



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Laboratório de Imunobiologia da Inflamação/ NUPEB



Caracterização dos aspectos inflamatório e funcionais do
ventrículo esquerdo em cães infectados com a cepa Berenice 78
do *Trypanosoma cruzi* após terapia com doxiciclina e benznidazol

LAIS ROQUETE LOPES

Orientador: Prof. André Talvani

Co-orientador(a): Dra. Vivian P. Figueiredo

Ouro Preto, 2018

LAIS ROQUETE LOPES

Caracterização dos aspectos inflamatório e funcionais do
ventrículo esquerdo em cães infectados com a cepa Berenice 78
do *Trypanosoma cruzi* após terapia com doxiciclina e benznidazol

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

Orientador: Prof. André Talvani

Co-orientador(a): Dra. Vivian P. Figueiredo

OURO PRETO – MG

L881c Lopes, Lais Roquete.
Caracterização dos aspectos inflamatório e funcionais do ventrículo esquerdo em cães infectados com a cepa Berenice 78 do *Trypanosoma cruzi* após terapia com doxiciclina e benznidazol [manuscrito] / Lais Roquete Lopes. - 2018.
73f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.
Coorientadora: Profª. Drª. Vívian Paulino Figueiredo.

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

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Chagas, Doença de. 3. Inflamação. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Figueiredo, Vívian Paulino . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.27:561.24

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



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



ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 03 dias do mês de dezembro do ano de 2018, às 08:30 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese de doutoranda Lais Roquete Lopes, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Presidente - UFOP), pela Profa. Glenda Nicoli da Silva (Membro - UFOP), pela Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Membro - Externo), pelo Prof. Marcelo Eustaquio Silva (Membro - UFOP), pelo Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Lais Roquete Lopes 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Caracterização dos Aspectos Inflamatório e Funcionais do Ventrículo Esquerdo em Cães Infectados com a Cepa Berenice 78 do Trypanosoma Cruzi Após Terapia com Doxiciclina e Benznidazol", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 03 de dezembro de 2018.

Presidente:

Membro:

Membro:

Membro:

Membro:

Doutorando:



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE OURO PRETO**

Reitora

Prof. Dra. Cláudia Aparecida Marliére de Lima

Vice-Reitor

Prof. Dr. Hermínio Arias Nalini Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Coordenador

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

À minha família, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Agradeço á todos os colaboradores deste trabalho:

A Universidade Federal de Ouro Preto pelo estímulo ao crescimento profissional, estrutura e apoio a pesquisa;

Aos ógãos financiadores: CAPES pelo auxílio na bolsa de Doutorado; á FAPEMIG e CNPq concessão do fomento ao projeto;

Ao NUPEB e aos Professores da pós- graduação no Programa CBIOL pelo apoio e auxílio no crescimento na pesquisa;

Ao professor Dr. Antônio Carlos de Camargo Carvalho e sua equipe do Laboratório de Cardiologia Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração na realização das análises ecocardiográficas;

Ao professor Dr. Richard Schulz da *University of Alberta* pelo auxílio na realização do trabalho e análises ecocardiográficas;

Ao professor João Santana Silva e sua equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade de São Paulo pela colaboração com as análises de qPCR;

Ao professor Alexandre Barbosa dos Reis e a mestranda Jamile pelo auxílio e colaboração nas análises das citocinas;

A Prof. Fátima Gärtner, da Universidade do Porto, Portugal, pela oportunidade e colaboração com projeto;

A todos os integrantes do Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN) pela ajuda na execução deste trabalho; em especial ao Guilherme, à Aline e ao Washington pelo auxílio durante períodos de tratamento dos animais;

A todos os funcionários do ICEB, CBIOL e UFOP.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço a Deus, por colocar anjos em minha vida, por mostrar por meio dos seus caminhos o melhor aprendizado, por me conceder coragem e força e por aumentar intimidade através da sua presença; Entrego, aceito, confio e agradeço;

De maneira muito especial agradeço ao Prof. André Talvani, pela orientação e acolhida no laboratório desde iniciação científica. Agradeço pelo apoio, cobranças, desenvolvimento de senso crítico, conselhos. Gratidão por ser exemplo de pesquisador e professor através do seu amor pela pesquisa!

Á minha mãe Aleida, ao meu pai José Joaquim e minha irmã Liliane, pelo amor, compreensão, doação e sensibilidade; sem apoio de vocês não seria possível. Toda minha família e amigos pelo amor. Gratidão!

