Somente o tratamento com a dose de 20 mg/kg de ENA foi capaz de aumentar a produção plasmática de TNF (FIG.2E) em relação ao grupo controle infectado não tratado.

Os níveis da citocina regulatória IL-10 observados no plasma dos animais tratados estão mostrados na figura 3. Na fase aguda, observou-se que o fármaco Bz elevou a síntese desta citocina em todas as doses avaliadas (FIG.3A) comparado com o grupo infectado e não tratado. Nos animais tratados com as diferentes doses de ENA foi observado o mesmo perfil (FIG.3B). Avaliando-se as associações dos fármacos, somente a dose de 80mg/kg+20mg/kg (Bz+ENA) foi capaz de elevar os níveis de IL-10 (FIG.3C) em relação às outras doses e o grupo infectado não tratado. No entanto, na fase crônica, não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de IL-10 nos animais tratados com as doses de Bz (FIG.3D). Todavia, somente os tratamentos com as doses de 25mg/kg e 15mg/kg de ENA (FIG.3E) e as combinações 100mg/kg+25mg/kg e 80mg/kg+20mg/kg (Bz+ENA) (FIG.3F) foram capazes de aumentar a produção plasmática de IL-10 quando comparada com o grupo infectado não tratado.

Em relação à produção da quimiocina CCL2, na fase aguda, o tratamento com as doses de 100mg/kg e 60mg/kg de Bz (FIG.4A) e as doses de 25mg/kg e 15mg/kg de ENA (FIG.4B) foram capazes de reduzir seus níveis plasmáticos comparado com o grupo infectado e não tratado. Animais tratados com as diferentes associações (Bz+ENA) apresentaram redução da síntese da CCL2 em comparação ao grupo infectado não tratado (FIG.4C). Contudo, na fase crônica, observou-se redução dos níveis plasmáticos de CCL2 somente nos animais tratados com as combinações (Bz+ENA) (FIG.4F), não sendo observadas diferenças em sua produção plasmática nos animais tratados com as diferentes doses de Bz (FIG.4D) e de ENA (FIG.4E).

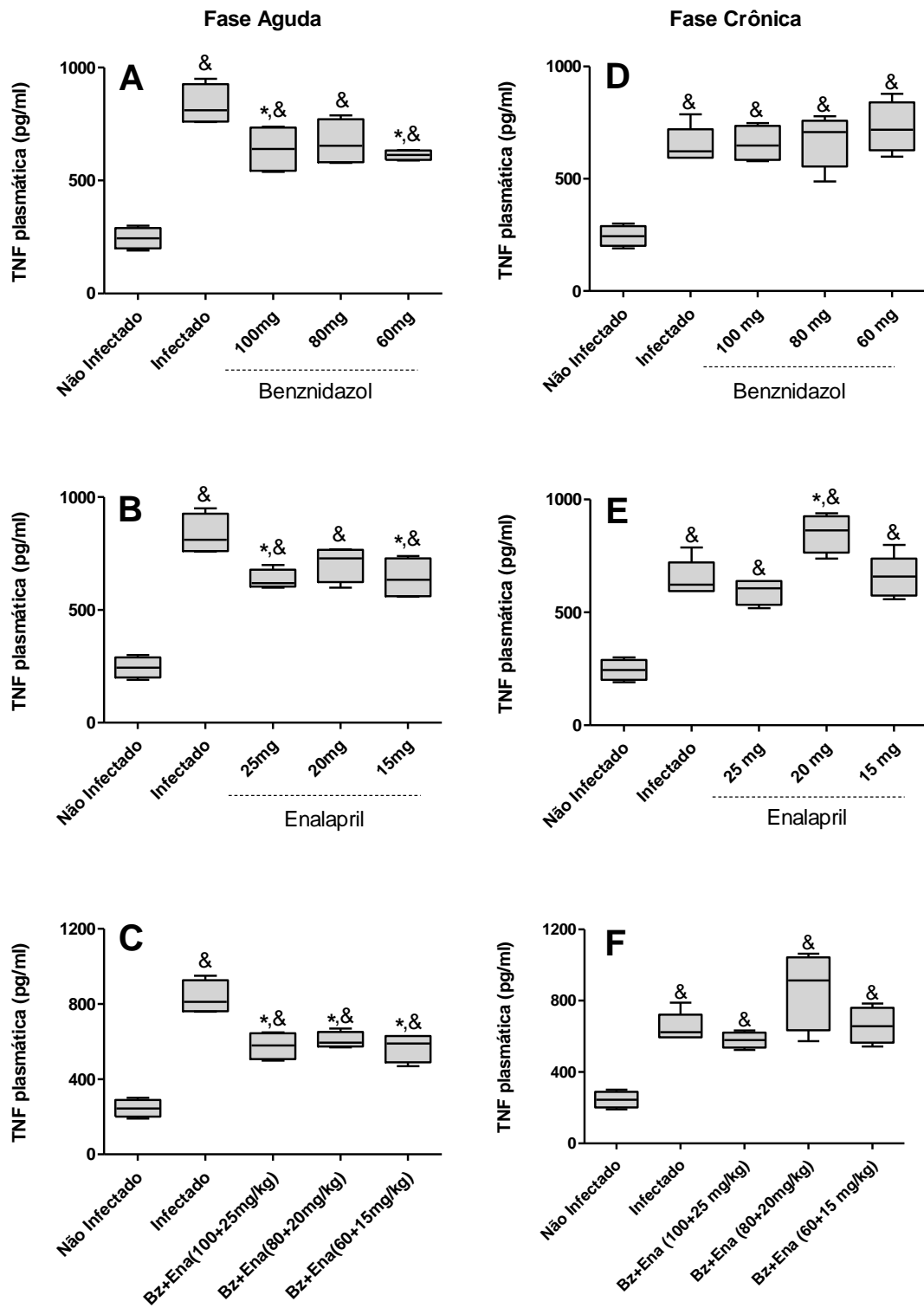


Figura 2. TNF no plasma de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). Concentração da citocina inflamatória TNF durante a fase aguda (A,B,C) e crônica (D,E,F). O tratamento com os três fármacos e suas diferentes doses encontram-se representados, respectivamente: Bz (A;D), ENA (B;E) e combinações (C;F). Cada *box* representa a média dos valores obtidos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado e não tratado. & $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não infectado.

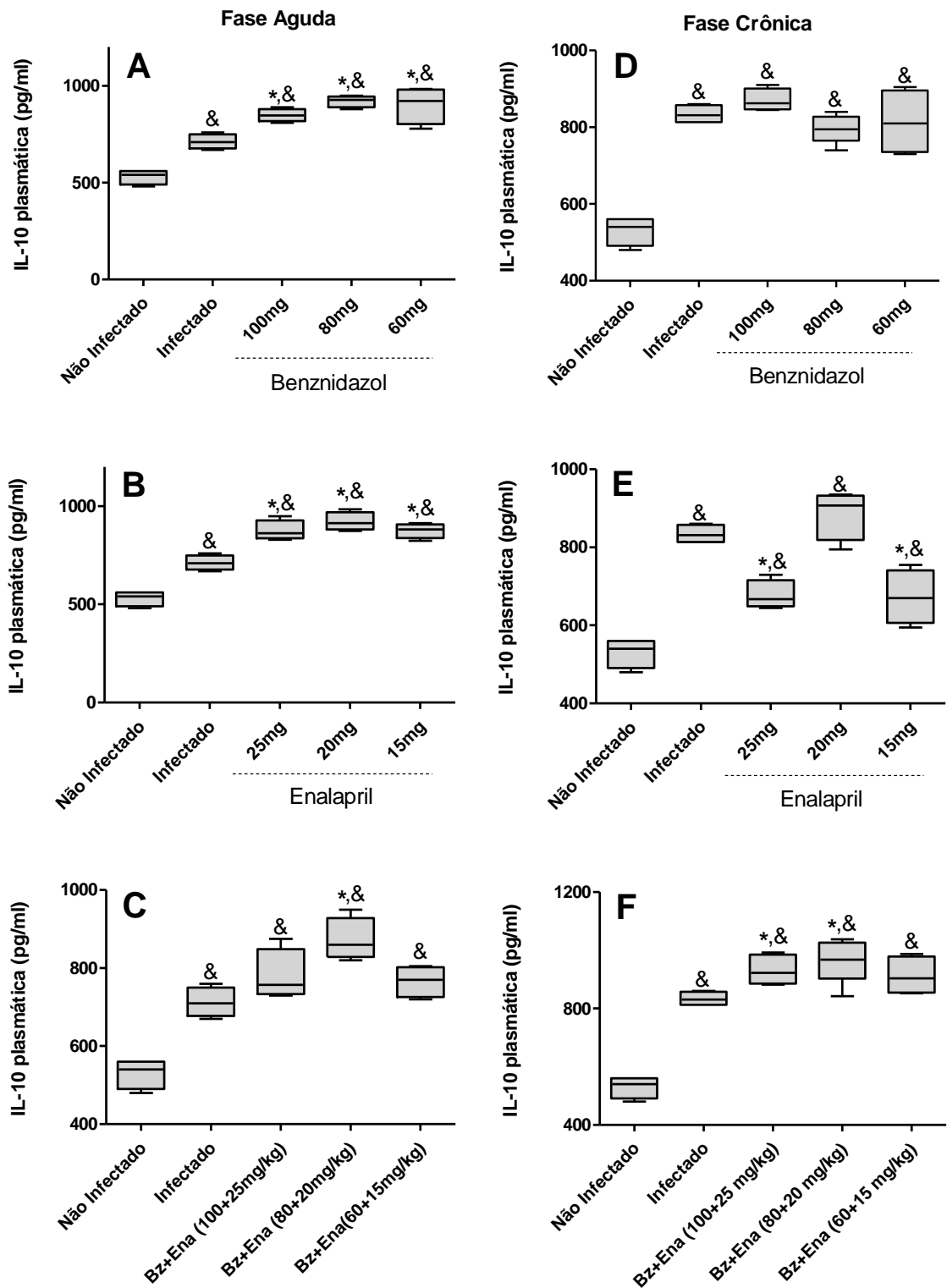


Figura 3. IL-10 no plasma de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). Concentração da citocina regulatória IL-10 durante a fase aguda (A,B,C) e crônica (D,E,F). O tratamento com os três fármacos e suas diferentes doses encontram-se representados, respectivamente: Bz (A;D), ENA (B;E) e combinações (C;F). Cada *box* representa a média dos valores obtidos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não infectado.

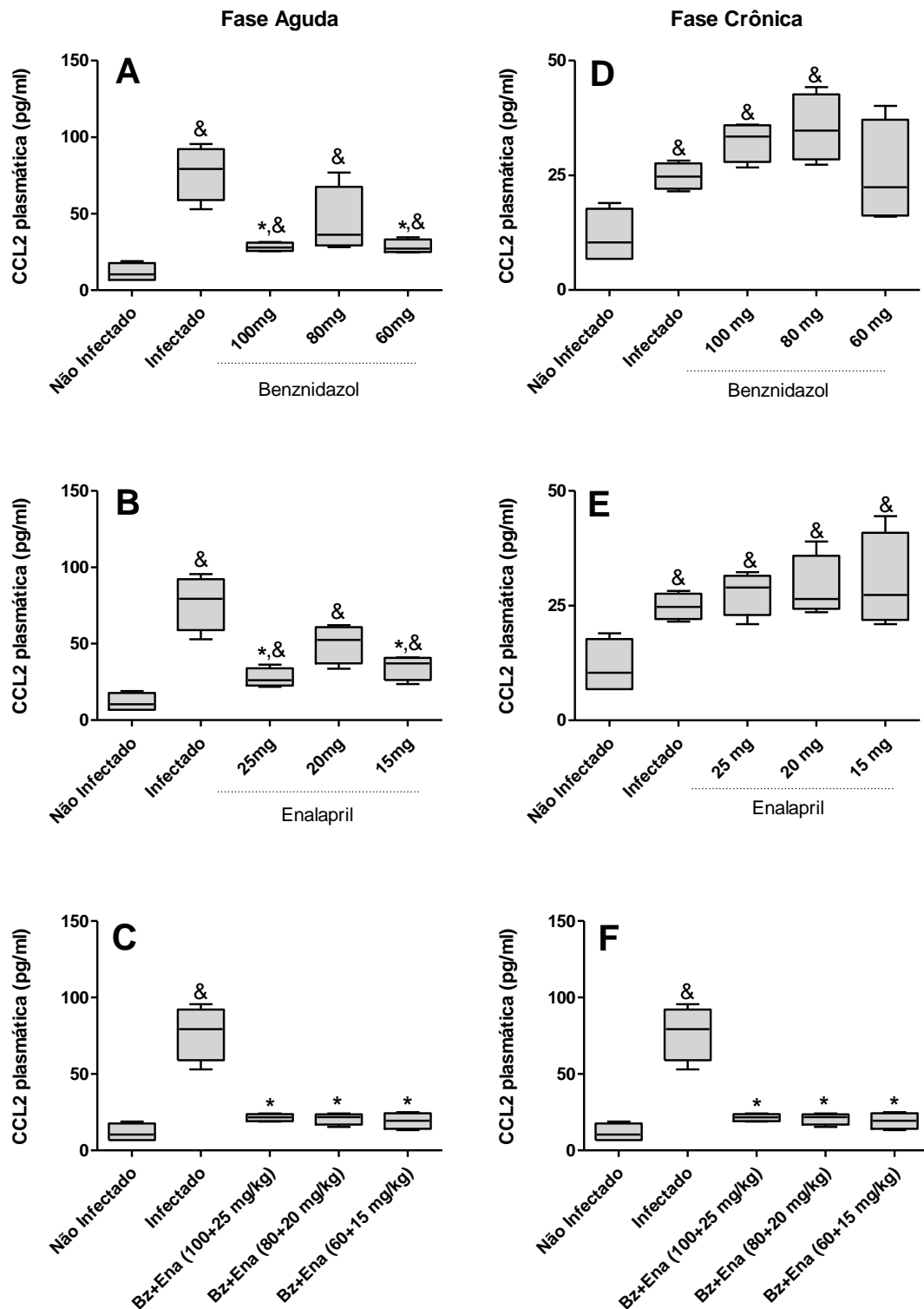


Figura 4. Perfil da quimiocina CCL2 no plasma de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). Concentração da quimiocina CCL2 durante a fase aguda (A,B,C) e crônica (D,E,F). O tratamento com os três fármacos e suas diferentes doses encontram-se representados, respectivamente: Bz (A;D), ENA (B;E) e combinações (C;F). Cada *box* representa a média dos valores obtidos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado e não tratado. & $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não infectado.

Na avaliação da quimiocina CCL5 observou-se que, na fase aguda, tanto o fármaco Bz quanto as combinações (Bz+ENA) reduziram os níveis de CCL5 no plasma de animais infectados e tratados em relação ao grupo infectado e não tratado (FIG.5A, B). Em relação aos animais tratados com o ENA não foram observadas diferenças nos níveis dessa quimiocina (FIG.5C). No entanto, na fase crônica, somente os tratamentos com as doses de 80mg/kg e 60mg/kg de Bz (FIG.5D) foram capazes de reduzir a síntese de CCL5. Deste modo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de CCL5 para os animais tratados com as diferentes doses de ENA (FIG.5E) e as respectivas associações (Bz+ENA) (FIG.5F).

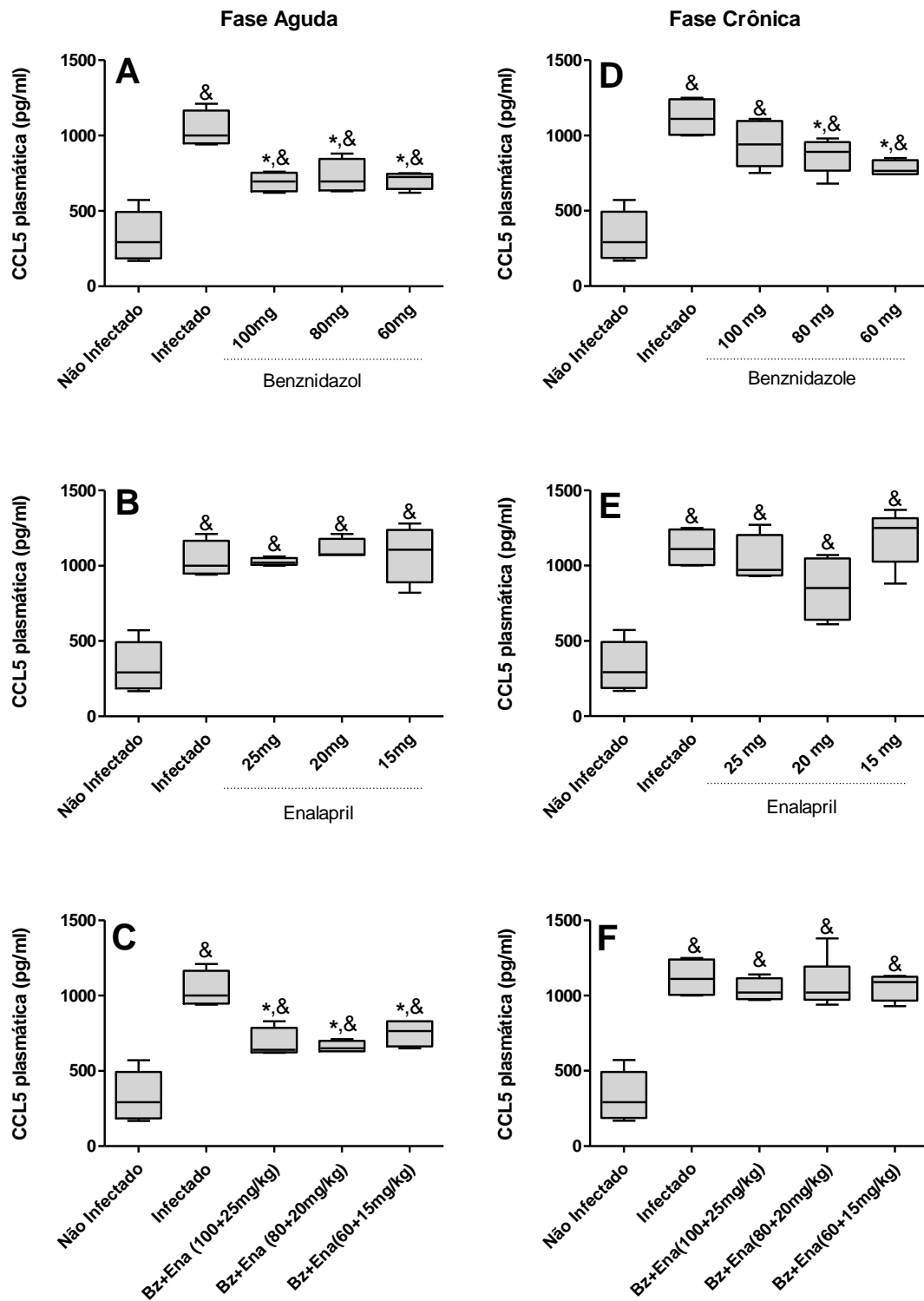


Figura 5. Perfil da quimiocina CCL5 no plasma de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ ou Benznidazol (Bz). Concentração da quimiocina CCL5 durante a fase aguda (A,B,C) e crônica (D,E,F). O tratamento com os três fármacos e suas diferentes concentrações encontram-se representados, respectivamente: Bz (A;D), ENA (B;E) e combinações (C;F). Cada *box* representa a média dos valores obtidos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo infectado e não tratado. & $p < 0,05$ comparado com o grupo controle não infectado.

5.3. *Atividade das enzimas metaloproteinases de matriz*

A atividade proteolítica das enzimas MMPs 2 e 9 no tecido cardíaco foi analisada pelo método da zimografia. Na fase aguda pode-se observar que a atividade da MMP-2 (FIG.6A; FIG.6B) estava reduzida nos grupos tratados com as diferentes doses de Bz e com suas combinações com ENA quando comparado com o grupo controle infectado não tratado. Ao avaliar a atividade desta MMP no grupo de animais tratados com ENA observou-se um aumento significativo da mesma, principalmente, nos animais tratados com a dose de 25 mg/Kg. Ao analisar a atividade da MMP-9 (FIG. 6A; 6C) nos grupos tratados ou não com ENA e/ou Bz observou-se um perfil semelhante ao da atividade da MMP-2.

Na fase crônica, foi possível observar uma reduzida atividade da enzima MMP-2 (FIG.7A; 7B) em todos os animais tratados com as diferentes doses de Bz. No entanto, ao avaliarmos a atividade desta MMP nos animais tratados com ENA observou-se um aumento significativo da mesma, principalmente, nos animais tratados com as doses de 20 e 15 mg/Kg. Somente nos animais tratados com a combinação de 100+25 mg/Kg (Bz+ENA) a atividade de MMP-2 mostrou-se elevada. Todavia, na avaliação da atividade da MMP 9 (FIG.7A; 7C) nos animais tratados com as diferentes doses de Bz houve redução de sua atividade em relação ao grupo infectado não tratado. Porém nos animais tratados com ENA foi possível observar que apenas o tratamento com a dose de 15 mg/Kg elevou a atividade proteolítica da MMP-9.

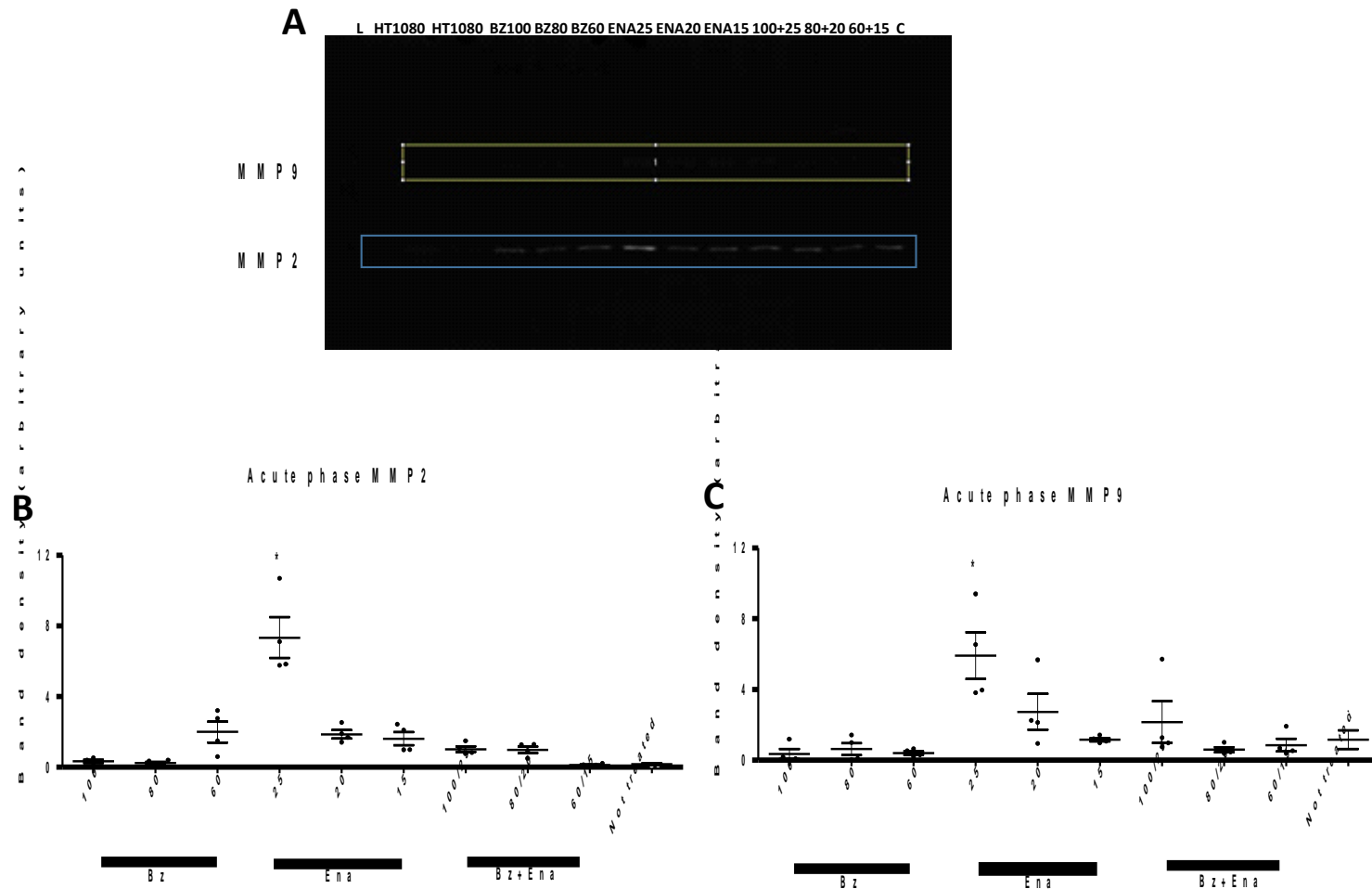


Figura 6. Atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz) na fase aguda. Avaliação da atividade das enzimas MMP-2 (A,B) e da MMP-9 (A,C). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle infectado e não tratado.

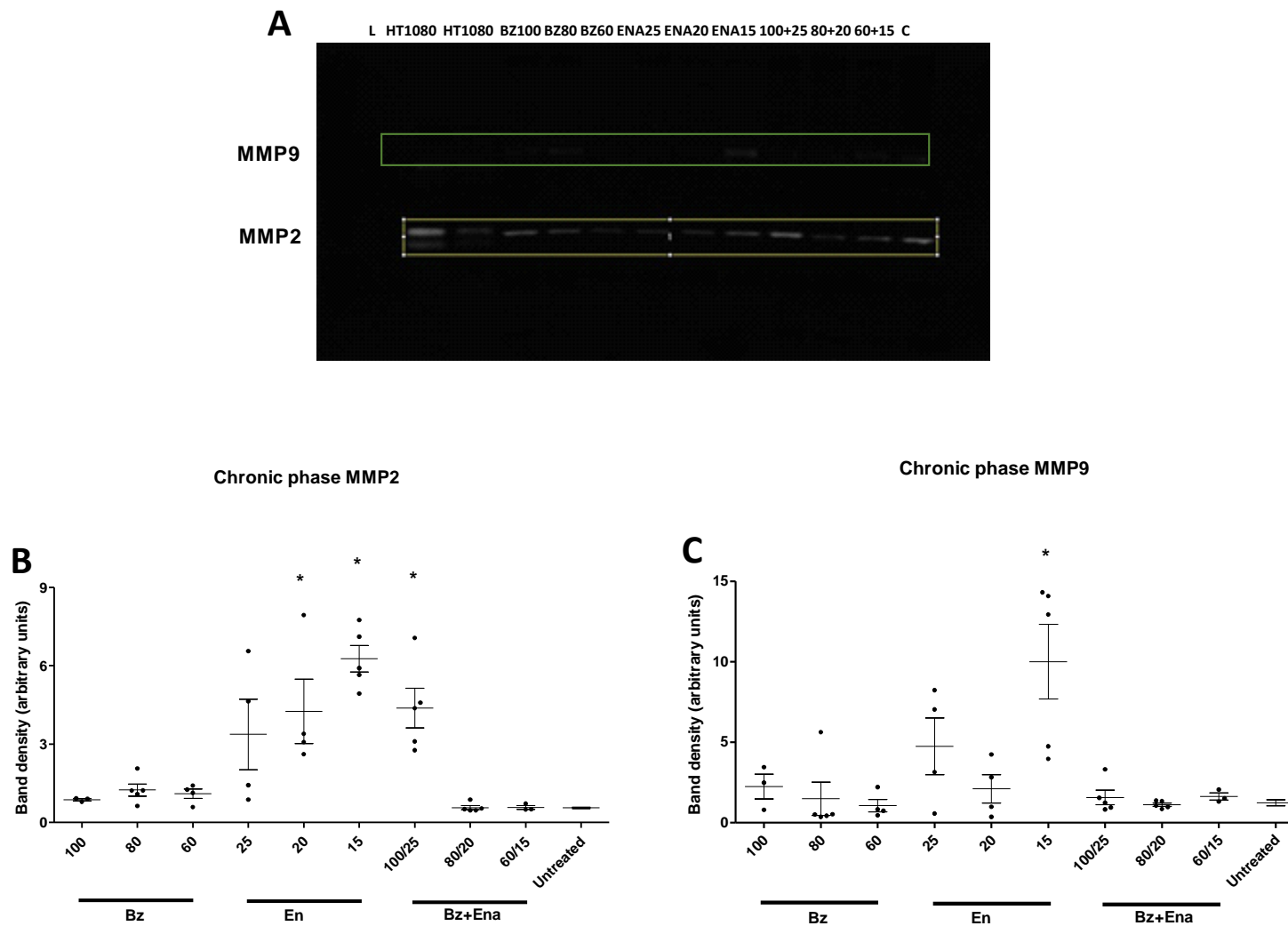


Figura 7. Atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, tratados ou não com Enalapril (Ena) e/ou Benznidazol (Bz). Avaliação da atividade da MMP-2 (A,B) e da MMP-9 na fase crônica (C,D). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle infectado e não tratado.