Á Tamires, pela amizade, divisão da casa e tarefas. Gratidão pelas conversas, desabafos e por ser minha família em Ouro Preto;

Ao Bruno, meu namorado, por ser apoio constante, pela amizade e compreensão, pelo crescimento juntos; pelo apoio emocional e cuidado.

Á Ana Luisa, pela amizade, companheirismo no laboratório e disciplinas, pelas conversas e por ser apoio sempre;

Aos amigos feitos no laboratório e Pós-Graduação, em especial á Vivian Figueiredo pela amizade, auxílio na realização dos experimentos, ensinamentos e pela orientação realizada;

Aos amigos de Ouro Preto; pela amizade e as repúblicas CCP e Bem-te-vi,

A Prof. Silvana Mara pelo apoio, exemplo e cuidado; a todos da Equipe Saúde Integral, da Unimed Inconfidentes/OP pelo auxílio, compreensão, suporte e amizade.

Só o desejo inquieto, que não passa faz o encanto da coisa desejada...e terminamos
desdenhando a caça pela doida aventura da caçada.
Mario Quintana

RESUMO

A cardiopatia chagásica (CC) induzida pelo *Trypanosoma cruzi* é uma manifestação clínica dependente da resposta inflamatória gerada pelo hospedeiro, ocasionando destruição celular/tecidual e, conseqüente, remodelamento na matriz extracelular cardíaca. Citocinas, quimiocinas e outras proteínas solúveis ou de membrana participam desta resposta imune e, por isso, estratégias farmacológicas para regular estes mediadores e desacelerar o remodelamento cardíaco na CC tornam-se importantes focos de investigação. Na presente proposta, 30 cães sem raça definida foram infectados (ou não) pela cepa Berenice-78 (Be-78) do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento diário com doses sub-antimicrobial do antibiótico doxiciclina/Dox durante 12 meses de infecção (sendo 50mg/Kg manhã e 50mg/kg noite), em associação (ou não) com o tratamento por 60 dias com o Benznidazol/Bz (7mg/kg – administrado à partir do 8º mês de infecção), fármaco com ação anti-*T. cruzi*. Antes e durante os 12 meses de infecção, estes animais foram avaliados trimestralmente quanto à função cardíaca (ecocardiografia/ECO) e, após a eutanásia, o tecido cardíaco (átrios e ventrículos) dos animais foram conservados para avaliação: (i) dos aspectos histopatológicos (ii) da cinética da CCL2 plasmática e ventricular esquerda e da expressão dos receptores de quimiocinas (CCR3 a 6, CCR8 e CXCR3), ambos no ventrículo esquerdo (VE). Estes parâmetros foram avaliados, em paralelo à análise ecocardiográfica. Observamos que os tratamentos reduziram a massa cardíaca nos animais. A avaliação histológica mostrou aumento do infiltrado inflamatório no VE dos animais infectados, mas Dox conseguiu reduzi-lo. A produção de CCL2, TNF e IFN-gama no VE foi semelhante em todos os animais infectados, mas no plasma aumentaram no 14º mês de tratamento em relação ao grupo não infectado. Juntos, esses dados apontam para o potencial papel das doses sub-antimicrobianas de Dox, em associação com o Bz, como estratégia farmacológica de melhora morfofuncional cardíaca associada à infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, novos estudos com diferentes populações genéticas do parasita e com o estudo da farmacocinética de Dox merecem atenção para consolidar essa proposta.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* – remodelamento cardíaco – doxiciclina – benznidazol – inflamação.

ABSTRACT

Chagasic cardiopathy (CC) induced by *Trypanosoma cruzi* is a clinical manifestation dependent on the inflammatory response generated by the host, causing cellular / tissue destruction and, consequently, remodeling in the cardiac extracellular matrix. Cytokines, chemokines and other soluble or membrane proteins participate in this immune response and therefore, pharmacological strategies to regulate these mediators and to reduce the advance of the cardiac remodeling in CC become important foci of investigation. In the present proposal, 30 mongrel dogs were infected (or not) with the *T. cruzi*, Berenice-78 (Be-78) strain, and submitted to daily treatment with sub-antimicrobial doses of the antibiotic doxycycline/Dox during 12 months of infection (50 mg/kg in morning and 50 mg/kg night), in combination (or not) with the 60 days of treatment with benznidazole / Bz (7 mg/kg administered in the 8th month of infection). Before and during the 12 months of infection, these animals were evaluated quarterly for cardiac function (echocardiography) and, after euthanasia, the blood and/or left ventricle preserved for evaluation of: (i) histopathology (ii) kinetics of plasma CCL2, (as citocinas do Alex Reis) and expression of chemokine receptors (CCR3 to 6, CCR8 and CXCR3) and (iii) MMP activities . These parameters were evaluated in parallel to the echocardiographic analysis. We observed that the treatments reduced the cardiac mass in the animals. The histological evaluation showed an increase in the inflammatory infiltration in the LV of the infected animals, but Dox was able to reduce it. The production of CCL2, TNF e IFN-gama in the LV was similar in all infected animals, but in the plasma, they increased in the 14th month of treatment in relation to the uninfected group. Together, these data point out to the potencial role of the sub-antimicrobial doses of Dox, in association with Bz, as a pharmacological strategy for cardiac morphofunctional improvement associated to the *T. cruzi* infection. However, new studies with different genetic populations of the parasite and with the study of pharmacokinetics of Dox deserve attention to consolidate this proposal.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* - cardiac remodeling - doxycycline - benznidazole - inflammation.

SUMÁRIO

1.0	Introdução.....	15
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	15
1.2	2 Proteínas inflamatórias na matriz extracelular.....	16
1.3	Participação das metaloproteinases na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.4	A aplicabilidade do modelo cão no estudo da cardiopatia chagásica	20
1.5	Estratégias farmacológicas	21
2.0	Objetivos.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	23
2.2	Objetivos Específicos	23
4.0	Metodologia.....	24
4.1	Animais	24
4.2	Parasitas e infecção.....	24
4.3	Tratamento e eutanásia	25
4.4	Ecocardiografia	26
4.5	Ensaio imunoenzimático.....	27
4.6	Histologia convencional:	28
4.7	PCR quantitativo em tempo real	30
4.10	Análises Estatísticas.....	35
5.0	Resultados.....	36
5.1	Observações experimentais qualitativas	36
5.2	Processo inflamatório	37
5.3	Ecocardiografia	39
5.5	PCR em tempo real	42
5.6	Mediador inflamatório CCL2	48
5.7.1	Atividade das metaloproteinases 2 e 9 no ventrículo esquerdo	50
5.7	Correlação	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa do procedimento de ecocardiografia Erro! Indicador não definido.	
Figura 2: Peso corporal dos cães	34
Figura 3: Número de células inflamatórias (coloração H&E).....	36
Figura 4: Porcentagem da fração de ejeção.....	37
Figura 5: Espessura da parede cardíaca.....	38
Figura 6: Espessura da parede posterior cardíaca.	39
Figura 7: Expressão de receptores de quimiocinas CCR5, CCR6 e CXCR3	41
Figura 8: Expressão de receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 e CCR8.....	43
Figura 9: Expressão do mRNA da citocina IFN-gama e TNF..	45
Figura 10: Expressão do mRNA da citocina IL-10.	46
Figura 11: Concentração plasmática da quimiocinas CCL2..	47
Figura 12: Concentração da quimiocinas CCL2 no ventrículo esquerdo.....	48
Figura 13: Atividade de metaloproteinase 9 (MMP9) no ventrículo esquerdo	49
Figura 14- Atividade de metaloproteinase 2 (MMP2) no ventrículo esquerdo.....	50
<i>Figura 15- Imagem representativa das bandas de MMP- 9 e 2.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 16: Correlação da quimiocina CCL2 parâmetros inflamatórios e cardíacos....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17: Correlação da quimiocina CCL2 com IFN-y, TNF e IL-10.....</i>	<i>53</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

Be-78: Berenice-78

BSA: Albumina de Soro Bovino

CCC: Cardiopatia chagásica crônica

CD3+: Marcador de superfície celular de Linfócitos T

CD4+: Marcador de superfície Celular da Subpopulação de Linfócitos T Auxiliares e

CD8+: Marcador de Superfície Celular da Subpopulação de Linfócitos T Citotóxicos e
Células NK

DAI: Dias Após a Infecção

DC: Doença de Chagas

DTU: *Discrete Typing Units*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FC: Frequência Cardíaca