5.4. *Quantificação do processo inflamatório*

O efeito do tratamento com Enalapril e/ou Benznidazol também foi observado sobre as alterações histopatológicas cardíacas durante as fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* e os resultados quantitativos e qualitativos estão apresentados nas figuras 8, 9, 10 e 11, respectivamente.

Na fase aguda todos os animais infectados e não tratados apresentaram processo inflamatório cardíaco, sendo o mesmo focal e discreto (FIG.9B). Observou-se redução do processo inflamatório nos animais tratados com Bz (FIG.8A). No entanto nos animais tratados com a dose de 80mg/kg deste fármaco foi observado uma redução do processo inflamatório quando comparado com os demais grupos tratados com o Bz e com o grupo infectado não tratado (FIG.9D). Ressalta-se que os animais tratados com 100 e 60mg/kg de Bz não apresentaram infiltrado inflamatório (FIG.9C, 9E). Contudo, todos os animais dos grupos tratados com ENA apresentaram o processo inflamatório (FIG.8B), independente da dose utilizada, sendo similar ao grupo de animais infectados e não tratados (FIG.9F,9G,9H). Todavia, todos os animais tratados com as respectivas combinações (Bz+ENA) foi observado uma redução no processo inflamatório (FIG.8C) principalmente com a combinação 100+25mg/kg que apresentou melhor redução da inflamação, não observado em 75% dos animais avaliados (FIG.9I).

Na fase crônica da infecção, todos os animais infectados e não tratados apresentaram processo inflamatório cardíaco (FIG.11B). Nos animais tratados com as doses de 100 mg/kg e 80mg/kg de Bz (FIG.10A; FIG.11C,11D) não foi observado presença de infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo controle infectado não tratado e este foi discreto nos animais tratados com 60mg/kg. Entretanto, o tratamento com ENA (FIG.10B; FIG.11F,11G,11H) não apresentaram redução no processo inflamatório, independente da dose utilizada, não sendo os mesmos diferentes do grupo controle infectado. Nos animais tratados com as combinações de 100+25mg/kg e 60+15mg/kg (FIG.10C; FIG.11I,11K) houve redução do processo inflamatório cardíaco. Todavia, 67% dos animais tratados com a combinação de 80+20mg/kg (FIG.10C; FIG.11J) apresentaram infiltrado inflamatório discreto e focal.

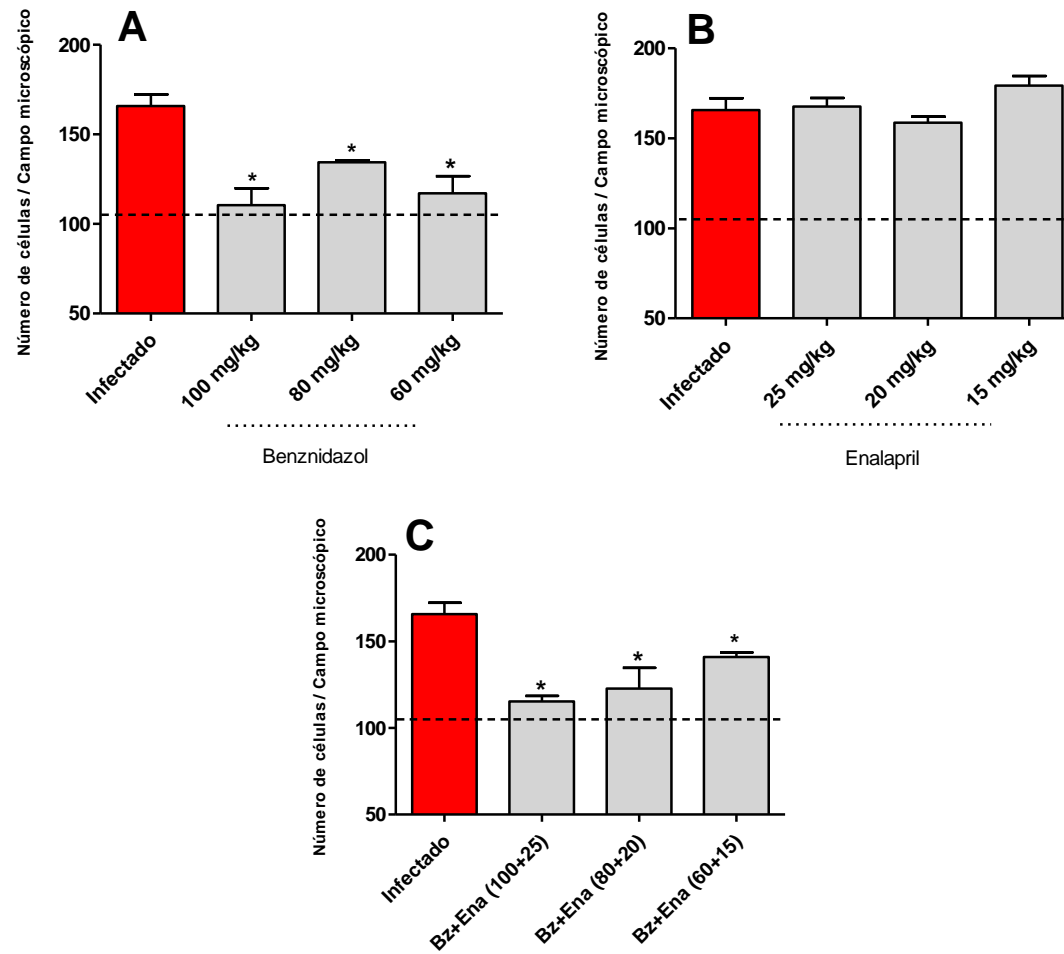


Figura 8. Quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase aguda. Análise do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco de animais infectados e tratados com Bz (A), ENA (B) e combinações (C). * $p > 0,05$ comparado com o grupo controle infectado e não tratado. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados ($n=5$).

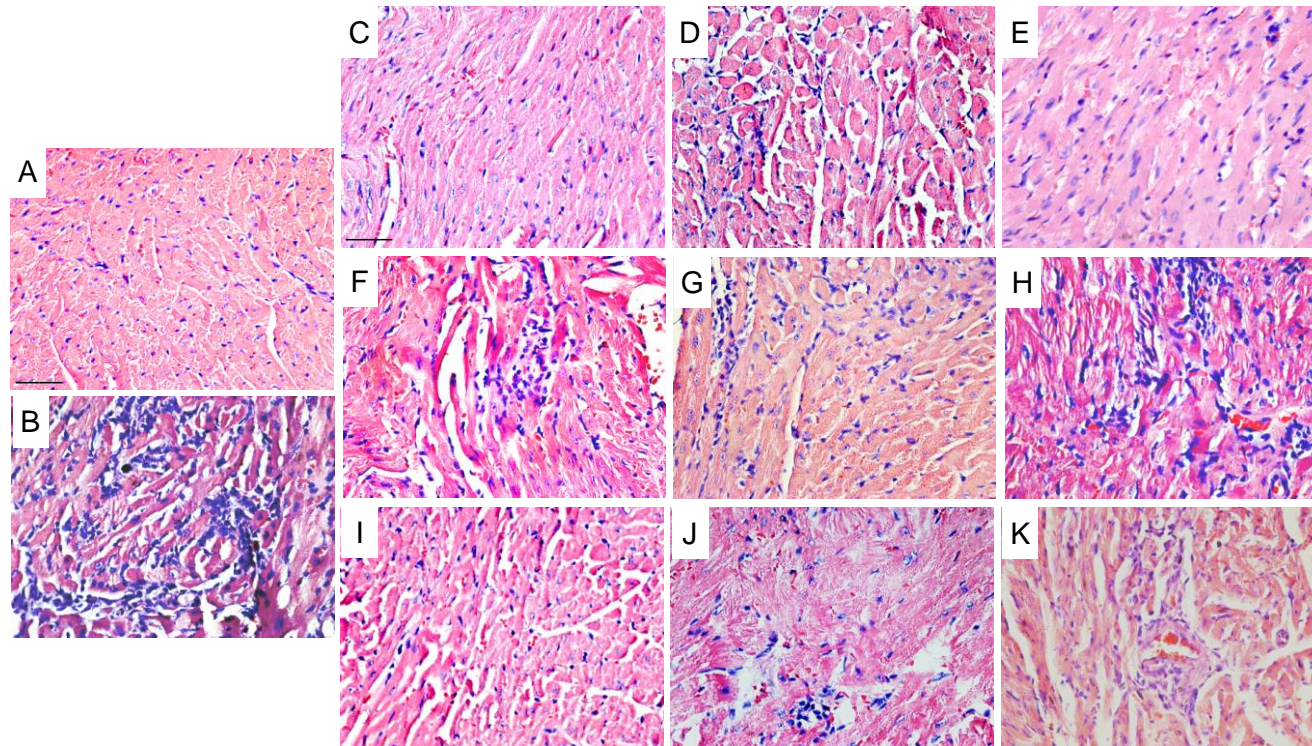


Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase aguda. (A) Aspecto histológico cardíaco normal em animais não-infectados; (B) Infiltrado inflamatório moderado e focal de animais infectados e não tratados; (C,E) Ausência de infiltrado inflamatório de animais infectados e tratados com as doses 100 e 60 mg/Kg de Bz; (D) Processo inflamatório discreto e focal de animais infectados e tratados com a dose de 80 mg/Kg; (F,G,H) Infiltrado inflamatório difuso e moderado de animais tratados com as doses de 25,20,15 mg/Kg de ENA; (I) Ausência de processo inflamatório em animais tratados com a combinação de 100+25 mg/Kg; (J,K) Processo inflamatório discreto e focal de animais tratados com as combinações 80+20mg/kg; 60+15mg/kg. Hematoxilina-Eosina. Barra=50 μ m².

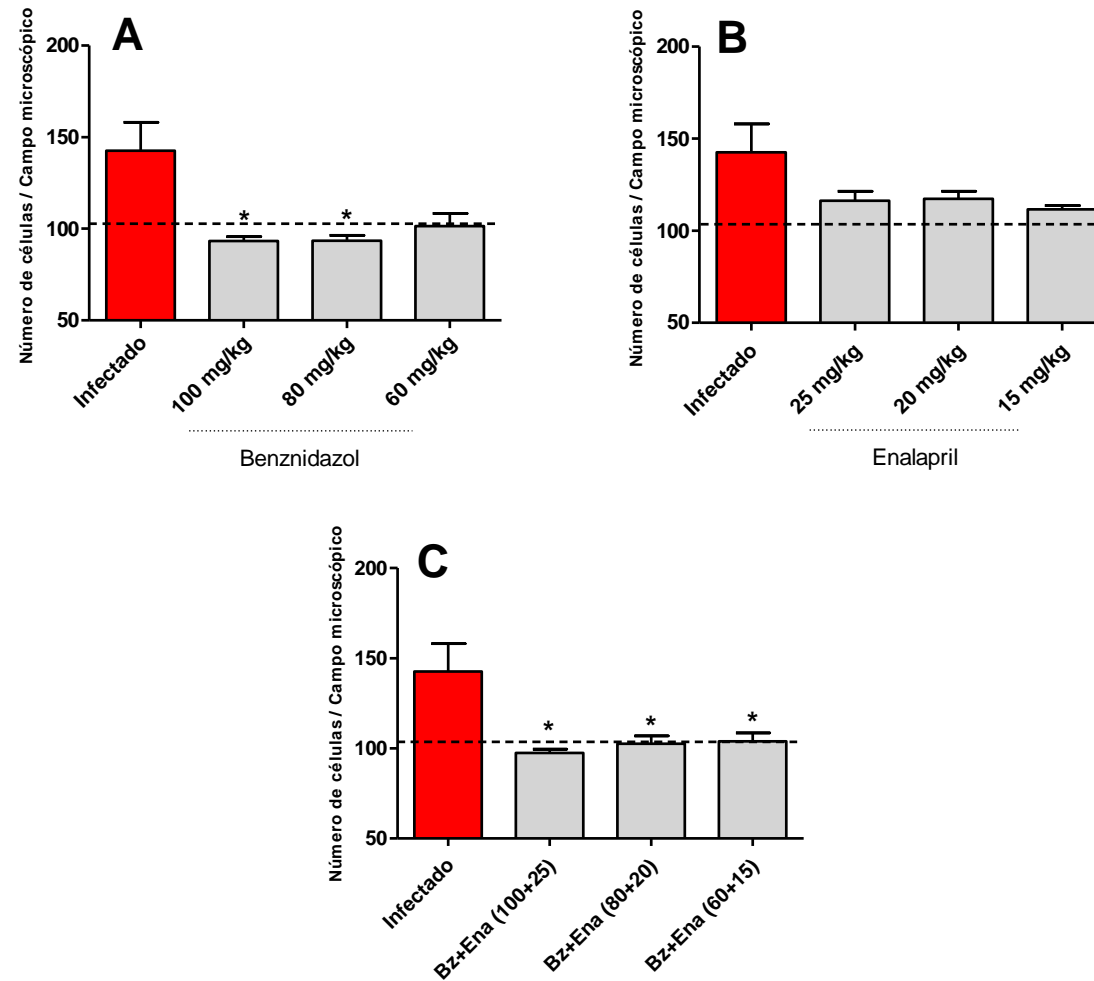


Figura 10. Quantificação do processo inflamatório no músculo cardíaco de camundongos infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. Análise do infiltrado inflamatório no tecido muscular cardíaco de animais infectados e tratados com Bz (A), ENA (B) e combinações (C). * $p > 0,05$ comparado com o grupo controle infectado e não tratado. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados (n=5).