FE: Fração ejeção

HE: Hematoxilina-Eosina

ICC: Insuficiencia Cardíaca Congestiva

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IFN: Interferon

IgM: Imunoglobulina M

IHQ: Imuno-Histoquímica

IL: Interleucina

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida

IP: Índice de Peso

MMP: Matriz Metaloproteinase

mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro

NK: Célula *Natural Killer*

NO: Óxido Nítrico

PBS: salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qRT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA: Ácido Ribonucléico

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

TBS-T: Tampão Tris-Salina acrescido de *Tween-2*

TGF-beta: Fator de Crescimento Tumoral

Th1: T *Helper* tipo 1

TNF: Fator de Necrose Tumoral

1.0 Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastidae, sendo assim classificado por apresentar em sua estrutura interna uma organela conhecida como cinetoplasto, rica em DNA mitocondrial condensado (kDNA), próximo ao ponto de origem do flagelo (Brener, 1973).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo e caracterizado pela presença de diferentes estágios de desenvolvimento; possui um hospedeiro vertebrado (ex: mamíferos) e um hospedeiro invertebrado (vetor). Os insetos da família Reduviidae (hospedeiro invertebrado) são popularmente conhecidos como “barbeiros” (Peretolchina et al, 2018).

A infecção pelo *T. cruzi* é naturalmente iniciada na camada dérmica ou mucosa conjuntival por tripomastigostas metacíclicas depositadas junto às fezes ou urina de triatomíneos durante o seu repasto sanguíneo. Entretanto, o *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem por vias alternativas, normalmente, transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecção acidental de laboratório, transplante de órgãos e transmissão oral (Coelho et al, 2002). Em países não endêmicos como os da América do Norte e Europa, os imigrantes infectados oferecem risco de perpetuar a infecção pela transfusão de sangue ou congênita; a triagem e diagnóstico em mulheres grávidas e seus filhos são medidas de controle essenciais (Coura and Borges-Pereira, 2010; WHO, 2017).

A infecção pelo *T. cruzi* é o evento desencadeador da doença de Chagas, descoberta e descrita pelo médico sanitário brasileiro Carlos Justiniano das Chagas, na cidade de Lassance/MG (Chagas; 1909). A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é endêmica na América Latina, onde, de acordo com a organização mundial da saúde, afeta cerca de 6 milhões de pessoas (WHO, 2017).

Caracteriza-se por apresentar duas fases clínicas: fase aguda e fase crônica. A primeira marcada pela identificação de formas tripomastigotas no sangue do paciente, sinais clínicos inespecíficos (febre, edema, linfadenopatia) que iniciam de 6 a 10 dias

após a entrada do parasito, podendo permanecer por 6 a 8 semanas. Pode, ainda, ocorrer alterações eletrocardiográficas (Brenner, 1987, Prata, 1994). Após a fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* é conduzida para uma fase latente da doença, também conhecida como forma crônica indeterminada, permanecendo sem manifestação clínica detectável por décadas ou pela vida toda. Outros indivíduos podem desenvolver sinais clássicos como taquiarritmias, alterações no sistema nervoso autonômico, alterações na motilidade do esôfago e do intestino (apresentando o quadro de megaesôfago e megacólon) e eventos progressivos cardiovasculares levando ao quadro conhecido como cardiopatia chagásica – CC (Marin-Neto et al, 2017). A CC apresenta um caráter inflamatório progressivo, fibrosante e debilitante, afetando o arcabouço estrutural e a funcionalidade do coração (Rocha et al, 2007).

A presença do *T. cruzi* no organismo de mamíferos induz uma complexa interação entre suas glicoproteínas de membrana e os receptores das células de defesa do hospedeiro emergindo uma resposta inflamatória focal e/ou sistêmica (particularmente em tecidos musculares, onde o parasito se aloja) objetivando a eliminação do parasito. O quadro inflamatório nos diversos órgãos de acometimento apresenta relação direta com a presença de parasitos (ninhos de amastigotas) e com a predominância de células mononucleares próximas das células parasitadas (Andrade, 2000). A resposta inflamatória após a infecção pelo parasito é essencial para a eliminação do *T. cruzi*, mas também torna-se primordial para os eventos patológicos digestórios e cardíacos, observados durante o curso da doença (Garcia et al. 2010).