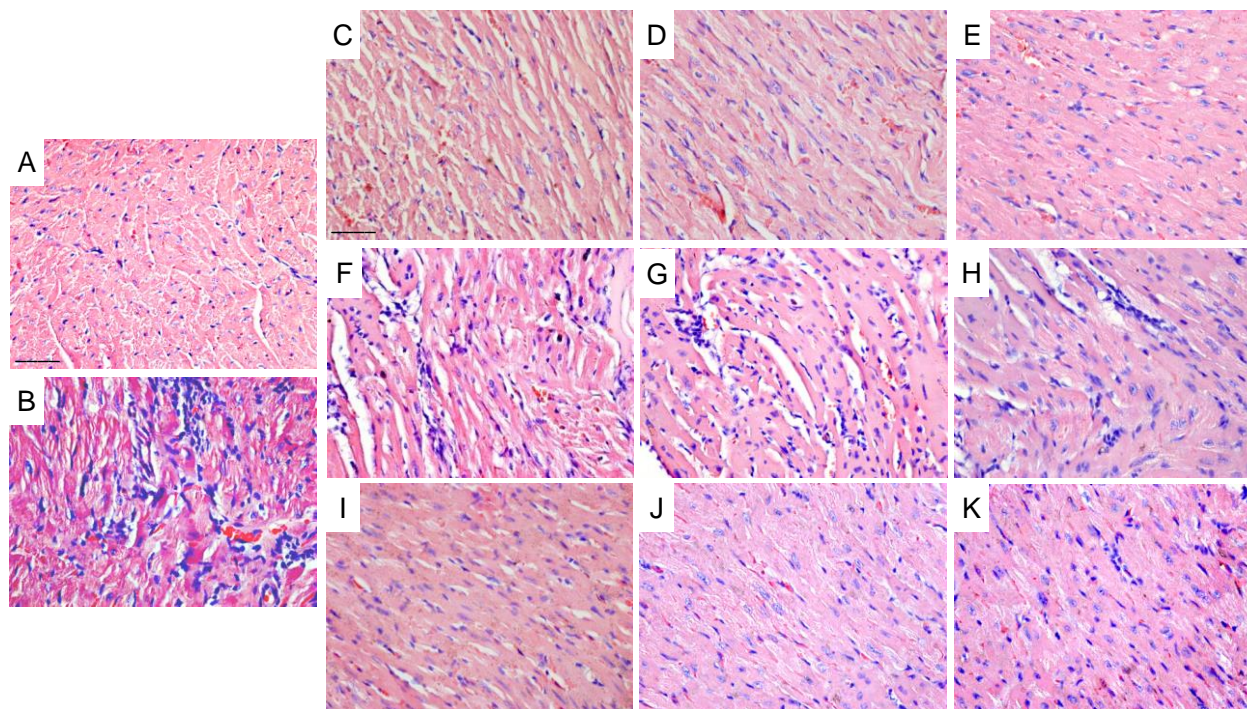


Figura 11. Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. (A) Aspecto histológico cardíaco normal em animais não-infectados; (B) Infiltrado inflamatório moderado e focal de animais infectados e não tratados; (C,D) Ausência de infiltrado inflamatório de animais infectados e tratados com as doses 100 e 80 mg/Kg de Bz; (E) Processo inflamatório discreto e focal de animais infectados e tratados com a dose de 60 mg/Kg; (F,G,H) Infiltrado inflamatório discreto e difuso nos animais tratados com as doses de 25,20,15 mg/Kg de ENA; (I,K) Ausência de processo inflamatório em animais tratados com as combinações 100+25 e 60+15mg/kg; (J) Processo inflamatório discreto e focal de animais tratados com a combinação 80+20mg/kg. Hematoxilina-Eosina. Barra=50 μ m².

5.5. Avaliação da neoformação de colágeno

Nas figuras 12 e 13 estão representados os dados referentes à análise semi-quantitativa da neoformação de colágeno no tecido muscular cardíaco na fase crônica da infecção experimental pela cepa “VL-10” do *T. cruzi*. Apenas 50% dos animais do grupo infectado não tratado apresentaram neoformação de colágeno discreta (FIG.12, 13A). A partir desse dado os animais dos outros grupos foram avaliados comparativamente. Nos grupos tratados com as diferentes doses de Bz (FIG. 12;13B) pode-se observar que 100% dos animais não apresentaram neoformação de colágeno no tecido muscular cardíaco. Todavia nos animais tratados com as doses de 25, 20 e 15 mg/Kg de ENA observou-se discreta neoformação de colágeno (FIG.12,13B) em 75%, 75% e 80 % dos animais, respectivamente. Contudo, em relação aos grupos tratados com as diferentes combinações 100+25mg/Kg; 80+20mg/Kg; 60+15mg/Kg (FIG.12;13A) observou-se que a maioria dos animais apresentaram ausência de neoformação de colágeno (60%, 67% e 67%), respectivamente.

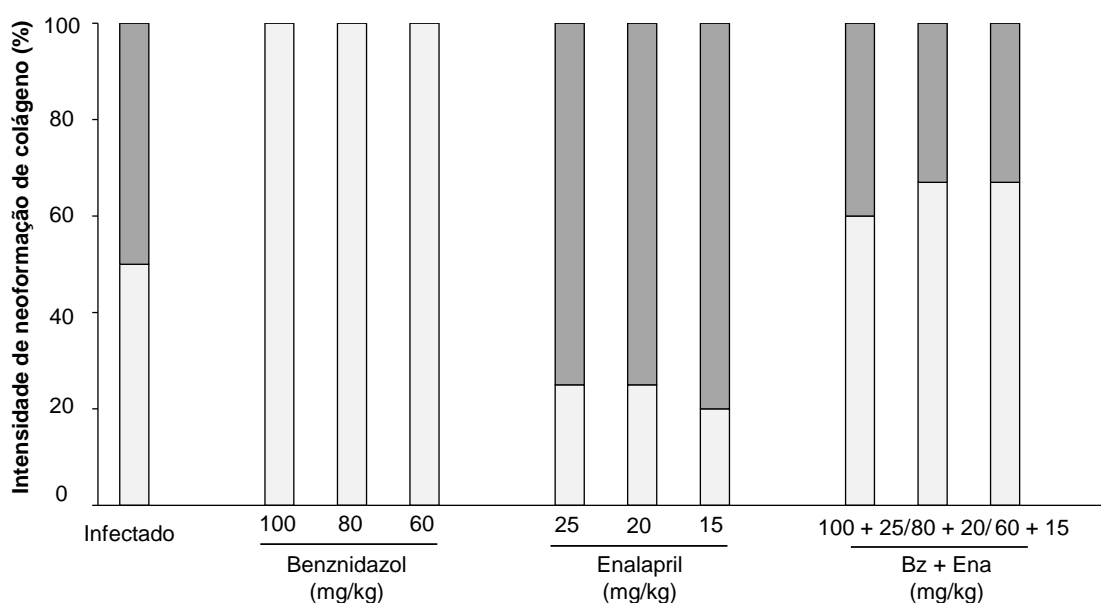


Figura 12. Análise semi-quantitativa de neoformação de colágeno no tecido muscular do coração de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. Análise da deposição de colágeno no tecido muscular cardíaco representada pela porcentagem de camundongos C57BL/6 com Ausência de neoformação de colágeno; Neoformação de colágeno discreta; Neoformação de colágeno moderada; Neoformação de colágeno intensa.

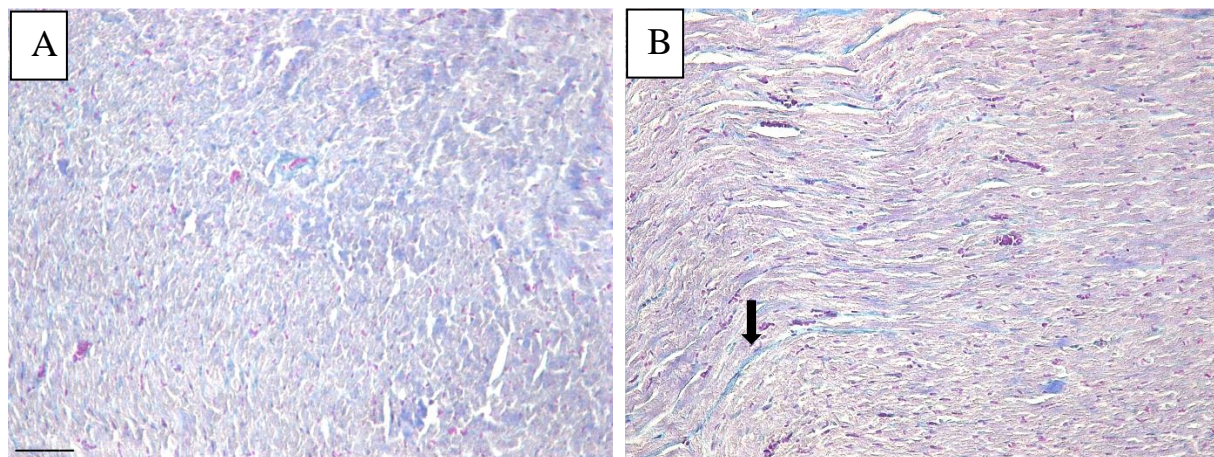


Figura 13. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com 5.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi* tratados ou não com Enalapril e/ou Benznidazol na fase crônica. (A) Aspecto histológico cardíaco normal, com ausência de neoformação de colágeno, como observado para 50% dos animais não tratados e em 100% dos animais tratados com as diferentes doses de Bz; (B) Neoformação de colágeno discreta e focal (seta) como observado em 50% dos animais infectados e não tratados, bem como para a maioria dos animais tratados com as diferentes doses de ENA e para alguns animais tratados com as diferentes combinações. Tricômico de Masson. Barra=50 μ m².

6. DISCUSSÃO

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) são fármacos prescritos na clínica médica para a redução/controle da pressão sanguínea arterial, e redução dos riscos cardiovasculares em pacientes hipertensos com o objetivo de reduzir a morbimortalidade em pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva e infarto agudo do miocárdio. Eles ainda promovem proteção renal (Oliveira *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2005), e apresentam efeitos pleiotrópicos sobre diversos mediadores inflamatórios além de reduzir o remodelamento cardíaco e melhorar a função vascular (Brooks *et al.*, 1997; Ferrari, 2006; Yokota *et al.*, 2014). A terapia com os IECAs tem sido eficaz não só para o controle da hipertensão e das cardiopatias (Fontana *et al.*, 2012), mas também na modulação do sistema imune relacionado com várias doenças distintas, como a patologia decorrente da infecção pelo *T. cruzi* (Leon *et al.*, 2003; Paula-Costa *et al.*, 2010; Penitente & Leite *et al.*, 2015).

Relativo à infecção pelo *T. cruzi*, estes fármacos foram capazes de reduzir o processo inflamatório tanto em seres humanos quanto em modelo murino (Botoni *et al.*, 2007; Paula-Costa *et al.*, 2010). O tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* com a dose 25 mg/kg de Enalapril (ENA) reduziu a produção da citocina pró-inflamatória TNF bem como da quimiocina CCL5, mas não alterou o perfil da citocina anti-inflamatória IL-10 na fase aguda da infecção. No presente estudo os dados relativos à citocina TNF corroboram com o trabalho de Paula-Costa *et al.*, (2010) quanto aos níveis plasmáticos da quimiocina CCL5 não houve a redução observada por estes autores possivelmente pela diferença da cepa do parasito utilizada, uma vez que o processo inflamatório com a cepa VL-10 é menor consequentemente, as alterações na produção dos mediadores inflamatórios também foram reduzidas como observado por Penitente & Leite *et al.*, (2015).

Na fase aguda da infecção a resposta imunológica exacerbada é normalmente observada no miocárdio de indivíduos infectados, levando a danos associados que em casos extremos pode levar a uma resposta inflamatória sistêmica e até mesmo à morte (Laranja, 1949; Rossi, 1991; Gutierrez *et al.*, 2009). A miocardite crônica se dá em decorrência de um infiltrado inflamatório mononuclear, seguido de fibrose intersticial e difusa. Os sinais histológicos desse processo são evidentes: áreas de degeneração e

necrose de fibras cardíacas isoladas, com áreas de adensamento de infiltrado e com focos de fibrose em vários graus de colagenização ou maturação (Andrade, 1985). Durante a fase crônica, o processo inflamatório é fibrosante e degenerativo, e o equilíbrio entre a resposta imune mediada pelo parasito e a inflamação prejudicial aos tecidos do hospedeiro provavelmente determina o curso da doença. Se a resposta imune é ineficiente, ou paradoxalmente leva a danos teciduais, tanto a carga parasitária quanto a inflamação mediada pelo sistema imune estarão aumentados. Em contrapartida, uma resposta imune efetiva em que a carga parasitária e a inflamação são reduzidas, consequentemente resultará em menores danos teciduais (Rassi Jr *et al.*, 2010).

No estudo de Leon *et al.*, (2003) avaliou-se a intensidade da miocardite aguda em camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados com captopril na dose de 5 mg/L. Observou-se que a intensidade da inflamação, necrose e fibrose eram significativamente menores no grupo tratado, além do aumento do tempo médio de vida dos animais. Nos trabalhos de Paula-Costa *et al.*, (2010) e Penitente & Leite *et al.*, (2015) o tratamento foi realizado com a dose de 25 mg/Kg de ENA e capaz de reduzir o infiltrado inflamatório cardíaco na fase aguda e crônica, respectivamente. No presente estudo os animais tratados com as monoterapias de ENA apresentaram quantidade de infiltrado inflamatório semelhante ao observado no grupo infectado não tratado, tanto na fase aguda como na fase crônica. Os animais tratados com fármacos administrados em associação apresentaram uma redução mais acentuada da inflamação reforçando a idéia de que o ENA e o Bz podem ser associados no tratamento sem que haja antagonismo, pelo menos quando o foco de análise é o parasitismo e a resposta inflamatória. Caldas *et al.*, (2008) mostraram que o tratamento específico na fase inicial da infecção é eficaz na redução dos níveis de parasitemia na infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos, mas o seu sucesso na prevenção de alterações cardíacas na fase crônica seria cepa-dependente. No presente estudo o tratamento com o Bz na fase aguda foi capaz de reduzir a inflamação no tecido muscular cardíaco durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. A diferença entre os modelos experimentais utilizados (espécies diferentes dos hospedeiros) torna-se um relevante aspecto a ser considerado ao se discutir as alterações patológicas na infecção pelo *T. cruzi*. Estudos anteriores mostraram que a cepa VL-10 induz elevada inflamação e destruição tecidual em camundongos *Swiss* e cães (Caldas *et al.*, 2013; Bahia *et al.*, 2012). Todavia, em nosso estudo, camundongos C57BL/6 infectados com pequeno inóculo da cepa VL-10 pode-se

observar que a produção de mediadores inflamatórios no plasma, bem como o infiltrado inflamatório não foram intensos como observados para os camundongos *Swiss*.

Inicialmente pode-se pensar que parte destas variações observadas entre os diferentes estudos possam relacionar-se com a via de formação da Angiotensina (1-7). A Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) é um importante produto do SRA. Estudos demonstraram que a Ang 1-7 atuando no seu receptor específico possui ações centrais no controle cardiovascular (Campagnole-Santos *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994). Dentre elas: ativando vias de sinalização que desencadeiam efeitos antiproliferativos, reduzindo arritmias e reperfusão, estimulando a vasodilatação, modulando a atividade simpática, inibindo a proliferação celular e a fibrose (Phillips *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 2002; Gembardt *et al.*, 2005; Boim *et al.*, 2011); além de atuar na diminuição dos níveis do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e estimulando a produção de adenosina mono-fosfato cíclica (AMPC) (Soto-Pantoja *et al.*, 2009; Boim *et al.*, 2011), que de certa forma apresentam ação antagônica da Ang-(1-7) quando comparado aos efeitos do peptídeo angiotensina II (Ang II) ao se ligar no receptor AT1. Vários estudos têm apontado que o coração e os vasos sanguíneos são os principais alvos para as ações da Ang-(1-7), as quais incluem alterações bioquímicas e funcionais levando à vasodilatação e a melhora da função cardíaca (Ferrario *et al.*, 1997; Botelho-Santos *et al.*, 2007; Castro, 2008). Outro ponto interessante é que a atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2 - degrada angiotensina II em Angio 1-7) não é afetada por inibidores específicos da ECA. No entanto, maiores estudos focando o papel da Ang-(1-7) na infecção pelo *T. cruzi* são ainda necessários.

Atualmente poucos trabalhos relatam a resposta de terapias com fármacos que atuem na via de formação da Angio II na infecção pelo *T. cruzi*; haja visto o papel desse peptídeo quando se liga ao seu receptor AT1 na produção de mediadores inflamatórios, no recrutamento de leucócitos e nos aspectos clínicos apresentados por pacientes chagásicos após o tratamento com inibidores da ECA e dos receptores da Angio II. Contudo, acredita-se que a ação do Enalapril (ENA) sobre a regulação do sistema imune durante a infecção pelo *T. cruzi* parece estar relacionada com a genética do parasito. Apesar de ambas as cepas avaliadas serem resistentes ao tratamento com o Bz, a cepa Colombiana pertence ao grupo *T. cruzi* I (DTU I) e a cepa VL-10 ao grupo *T. cruzi* II (DTU II) apresentando diferenças genéticas, bioquímicas e biológicas (Zingales *et al.*, 2009). Portanto, a variabilidade genética do parasito e do hospedeiro parecem atuar

como fatores determinantes para o desenvolvimento e manutenção da infecção pelo *T. cruzi* influenciando no resultado da infecção por este protozoário. É possível ainda que o tropismo diferencial do parasito para os diferentes tipos de células e tecidos envolvidos na infecção natural possa explicar, em parte, as diferenças observadas na virulência tanto em pacientes chagásicos quanto em modelos experimentais (Rodriguez *et al.*, 2014).

A fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* usualmente reflete uma pré-condição observada durante as etapas iniciais entre o parasito e seu hospedeiro. No presente estudo experimental, as terapias de combinação foram capazes de reduzir os níveis plasmáticos da quimiocina CCL2, corroborando com o estudo de Penitente & Leite *et al.*, 2015. Porém em relação a quimiocina CCL5, somente as doses de 80 e 60 mg/Kg de Bz reduziram a produção desse mediador e, ainda, o tratamento isolado com as doses de 25 e 15 mg/Kg de ENA e as combinações de 100+25; 80+20 mg/Kg proporcionaram aumento da produção plasmática da citocina IL-10. Outro aspecto importante a ser considerado é a influência da parasitemia na ativação da resposta imune e a respectiva patologia observada na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* (Borges *et al.*, 2012). Nesse sentido, ressalta-se que as divergências encontradas em ambos os trabalhos se devem à quantidade de parasitos inoculados e ao esquema terapêutico que foram alterados em função das particularidades de cada estudo.

Um dos aspectos mais notáveis da fase crônica é a progressiva destruição da função cardíaca, devido principalmente ao desarranjo estrutural, consequente de um processo inflamatório intenso. A matriz extracelular cardíaca (MECC) participa ativamente do processo de migração de células inflamatórias (Spinale, 2002), como alguns dos seus componentes precisam ser clivados, a fim de estabelecer o infiltrado inflamatório no tecido. As metaloproteinases de matriz (MMP) são essenciais para a ruptura local da MECC durante a inflamação e remodelamento tecidual. Estas enzimas estão particularmente ativas na MECC em resposta a vários estímulos, que vão desde isquemia à inflamação (Gutierrez *et al.*, 2009). O aumento da atividade de MMP (principalmente da MMP 9) foi relatado durante a progressão de insuficiência cardíaca devido a outras etiologias (Tsuruda *et al.*, 2004). Enquanto a participação das MMPs na inflamação cardíaca aguda foi demonstrada (Gutierrez *et al.*, 2008), o seu papel no remodelamento da estrutura do miocárdio durante a fase crônica da doença continua a ser uma lacuna a ser investigada. Nossos dados mostram que na fase aguda, o tratamento com as associações entre Ena e Bz foram capazes de reduzir a atividade das

MMPs 2 e 9. No entanto, na fase crônica apenas a combinação de 100+25 mg/Kg não foi capaz de reduzir a atividade de MMP 2; porém em relação à atividade da MMP 9 todas as combinações reduziram sua atividade. Esses dados são muito promissores principalmente quando se diz respeito ao esquema terapêutico utilizado, pois mesmo utilizando a cepa VL-10 do parasito que é resistente ao tratamento pelo Bz, observamos benefícios com as terapias envolvendo ENA e BZ. Demonstramos ainda não ter necessidade de utilizar suas doses máximas durante as terapias em combinação, o que é essencial em se tratando do Bz que apresenta elevada toxicidade. Esta constatação foi baseada, em particular, com a combinação utilizando as doses de 60mg/Kg de Bz e 15mg/Kg de ENA cujos resultados foram satisfatórios na redução da resposta inflamatória tecidual, no controle parasitário, na atividade das MMPs durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*; bem como no processo de neoformação de colágeno na fase crônica.

Diante da ineficácia dos atuais fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas, novas estratégias farmacológicas têm sido propostas, tanto para eliminar o parasito (novos alvos terapêuticos), quanto para amenizar a resposta inflamatória do hospedeiro mamífero, co-responsável pela gênese das alterações clínicas observadas na infecção pelo *T. cruzi*. Porém, o maior desafio encontra-se na fase crônica. Como sabido o tratamento com o Bz é eficaz na erradicação do parasita principalmente na fase aguda da infecção, mas esse efeito não prevalece na fase crônica da doença (Garcia *et al.*, 2005). No entanto a maioria dos estudos tratam o animal na fase aguda mas não o avaliam na fase crônica. Embora o evento mais importante na infecção experimental pelo *T. cruzi* pareça ocorrer nos primeiros 30 dias de infecção, quando os parasitos ainda estão em replicação e a resposta imune nos camundongos está mais ativa (Penitente & Leite *et al.*, 2015), acredita-se que potenciais intervenções terapêuticas precoces atuem redefinindo o curso patológico no tecido muscular cardíaco e até prevenindo danos futuros a este órgão. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento na fase inicial reflete em mudanças na fase crônica, onde a combinação de 100+25 mg/Kg foi capaz de reduzir os níveis das proteínas creatina quinase, creatina quinase MB e C-reativa, todas indicadoras de danos cardíacos (Penitente & Leite *et al.*, 2015). No presente estudo reforçou-se que a terapia em combinação apresentou efeitos positivos tanto na fase aguda quanto na crônica de camundongos C57BL/6, inclusive interferindo em vias de atuação do processo de remodelamento cardíaco, como ocorreu com as MMPs.

Além de atuar como regulador da resposta inflamatória, o ENA em sua forma isolada ou em associação com o Bz em diferentes doses também parece alterar a parasitemia. Possivelmente este fato ocorre devido a toxicidade apresentada pelo ENA dependente do citocromo P450. Como sabido o *Trypanosoma cruzi* é deficiente em mecanismos de desintoxicação para metabólitos do oxigênio o que o torna mais sensível ao estresse oxidativo do que as células de vertebrados (Docampo, 1990). No entanto, juntamente com enzimas derivadas da glutathione (por exemplo, tripanotiona), o citocromo P450 contribui para redução do estresse oxidativo e desintoxicação em tripanosomatídeos (Krauth-Siegel *et al.*, 2003). O grupo tiol (ausente na molécula do enalapril) ainda desempenha papel protetor antioxidante. Paula-Costa *et al.*, (2010) mostraram que a persistência do parasito no sangue, no tecido e *in vitro* foi parcialmente afetada pela terapia com ENA, resultando em queda acentuada da parasitemia, do parasitismo tecidual e da replicação em cultivo celular.

Sumarizando, nossos resultados mostraram que a terapia em combinação com o Maleato de Enalapril e o Benznidazol administrada na fase inicial da infecção pelo *T. cruzi* é, no mínimo, promissora, pois mostrou-se efetiva na redução da parasitemia, dos marcadores inflamatórios plasmáticos, da inflamação em tecido muscular cardíaco, bem como pela redução da atividade das MMPs e neoformação de colágeno durante as fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

7. CONCLUSÃO

A terapia em combinação utilizando o Maleato de Enalapril e o Benznidazol mostrou-se eficiente para redução da parasitemia e da resposta inflamatória sistêmica e tecidual em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAJAR-VIÑAS, P.; COURA, J. R. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104, 1139-1147. 2009.

ALIBERTI, J.C.; SOUTO, J.T.; MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am.J.Pathol.* 158:1433-1440. 2001.

ANDRADE, A. L.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, S.A.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L.R.; ALMEIDA, I.C.; ANDRADE, S.S.; ANDRADE, J.G.; MARTELLI, C.M.T. Randomised trial of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 348:1407-1413. 1996.

ANDRADE, Z. A. A patologia da doença de Chagas no homem. *Ann. Soc. Belge Méd. trop.* 65, 1: 15-30. 1985.

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

ARAUJO, F. F.; GOMES, J. A; ROCHA, M.O.; *et al.* Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 12:2797-2806. 2007.

ARAUJO, F. F.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O.; *et al.* Foxp3+CD25 (high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*. 217: 768-777. 2012.

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.

BAHIA, M. T.; DE ANDRADE, I. M.; MARTINS, T. A.; DO NASCIMENTO, Á. F.; *et al.* Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 6, 1870. 2012.

BOIM, M. A.; ZATZ, R.; TEIXEIRA, V. P. C. Modulação humoral da função renal. In: Roberto Zatz; Antonio Carlos Seguro; Gerhard Malnic. (Org.). Bases Fisiológicas da Nefrologia, São Paulo, ED. Atheneu, p. 25-43, 2011.

BORGES, D. C.; ARAUJO, N. M.; CARDOSO, C. R.; CHICA, J. E. L. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 138: 145-156. 2012.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C. T.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; *et al.* Chagas disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cell. Mol. Med.* 14:1373-1384, 2010.

BOTELHO-SANTOS, G. A.; SAMPAIO, W. O.; REUDELHUBER, T. L.; BADER, M.; *et al.* Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H2485-2490. 2007.

BOTONI, F. A.; POOLE-WILSON, P. A.; RIBEIRO, A. L. P.; OKONKO, D. O.; *et al.* A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *American Heart Journal.* 153, 544. 2007.

BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.* 2:236-242. 2012.

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

BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81.3: 527. 1987.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *International Archives of Allergy and Immunology.* 114: 103-110. 1997.

BROOKS, W. W.; BING, O. H.; ROBINSON, K. G.; SLAWSKY, M. T.; CHALETSKY, D. M.; CONRAD, C. H. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 96:4002-4010. 1997.

CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; CALDAS, S.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; DA MATTA GUEDES, P.M.; BAHIA, M.T. Benzimidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol. Res.* 103, 413-421. 2008.

- CALDAS, I. S.; GUEDES, P. M. M.; DOS SANTOS, F. M.; DINIZ, L. F.; *et al.* Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop Med Int Health*. 18, 75-84. 2013.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HERINGER, S. B.; BATISTA, E. N.; KHOSLA, M. C.; *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 263, 89–94. 1992.
- CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm*. 13:139-143. 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.
- CASTRO, C. H. Avaliação dos efeitos da angiotensina-(1-7) e do seu receptor mas no controle da função cardíaca utilizando animais geneticamente modificados. Tese (Doutorado Ciências, área de concentração Fisiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94, 1:309-310. 1999.
- 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.
- 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.; CASTRO, S. L. “A critical review on Chagas disease chemotherapy”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97, 1:3–24. 2002.
- CUNHA, V.; THAM, D. M.; MARTIN- MC NULTY, B.; DENG, G. Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation. *Atherosclerosis*. 178, 9-17. 2005.
- DALIRY, A.; CALDAS, I. S.; DE FIGGUEIREDO DINIZ, L.; TORRES, R. M.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T.; DE CARVALHO, A. C. Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazole. *Int J Cardiol*. 170:e66- 7. 2014.

DE MELLO, W.C.; FROHLICH, E.D. Clinical Perspectives and Fundamental Aspects of Local Cardiovascular and Renal Renin-Angiotensin Systems. *Front Endocrinol, Lausanne*. 5,16. 2014.

DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease (American trpanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT*, São Paulo 49-80. 1992.

DIAS, J.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas Disease control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (1):103-121. 1999.

DINIZ, L. F.; URBINA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; MAZZETI, A. L.; MARTINS, T. A. F. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(8): e2367. 2013.

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

DOMINGUES, C. S.; HARDOIM, D. J.; SOUZA, C. S. F. *et al.* Oral outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's strain. *PLoS One*. 10(10): e0122566. 2015.

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.; MENEZES, C. S. A.; MAGALHÃES, L. M. D.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 36 (8): 377-387. 2014.

FERRARI, R. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition with perindopril on left ventricular remodeling and clinical outcome: results of the randomized perindopril and remodeling in elderly with acute myocardial infarction (preami) study. *Arch Intern Med*. 166:659–66. 2006.

FERRARIO, C.M.; *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 30, 3: 535–541.1997.

FERRARIO, C. M.; STRAWN, W. B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 98, 212-128. 2006.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of diferente strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agentes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.79:221-225. 1984.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 81, 5: 755-59. 1987.

FONTANA, V.; SILVA, P. S.; IZIDORO-TOLEDO, T. C.; *et al.* Comprehensive evaluation of the effects of enalapril on matrix metalloproteinases levels in hypertension. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26: 511-519. 2012.

FONTES, M. A. P.; SILVA, L. C. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; KHOSLA, M. C.; GUERTZENSTEIN, P. G.; SANTOS, R. A. S. Evidence that angiotensin-(1-7) play a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptor. *Brain Res.* 1:175-180. 1994.

GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F.; VILAS-BOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 437, 49:1521-8. 2005.

GEMBARDT, F.; *et al.* Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides.* 26, 7: 1270-1277. 2005.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics.* 2011.

GIESTAS, A.; PALMA, I.; RAMOS, M., H. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA e sua Modulação Farmacológica. *Acta Med Port.* 23, 677-688. 2010.

GOMES, Y. M.; PEREIRA, V. R. A.; NAKAZAWA, M. *et al.* "Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96, 4: 497-501. 2001.

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

GUTIERREZ, F. R.; LALU, M. M.; MARIANO, F. S.; MILANEZI, C. M.; CENA, J.; GERLACH, R. F.; SANTOS, J. E.; TORRES-DUEÑAS, D.; CUNHA, F. Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J. S. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis.* 197(10):1468-76. 2008.

GUTIERREZ, F. R. S.; GUEDES, P. M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology.* 31:673-685. 2009.

HIGASHIKUNI, Y.; TANAKA, K.; KATO, M.; NUREKI, O.; HIRATA, Y.; NAGAI, R.; KOMURO, I.; SATA, M. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 β upregulation via nuclear factor κ B activation. *J Am Heart Assoc.* 2, e000267. 2013

HIGUCHI, M. L.; BENVENUTI, L. A.; REIS, M. M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas Disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research.* 60: 96-107. 2003.

KONSTAM, A. M.; ROSSEAU, F. M.; KRONENBERG, W. M.; *et al.* Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. *Circulation.* 86:431-438. 1992.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zimography. *J Pharmacol and Toxicol Methods.* 61: 205-209. 2010.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; MEIERING, S. K.; SCHMIDT, H. The parasitespecific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol Chem.* 384: 539–549. 2003.

LANA, M.; LOPES, L. A.; MARTINS, H. R.; *et al.* Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 1139-1147.2009.

LANA, M.; LOPES, L. A.; MARTINS, H. R.; BAHIA, M. T.; MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; WENDLING, A. P.; MARTINS-FILHO, O. A.; MONTROYA, R. A.; DIAS, J. C.; MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; KIRCHHOFF, L. V.; *et al.* Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev.* 20, 2: 53-65. 2012.

LANA, M. D.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts and polemics or time to change old concepts? *BioMed Research International.* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/652985>. 2015.

LARANJA, F. S. Evolução dos conhecimentos sobre a cardiopatia da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 47: 605-669. 1949.

LEON, J. S.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. *Circulation.* 107: 2264-2269. 2003.

LI, Y. Y.; McTIERNAN, C. F.; FELDMAN, A. M. Interplay of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular Research*. 46, 2:214-224. 2000.

MACFADYEN, R. J.; MEREDITH, P. A.; ELLIOTT, H. L. Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. An overview. *Clinical Pharmacokinet*. 25, 274-282. 1993.

MACHADO-DE-ASSIS, G. F.; SILVA, A. R.; DO BEM, V. A.; BAHIA, M.T.; MARTINS-FILHO, O. A.; DIAS, J.C.; ALBAJAR-VIÑAS P.; TORRES, R.M.; LANA, M. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clin Vaccine Immunol.*; 19, 1283-91.

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.; JELICKS, L. A.; KIRCHOFF, L. V.; SHIRANI, J.; NAGAJYOTHI, F.; MUKHERJEE, S.; *et. al*. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. *Cardiol Rev.*;20, 53-65, 2012.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. *The American Journal of Medicine*. 128, 1251.e7-1251.e9. 2015.

MAZZA, S.; FREIRE, R. S. Manifestaciones cutâneas de inoculacion, metastáticas y hematógenas em enfermedad de Chagas. Chagomas de inoculación, chagomas metastáticos y chagomas hematógenos. *Public MEPRA*. 46: 3–38. 1940.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*. 115:1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI Jr, A.; AVEZUM Jr, A.; MATTOS, A. C.; Rassi, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104, 319-324. 2009.

MOREIRA, O. C.; RAMÍREZ, J. D.; VELÁZQUEZ, E. *et al*. "Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial". *Acta Tropica*. 125, 1:23–31. 2013.

MELO, L.; CALDAS, I. S.; AZEVEDO, M. A.; GONÇALVES, K. R.; NASCIMENTO, A. F. S.; FIGUEIREDO, V. P.; DINIZ, L. F.; LIMA, W. G.; TORRES, R. M.; BAHIA, M. T.; TALVANI, A. Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 84:325-331. 2011.

MENDES, O. C.; CAMPOS, D. H.; DAMATTO, R. L.; SUGIZAKI, M. M.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A. C. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 94:59-66. 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.

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.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAU, M. S.; MACHADO, F. S.; UPADHYA, R.; *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J Infect Dis.* 205: 830-840. 2012.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Research.* 69:562-573. 2006.

NUNES, M. C. *et al.* Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Ver Cardiovasc Ther.* 10, 9:1173-84. 2012.

OCARANZA, M. P.; JALIL, J. E. Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int J Hypertens.* 2012.

OLIVEIRA, C. M. X.; CESARINO, E. J.; FREITAS, O.; PEREIRA, L. R. L. Padrões de prescrição de inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Rev Bras Cardiol.* 23, 3:171-177. 2010.

OLIVEIRA, G. M.; DINIZ, R. L.; BATISTA, W.; BATISTA, M. M.; BANI CORREA, C.; *et al.* Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acutemyocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 171:79-86. 2007.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico na Doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical.* 37, 209-228. 2008.

OLIVIERI, B. P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAUJO-JORGE, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3790-3796. 2002.

PAIVA, C.N.; FIGUEIREDO, R.T.; KROLL-PALHARES, K.; SILVA, A.A.; SILVERIO, 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.* 86:1239-1246. 2009.

PAULA-COSTA, G.; SILVA, R. R.; PEDROSA, M. C.; *et al.* Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. *Parasite Immunology.* 32, 202–208. 2010.

PENITENTE, A. R.; LEITE, A. L. J.; PAULA-COSTA, G.; *et al.* 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, 5:976-982. 2015.

PENG, H.; CARRETERO, O. A.; VULJAJ, N.; LIAO, T. D.; MOTIVALA, A.; PETERSON, E. L.; RHALEB, N. E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation.* 112:2436-2445. 2005.

PIAGGIO, E.; SANCÉAU, J.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E. Trypanocidal drug Benznidazole impair lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition on NF-kB activation. *The Journal of Immunology.* 167:3422:3426. 2001.

PHILLIPS, M. I.; SPEAKMAN, E. A.; KIMURA, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory Peptides.* 43, 1: 1-20. 1993.

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

RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. *Lancet*; 375, 1388-1402. 2010.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. *Rev Bras Hipertens.* 3, 293-302. 2000.

RODRIGUEZ, H. O.; GUERRERO, N. A.; FORTES, A.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* strain cause diferente myocarditis patterns in infected mice. *Acta Tropica*. 139 : 57-66. 2014.

ROMAÑA C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis quizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Public MEPRA*. 22:16–28. 1935.

ROSSI, M. A. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol*. 7: 287-94. 1991.

ROY, S. *et al.* Role of TGF- and TNF- in IL-1 mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: Involvement of an aprotinin sensitive protease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 513, 1:61-69, 2011.

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.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; MASSARA, R. L.; BORGES, J. D.; LANA, M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DIAS, J. C.; ELOI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol*. 64:554-563. 2006.

SCHLEMPER, B. R. Jr; ISHIDA, M. M.; STEINDEL, M.; GARGIONI, R. Very large trypomastigotes as a morphological pattern of strains of *Trypanosoma cruzi* in the Southern region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 81, 191-198. 1986.

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

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. *Rev. Pharmacol. Toxicol*. 47, .1:211-242. 2007.

SILVA, R. R.; SHRESTHA-BAJRACHARYA, D.; ALMEIDA-LEITE, C. M.; LEITE, R.; BAHIA, M. T.; TALVANI, A. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107, 513-521. 2012.

SOSA-ESTANI, S. El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas como estrategia de salud pública. *Rev Argent Salud Pública*. 3, 40-43. 2012.

SOTO-PANTOJA, D.R.; *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Mol.Cancer Ther.* 8, 6:1676-1683.2009.

SOUZA, P. E.; ROCHA, M. O.; ROCHA-VIEIRA, E., *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. Immun.* 72: 5283-5291. 2004.

SPINALE, F. G. *et al.* Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovascular Research.* 46, 2:225-238. 2000.

SPINALE, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 90: 520–530. 2002.

TALVANI, A.; COUTINHO, S.F.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M. M. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. *Parasitol. Res.* 104:1141–1148. 2009.

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V; *et al.* Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection.* 2:851-866. 2000.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Advances in Parasitology.* 76:171-194. 2011.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews.* 5: 400-419. 1992.

TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GUTLER, R. E. The challenges of Chagas disease-grim outlook or glimmer of hope. *PLos Med.* 4, 1852-1857. 2007.

TEIXEIRA, A. R. *et al.* Chagas disease. *Postgrad Med J.* 82, 974:788-98. 2006.

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends. Parasitol.* 18: 262-265. 2002.

TSURUDA, T.; COSTELLO-BOERRIGTER, L. C.; BURNETT, J. C. Jr. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Ver.* 9: 53–61. 2004.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 89, 2: 3A-9A. 2002.

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

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.

WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; HORN, D.; KELLY, J. M.; CHEESEMAN, I. A. mechanism for cross-resistance to Nifurtimox and Benznidazole in trypanosomes. *PNAS.* 105:5022-5027. 2008.

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

YOKOTA, T.; TOMITA.; MORI, Y.; KUDO, T.; *et al.* Imidapril and enalapril similarly inhibit plasma matrix metalloproteinase activities and attenuate left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 63: 528-532. 2014.

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.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' Disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 180:480–6. 1999.

ANEXO I

Artigo Publicado

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 e Andre Talvani

Am. J. Trop. Med. Hyg., 93(5), 2015, pp. 976–982

doi:10.4269/ajtmh.15-0237

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.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan causative of the human Chagas disease. Glycoproteins molecules from this parasite trigger the release of varying levels of inflammatory cytokines during the mammalian host invasion, depending on the protozoan genetic background.¹ During the acute phase, the inflammatory response is designed to eliminate parasites whereas during the chronic phase, it is rather controlled in such a way that the immune response is targeted to maintain the parasite at check preventing excessive tissue damage, fibrosis formation, and cardiac loss of function.^{2–4}

Since the presence of *T. cruzi* is the switch for inducing and maintaining the inflammatory process running in the heart tissue, three cardinal therapeutic strategies are proposed: 1) an antiparasitic drug, where benznidazole is considered a standard treatment but still ineffective to those symptomatic individuals in chronic stage of Chagas cardiopathy⁵; 2) drugs that act direct on the cardiac dysfunction avoiding progressive failure of the organ—for example, diuretics, digitals, β -blockers, and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors^{6,7} and, more recently, 3) drugs that act in controlling the over-reactivity of the immune system avoiding severe destruction in the heart during chronic stage of the infection—for example, statins and ACE inhibitors.^{8–12}

ACE inhibitors have been shown to be efficacious not only as therapies against hypertension and protection against left ventricular hypertrophy but also in the regulation of the immune system related to distinct diseases, including the *T. cruzi*-induced pathologies.^{9,13–15} Their actions are based on the angio-

tensin II, a key factor in the renin-angiotensin system that plays an essential role in the regulation of blood pressure, and that also interferes in the cardiac inflammatory activity through the activation of the nuclear factor kappaB (NF- κ B) and in the production of inflammatory cytokines and chemokines.¹⁶

In the context of the experimental *T. cruzi* infection, the ACE inhibitor captopril was previously demonstrated to be able to decrease the delayed-type hypersensitivity response against parasite in acute myocarditis.⁸ Later, another ACE inhibitor (enalapril) was shown to ameliorated experimental acute myocarditis by decreasing leukocytes infiltration and circulating levels of chemokines (CCL5), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interferon gamma (IFN- γ).⁹ In addition, the authors of this study also observed a direct anti-*T. cruzi* activity both in vitro and in vivo, likely via inhibition of the parasite's cytochrome-P450 pathway.

In this proposed study, C57BL/6 mice were infected with the VL-10 strain of the *T. cruzi* and treated during the acute phase for 30 days with enalapril, with benznidazole, or with both drugs in combination and inflammatory aspects observed after 120 days of infection, in particular the production of circulating chemokines, creatine kinases (CKs), and C-reactive proteins.

MATERIALS AND METHODS

Animals, parasites, and infection. Ten-week-old male C57BL/6 mice were bred and maintained at the Center of Animal Science from the Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Brazil. Mice ($N = 10$) were infected with 100 blood trypomastigote forms of *T. cruzi* (VL-10 strain). These parasites were maintained through successive passages in Swiss mice at the Laboratory of Immunobiology of Inflammation, UFOP, and parasitemia was determined daily, by optic microscopy analysis of 5 μ L samples after tail bleeding, according to Brener.¹⁷ Animals were euthanized 120 days postinfection and blood and heart tissues were collected for immune and biochemical assays and histology.

*Address correspondence to André Talvani, Laboratório de Imunobiologia da Inflamação, DECBI/NUPEB, Campus Morro do Cruzeiro, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. E-mail: talvani@nupeb.ufop.br

[†]These authors contributed equally to this work.

All procedures were conducted in accordance with the guidelines issued by the Brazilian College of Animal Experimentation and had previously been approved by the Ethic Committee in Animal Research at UFOP (protocol CEUA no. 081/2012).

Pharmacological treatment. Enalapril (Pharlab, Minas Gerais, Brazil) and benznidazole, the (*N*-benzyl-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)acetamide (LAFEPE, Recife/PE, Brazil), were commercially acquired and diluted in water suspended in 0.05% w/v of methyl cellulose at the appropriate concentrations for the indicated doses. The drugs were given orally by gavage (0.1 mL) once daily during 30 consecutive days, starting 24 hours after the *T. cruzi* infection. Animals were divided in five distinct groups: 1) 10 mice infected with *T. cruzi* treated with vehicle, 2) 10 mice infected with *T. cruzi* and treated with enalapril (25 mg/kg/day),⁹ 3) 10 infected mice treated with benznidazole (100 mg/kg/day),¹⁸ 4) 10 infected mice treated enalapril (25 mg/kg/day) plus benznidazole (100 mg/kg/day) administered 1 hour after the first drug,¹⁹ and 5) 10 uninfected animals (control group) that received vehicle following the same regimen of the animals under other treatments.

Immunoassays. Blood from anesthetized mice was collected from the orbital plexus (0.8 mL) on the 120th day of infection, before euthanasia, and serum was used to determine the circulating levels of interleukin 10 (IL-10), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CCL5/RANTES), and monocyte chemoattractant protein (CCL2/MCP-1). IL-10, CCL2, and CCL5 chemokines (PeproTech, São Paulo, Brazil) were then quantified by enzyme-linked immunosorbent assay as recommended by manufacturer. In brief, flat-bottom 96-well microtiter plates (Thermo Scientific Nunc, San Jose, CA) were coated with 100 μ L/well of the appropriate monoclonal antibodies for 18 hours at 4°C and then washed with phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 (wash buffer). Nonspecific binding sites were blocked with 200 μ L/well of 1% bovine serum albumin in PBS. Plates were washed, and 100 μ L/well of samples were added followed by incubation for 18 hours at 4°C. Later, 100 μ L/well of the appropriate biotinylated detection antibodies diluted in blocking buffer containing 0.05% Tween 20 were added and incubated for 1 hour at room temperature. Streptavidin-horseradish peroxidase was added and, after incubation and washing, 100 μ L/well of the chromogen substrate *o*-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, MO), diluted in 0.03 M citrate buffer containing 0.02% 30 v/v H₂O₂, was added for 30 minutes followed by incubation in the dark at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 50 μ L/well of 1 M H₂SO₄ solution and plates were read at 492 nm in a spectrophotometer (EMax; Molecular Devices, Sunny Vale, CA). All samples were measured simultaneously in duplicate.

Histopathology and polarized microscopy of picrosirius red-stained collagen. For the analysis and quantification of inflammatory infiltrate and collagen, fragments of cardiac tissue were stained by hematoxylin and eosin (H&E). In brief, tissue fragments were fixed in 10% buffered formalin solution, dehydrated, cleared, and embedded in Paraplast (Sigma). Blocks were cut into 4-mm-thick sections and stained by H&E for inflammation assessment. Twenty fields from each of the H&E-stained section were randomly chosen at 40 \times magnification, giving a total of 74,931 μ m²—the equivalent area of 50 fields of analyzed myocardium. Images were obtained

through a Leica DM 5000 B microchamber (version 2.4.0 R1; Leica Application Suite, Milton Keynes, United Kingdom) and processed by software Leica Qwin (V3) image analyzer. The inflammatory process was evaluated by the number of cellular nuclei observed in the infected heart tissue and compared with the background from cardiac cellular nuclei observed in the noninfected mice. Heart sections were also stained with picrosirius red (S2365; Poly Scientific, Bay Shore, NY) to visualize collagen content in the heart tissue at 120 days postinfection. Polarized micrographs were obtained via Leica DM 5000 B microchamber equipped with a color camera and utilizing NIS Elements Software (Nikon Instruments Inc., Melville, NY). The collagen defined by the polarized micrographs was then measured on ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Determination of the plasma CKs and C-reactive protein. CK, CK myocardial band (CK-MB) and C-reactive protein were measured in the plasma from different groups of infected mice by an Olympus AU640 autoanalyzer (Olympus, Hamburg, Germany) using the manufacturer's appropriate reagents. Calibration and quality control of the equipment were performed according to the recommended protocol.

Statistical analysis. The statistical analysis of the results were carried out using a Shapiro-Wilk test to verify the normality among data and one-way analysis of variance test followed by a Bonferroni's multiple comparison test and Wilcoxon rank sum test for multiple comparisons through the GraphPrism v.5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Results represent mean \pm standard error of the mean (SEM) of 6–10 survivors per experimental group and differences with a *P* value of <0.05 were considered statistically significant.

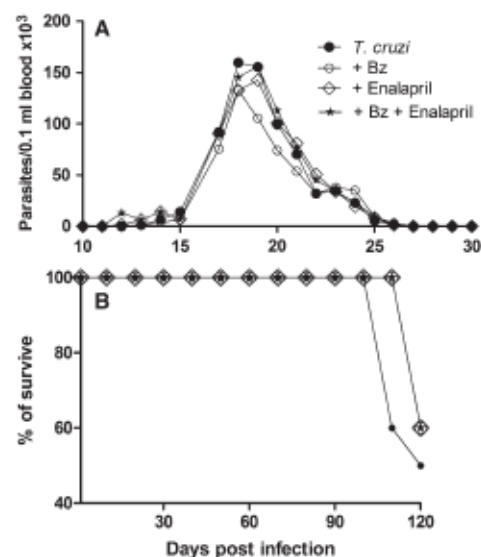


FIGURE 1. Parasitemia and percentage of surveillance in mice infected with the VL-10 strain of *Trypanosoma cruzi*. C57BL/6 mice were infected with VL-10 strain (100 parasites/mouse) of *T. cruzi* and (A) the parasitemia was evaluated until 30 days of infection and (B) the surveillance observed till 120 days postinfection, when animals were euthanized. Data are shown as a mean of 10 animals \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Parasitemia and survival curves. During the first 30 days of infection, there was no difference observed in the prepatent period or in the peak of parasitemia among groups receiving enalapril, benznidazole, or both drugs in combination (Figure 1A). After 5 days of continuous negativation in the parasitemia curve, the evaluation was interrupted. During and after the acute phase, a survival curve was plotted showing low mortality induced by VL-10 in isogenic C57BL/6 mice. There was observed 50% of survival rate in untreated animals and 60% in those treated with enalapril, benznidazole, or both drugs in combination (Figure 1B) at 120 days of postinfection.

Inflammatory infiltrate and collagen profile in cardiac tissue at 120 days of infection. The production of circulating IL-10 and proinflammatory chemokines was elevated at 120th day in mice after infection with the VL-10 strain of *T. cruzi*. In agreement with these findings, the evaluation of the cardiac tissue demonstrated a high number of inflammatory cells associated with infected animals (Figure 2A). However, when compared with the infected group treated with vehicle, animals treated with benznidazole, enalapril, or with combinatory therapy (enalapril plus benznidazole) displayed drastically reduced leukocyte infiltration into the cardiac tissue despite an absence of difference among these groups.

In parallel, an evaluation of total, type I and type II, collagens was done in this same cardiac tissue. The analysis revealed a massive increase of all types of collagen in infected animals when

compared with those that remained uninfected (Figure 2B). The different therapeutic strategies were able to reduce the total collagen when compared with the *T. cruzi*-infected group. However, using the VL-10 strain of *T. cruzi*, there was no difference among benznidazole, enalapril, or the combinatory therapy in terms of levels of type I and II collagens in the chronic phase.

Inflammatory mediators in the chronic phase of experimental infection. Soluble inflammatory mediators are pivotal agents during the inflammatory response induced by parasites. There was an increase in the level of circulating CCL2/MCP1 (Figure 3A) as well as of circulating CCL5/RANTES (Figure 3B) in mice infected with the VL-10 strain of *T. cruzi* in comparison with those uninfected. Benznidazole and enalapril alone were not capable of reducing the release of these chemokines, but the combinatory therapy reduced the levels of both inflammatory mediators in the plasma of infected animals during the chronic phase. In addition, the regulatory IL-10 cytokine was elevated in infected mice and in those treated with enalapril with or without combination with benznidazole (Figure 3C), when compared with uninfected animals.

Determination of the cardiac biochemical parameters in the chronic *T. cruzi* infection. The low, but persistent inflammation in C57BL/6 mice caused by the VL-10 strain of *T. cruzi* during 120 days was able to elevate the plasma level of the CK (Figure 4A), CK-MB (Figure 4B) and C-reactive protein (Figure 4C). The administration of benznidazole or enalapril reduced the plasma level of C-reactive protein. The combinatory therapy using enalapril plus benznidazole was capable to

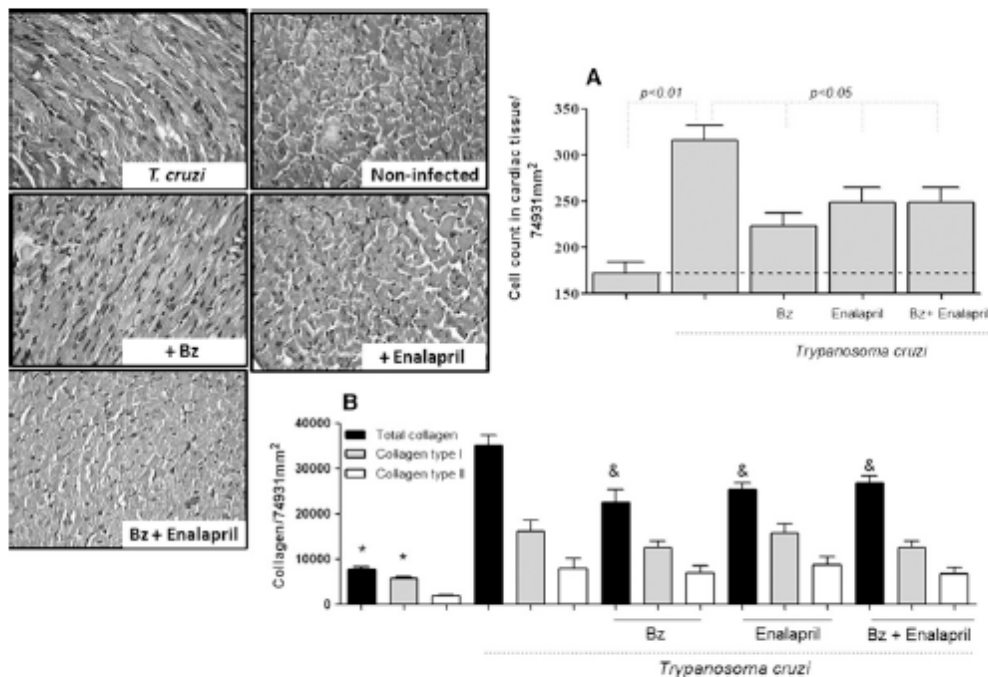


FIGURE 2. Inflammatory cells and collagen in heart tissue in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Cellular infiltration in animals infected with VL-10 strain of *T. cruzi* (100 parasites/animal) were quantified (A) and area of total type I and type II collagens represented (B), using picrosirius red staining. Data are shown as a mean of 5 to 6 animals \pm standard error of the mean (SEM) and * means difference ($P < 0.05$) when compared with the same collagen from other groups and when compared with total collagen from the *T. cruzi*-infected group. This figure appears in color at www.sjtmh.org.

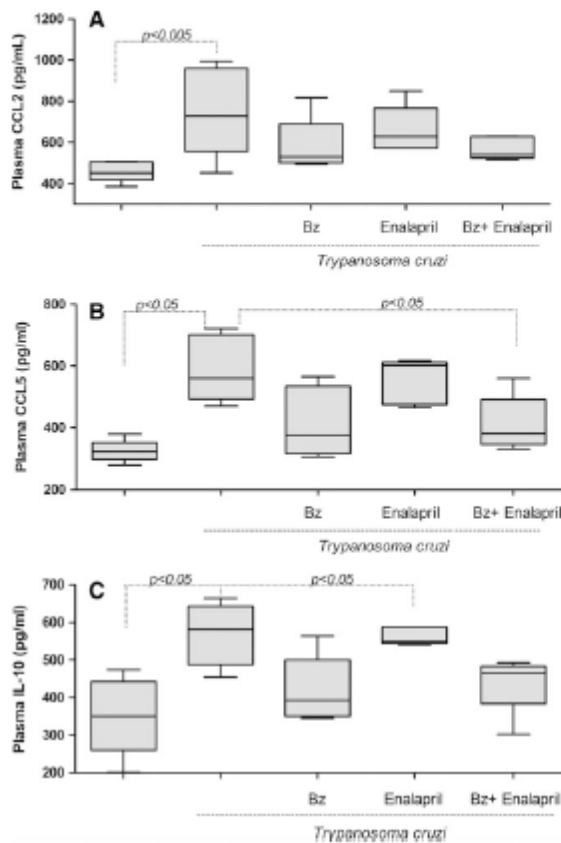


FIGURE 3. Plasma levels of soluble inflammatory mediators in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. CCL2/MCP-1 (A), CCL5/RANTES (B), and IL-10 (C) were measured in plasma by enzyme-linked immunosorbent assay in C57BL/6 mice infected with VL-10 strain of *T. cruzi* (under treatment with Bz, enalapril, and Bz + enalapril) after 120 days of infection. In parallel, uninfected animals (control group) were also evaluated and all data shown as a mean of 5 to 6 animals \pm SEM, and differences represented by $P < 0.05$. Bz = benznidazole; SEM = standard error of the mean.

reduce the levels of CK, CK-MB and C-reactive protein, all markers of cardiac dysfunction in mice.

DISCUSSION

The responsiveness of immune system is capable to define the course of the acute and chronic *T. cruzi* infection in mammalian.²⁰ The initial inflammatory response triggered, mainly, by the glycoproteins and other molecules from this protozoan promotes a self-perpetuation of this inflammation, often culminating in a cellular destruction. However, this prominent immune response mediated by innate cells and inflammatory cytokines (e.g., IFN- γ , IL-12, TNF- α , and CCL2), antibodies, and other molecules (e.g., nitric oxide) are necessary to repress parasite replication and invasion.^{21–23} This acute stage is followed by a life-long chronic condition where the cellular immune response limits parasite proliferation despite being unable to eradicate the infection, which leads to a sustained and chronic inflammatory process.^{24,25}

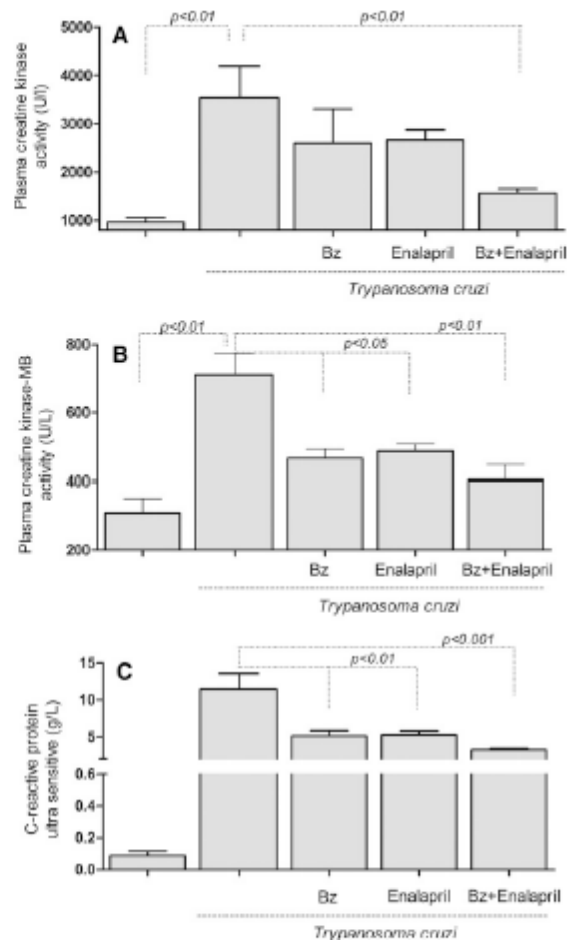


FIGURE 4. Activity of the plasma creatine kinase and C-reactive protein during the chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Creatine kinase (A), creatine kinase-MB (B), and C-reactive protein (C) were measured in plasma by biochemical assays in C57BL/6 mice infected with VL-10 strain of *T. cruzi* at 120 days of infection. Data are shown as a mean of 5 to 6 animals \pm standard error of the mean (SEM).

The genetic characteristics of the parasites or hosts are pivotal aspects for the establishment of a diffuse cellular infiltration composed mainly of mononuclear cells and lymphocytes.^{5,26–28} This pattern will contribute to the pathogenesis of cardiac lesions because of 1) the disruption and displacement of local vascular beds and the cardiac myofibrils, 2) the collagen deposition in the heart followed by fibrosis, and 3) the remodeling and loss of functionality of the heart in human and in experimental models. Therefore, the elimination of the parasites is an obvious interest of chemical therapy because of the persistent antigenic stimulation caused to the mammalian host.

More than one century after the original description of the Chagas disease and more than four decades after its introduction as a treatment, the “nitro derivative benznidazole” (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) is still the most used trypanocidal drug against *T. cruzi*. Unfortunately, this drug

has unsatisfactory efficacy and leads to undesired adverse reactions.^{29,30} Since the inflammatory response against the parasite persists for decades causing a silent cardiac damage in humans, a new consensus of benzimidazole treatment has been proposed aiming the reduction or elimination of the parasite loads, which could cause less inflammation.^{31,32} In this way, administration of benzimidazole during chronic phase of experimental *T. cruzi* infection prevents the development of a more severe form of cardiopathy,³³ in part by the reduction of the parasite load, in part by affecting host immune regulation.³⁴ Indeed, previous *in vitro* study, demonstrated that benzimidazole acts downregulating *NOSII* gene promoting nitric oxide inhibition and also promotes macrophage NF- κ B inhibition after stimulation with lipopolysaccharide and IFN- γ .³⁵ Its immunomodulatory effect goes further through the observation that the benzimidazole is able to inhibit inflammatory cytokines, autoantibodies, nitric oxide production, and also leukocyte recruitment into the heart during *T. cruzi* infection in human and experimental models.³⁶⁻³⁹ In these studies, the toxicity of the benzimidazole overrides the cardiac beneficial effects since activation and/or misbalanced of the host inflammatory response become detrimental to the heart function. Yet far from a cure for chronic stage of the infection, a novel therapeutic strategy has been proposed in which immunomodulation in the absence of immunosuppression could be beneficial to the host during chronic *T. cruzi* infection. In this context, well-known cardiovascular therapeutic options (e.g., ACE-inhibitors, β -blockers, statins) have gained new interest because of their more recently described modulatory properties over the release of inflammatory cytokines and chemokines, the cellular infiltration, and fibrosis leading to improvements in ventricular cardiac function in experimental and human *T. cruzi* studies.^{8,10-12}

Our group previously described, in an experimental model of acute infection by *T. cruzi*, a relevant role for the enalapril using the Colombian strain of the parasite whose characteristic feature is to cause high systemic and cardiac inflammation in C57BL/6 mice. In this study, the short treatment with 25 mg/kg/day of enalapril was capable to reduce circulating parasites, heart tissue inflammation and plasma IFN- γ , TNF- α , and CCL5/RANTES, suggesting a protective effect to this ACE inhibitor to the chronic stage of the infection.⁹ In this study, a similar treatment was performed using enalapril and/or the antiparasitic drug benzimidazole that also might modulate immune response in experimental models of infection,⁴⁰ however now using a different strain (VL-10) of the parasite, which allowed for the evaluation of the chronic phase of infection (120 days). Both enalapril and benzimidazole were capable to induce a low leukocyte infiltration into cardiac tissue as well as to reduce the releasing of C-reactive protein levels in C56BL/6 mice contributing to a regulatory systemic response. However, when other parameters were evaluated such as circulating chemokines (CCL2 and CCL5) and markers of cardiac dysfunction (CK and CK-MB), a significant reduction was detected only in those animals treated with the combinatory therapy (enalapril plus benzimidazole). Clearly, the most important event during *T. cruzi* VL-10 infection occurs during the first 30 days of infection, when parasites were still in replication and the mice immune response was over reactive. These early therapeutic interventions given during acute events appear to be crucial in defining the course of the incipient pathological process in the infected heart tissue, which might predict future damage to this organ.

Chemokines CCL2/MCP-1 and CCL5-RANTES have been largely associated with the recruitment of monocytes and lymphocytes to inflammatory foci with the primary role to kill parasites and inevitably driving host tissues to the damage.^{20,21} But even so, both chemokines have been suggested as good biomarkers of inflammation since their expression in *T. cruzi*-infected heart tissue was detected from as far as 15th to the 240th day of infection.^{22,41,42} Indeed, the role of CCL5 in the recruitment of CCR5 plus leukocytes is reinforced by studies where CCR5-deficient mice became more susceptible to *T. cruzi* infection by the reduction of macrophages and T-cells migration into the heart, especially during early stages of the infection.^{43,44} In addition, a partial blockage of CC-chemokine receptor inhibitor (Met-RANTES) was shown to induce a reduction of the leukocyte influx modulated by *T. cruzi* followed by parasite load reduction and fibronectin deposition in the heart tissue.^{45,46} Besides, CCL2 was also associated with the control of parasite burden, as well as with the increase of inflammatory infiltration and angiogenesis process induced by *T. cruzi*,^{47,48} in particular by its essential role in recruiting monocytes to inflammatory foci.

In this chronic study using the VL-10 strain of *T. cruzi*, we conclude that enalapril and benzimidazole given in combination were more effective in reducing 1) the plasma levels of CCL2 and CCL5, 2) the intensity of inflammatory infiltration, and 3) the reduction of deleterious effect in the heart, reflected by the low levels of CK and CK-MB in infected animals in a long-term infection in mice.

Received March 25, 2015. Accepted for publication July 3, 2015.

Published online September 8, 2015.

Acknowledgments: We thank Adriano Luis Soares de Souza for kindly reviewing this manuscript.

Financial support: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01403-12 and BPD-00012-12), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 473285/2012-6), and Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). AT is also in credit with the CNPq for the fellowship of research productivity.

Authors' addresses: Arlete Rita Penitente, Ana Luísa Junqueira Leite, Guilherme de Paula Costa, Deena Shrestha, and Aline Luciano Horta, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, E-mails: arletepenitente@gmail.com, leiteal@gmail.com, gpcostabio@gmail.com, deenabajra@gmail.com, and alinehorta8@yahoo.com.br. Antônio J. Natali and Clóvis A. Neves, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, and Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, E-mail: anatali@ufv.br and caneves@ufv.br. 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, and Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, E-mail: talvani@nupeb.ufop.br.

REFERENCES

- Toledo MJ, de Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Barnabé C, Tibayrenc M, Tafuri WL. 2002. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp Parasitol* 100: 161–172.
- Rossi MA. 1991. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 30: 335–340.
- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92–100.

4. Tassi EM, Continentino MA, Nascimento EM, Pereira Bde B, Pedrosa RC, 2014. Relationship between fibrosis and ventricular arrhythmias in Chagas heart disease without ventricular dysfunction. *Arq Bras Cardiol* 102: 456–464.
5. Coura JR, Borges-Pereira J, 2011. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 641–645.
6. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA, 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402.
7. Botoni FA, Ribeiro AL, Marinho CC, Lima MM, Nunes Mdo C, Rocha MO, 2013. Treatment of Chagas cardiomyopathy. *BioMed Res Int* 2013: 849504.
8. Leon JS, Wang K, Engman DM, 2003. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. *Circulation* 107: 2264–2269.
9. Paula-Costa G, Silva RR, Pedrosa MC, Pinho V, de Lima WG, Teixeira MM, Bahia MT, Talvani A, 2010. Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. *Parasite Immunol* 32: 202–208.
10. Botoni FA, Poole-Wilson PA, Ribeiro AL, Okonko DO, Oliveira BM, Pinto AS, Teixeira MM, Teixeira AL Jr, Reis AM, Dantas JB, Ferreira CS, Tavares WC Jr, Rocha MO, 2007. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *Am Heart J* 153: e1–e8.
11. Melo L, Caldas IS, Azevedo MA, Gonçalves KR, Nascimento AFS, Figueiredo VP, Diniz LF, Lima WG, Torres RM, Bahia MT, Talvani A, 2011. Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg* 84: 325–331.
12. Silva RR, Shrestha-Bajracharya D, Almeida-Leite CM, Leite R, Bahia MT, Talvani A, 2012. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 513–521.
13. Ferrario CM, Strawn WB, 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98: 121–128.
14. Sciarretta S, Paneni F, Palano F, Chin D, Tocci G, Rubattu S, Volpe M, 2009. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in the development and progression of diastolic dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 116: 467–477.
15. Yokota T, Tomita H, Mori Y, Kudo T, Hiraga H, Suto N, Higuma T, Abe N, Hanada H, Osanai T, Okumura K, 2014. Imidapril and enalapril similarly inhibit plasma matrix metalloproteinase activities and attenuate left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 63: 528–532.
16. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Stroder K, Thone-Reineke C, Reichenbach A, Scharcher J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwanninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM, 2010. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 55: 924–931.
17. Brener Z, 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 389–396.
18. Filardi LS, Brener Z, 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drug used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 755–759.
19. Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z, 2000. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 45: 819–824.
20. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CME, Paiva CN, Silva AA, 2009. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokines receptors—how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 226–235.
21. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS, 1999. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 67: 1961–1967.
22. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romarha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT, 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2: 851–866.
23. Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS, 2009. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (Suppl 1): 236–245.
24. Brener Z, Gazzinelli RT, 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103–110.
25. Talvani A, Teixeira MM, 2011. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol* 76: 171–194.
26. Rodriguez HO, Guerrero NA, Fortes A, Santi-Rocca J, Gironès N, Fresno M, 2014. *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. *Acta Trop* 139: 57–66.
27. Meza SK, Kaneshima EN, Silva Sde O, Gabriel M, de Araújo SM, Gomes ML, Monteiro WM, Barbosa M, Toledo MJ, 2014. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp Parasitol* 146: 34–42.
28. Esper L, Talvani A, Pimentel P, Teixeira MM, Machado FS, 2015. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Current Opin Infect Dis* 28: 246–252.
29. Coura JR, de Castro SL, 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3–24.
30. Urbina JA, 2015. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol* 62: 149–156.
31. Vitti R, Vigliano C, 2007. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 717–726.
32. Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S, BENEFIT Investigators, 2008. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 156: 37–43.
33. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB, 2005. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1521–1528.
34. Olivieri BP, Cotta-De-Almeida V, Araújo-Jorge T, 2002. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3790–3796.
35. Piaggio E, Sance'au J, Revelli S, Bottasso O, Wietzerbin J, Serra E, 2001. Trypanocidal drug benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF- κ B activation. *J Immunol* 167: 3422–3426.
36. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Eki-Santos SM, Martins-Filho OA, 2006. Benznidazole treatment during early-terminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol* 64: 554–563.
37. Cutrullis RA, Moscatelli GF, Moroni S, Volta BJ, Cardoni RL, Alcheh JM, Corral RS, Freilij HL, Petray PB, 2011. Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. *PLoS One* 6: e27133.
38. Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso AO, Revelli SS, 2001. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on experimentally *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res* 87: 539–547.
39. Daliry A, Caldas IS, de Figueiredo Diniz L, Torres RM, Talvani A, Bahia MT, de Carvalho AC, 2014. Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazole. *Int J Cardiol* 170: e66–e67.

40. Fernández MC, González Cappa SM, Solana ME, 2010. *Trypanosoma cruzi*: immunological predictors of benznidazole efficacy during experimental infection. *Exp Parasitol* 124: 172–180.
41. Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS, 1999. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 67: 4819–4826.
42. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS, 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 18: 262–265.
43. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, Rossi MA, Silva JS, 2005. 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.
44. Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Kuziel WA, Lane TE, Manning JE, 2006. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74: 135–143.
45. Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J, 2004. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110: 1443–1449.
46. Medeiros GA, Silverio JC, Marino AP, Roffe E, Veira V, Kroll-Palhares K, Carvalho CE, Silva AA, Teixeira MM, Lannes-Vieira J, 2009. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR-1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes Infect* 11: 264–273.
47. Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silverio JC, Gibaldi D, Pyrrho Ados S, Benjamin CF, Lannes-Vieira J, Bozza MT, 2009. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* 86: 1239–1246.
48. Guedes-da-Silva FH, Shrestha D, Salles BC, Figueiredo VP, Lopes LR, Dias L, Barcelos LS, Moura S, de Andrade SP, Talvani A, 2015. *Trypanosoma cruzi* antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. *Microvasc Res* 97: 130–136.