1.2 Proteínas inflamatórias na matriz extracelular.

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma rede intrínseca de macromoléculas responsável por preencher os espaços intercelulares nos tecidos. A diversidade das diferentes macromoléculas e a forma como estão organizadas definem a estrutura da MEC, responsável pela adaptação funcional, resistência, transporte e comunicação/sinalização entre as células os tecidos (Alberts, et al., 2014; Turner et al., 1989).

A MEC é composta por duas principais classes de macromoléculas, as proteínas fibrosas e os glicosaminoglicanos (GAGS). Os GAGS geralmente se encontram associados a outras proteínas, formando os proteoglicanos. Proteínas fibrosas são

divididas em proteínas responsáveis pelo arcabouço estrutural, como colágeno e elastina e proteínas relacionadas á adesão matriz-célula, como fibronectina e laminina (Berrier & Yamada 2007; Kielty, et al., 2002). O tecido muscular cardíaco é um dos sítios importantes da infecção pelo *T. cruzi* já na fase inicial da infecção, mas principalmente na fase crônica onde há uma prevalência de parasitos (Egui et al, 2018). Como consequência, inúmeras células do sistema imune são ativadas e produzem mediadores inflamatórios de naturezas lipídicas e proteicas, além de coexistir a participação da resposta imune humoral atuando contra o parasito e também contra o próprio hospedeiro (Mocelin AO, et al 2005; Dutra & Gollob, et al 2008). Durante a tentativa de eliminar este parasito há, inevitavelmente, destruição de células hospedeiras e de plexos simpáticos e parassimpáticos, essenciais para o funcionamento autonômico cardíaco, além de ocorrer deposição de colágeno intermeando as áreas inflamadas. Estas ações, em conjunto, culminam em uma nova reorganização estrutural do órgão, afetando negativamente a funcionalidade do coração, sendo este evento denominado remodelamento cardíaco (Marin-Neto et al. 2007).

Por definição, o remodelamento cardíaco é uma alteração conformacional das células e da matriz extracelular do coração em resposta às mudanças moleculares, celulares e intersticiais. A MEC exerce um papel biológico dinâmico frente ao estresse descrito anteriormente e, no caso particular da cardiopatia induzida pelo *T. cruzi*, o colágeno produzido, em consequência da infiltração maciça e constante de células inflamatórias no miocárdio, promove alterações morfométricas importantes aos cardiomiócitos (Spinale et al. 2017). Essas alterações são dependentes da fibrose formada no miocárdio que, ao mesmo tempo que promove o reparo aos danos teciduais, também contribui para a dilatação ventricular e para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Vale ressaltar que a fibrose cardíaca não deve ser definida apenas pelo aumento da MEC no interstício dos cardiomiócitos, mas também pela alteração na conformação, no tipo e na forma como o colágeno se organiza (Li et al. 2000). Durante esta mudança na conformação MEC cardíaca, o colágeno é substituído por fibras colágenas com baixa capacidade de interação, num processo dependente das endopeptidases zinco-dependentes denominadas metaloproteinases (MMP) que, além de contribuírem para a dilatação ventricular (Rossini et al. 2010), regulam também a atividade inflamatória no sítio cardíaco (Spinale et al. 2017). Estas alterações afetam, diretamente, a funcionalidade

do coração e são, portanto, consideradas como importantes determinantes de progressão para os eventos de insuficiência cardíaca (Cohn et al. 2014).

Tanto em modelo experimental quanto em investigações envolvendo seres humanos, é sabido que a infecção do coração pelo *T. cruzi* induz um substrato inflamatório persistente (Coura et al, 2007). Esse processo inflamatório consiste de células linfocitárias (T CD8+ duas a três vezes mais abundante que as células T CD4+) e, em menor extensão, mas não menos importante, macrófagos, eosinófilos, células B, neutrófilos e mastócitos (Brenner & Gazzinelli 1997, dos Santos et al. 2001). Parte desse recrutamento leucocitário para o tecido cardíaco é coordenado por uma rede variada e integrada de quimiocinas/citocinas e seus respectivos receptores, sendo sua elevada expressão claramente associada com maior destruição do miocárdio ou mesmo disfunção cardíaca (Talvani et al. 2000, Talvani et al. 2004).

O recrutamento de leucócitos para o local da infecção após a entrada do parasito depende da ação de quimiocinas. As quimiocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular com características comuns no recrutamento seletivo de diferentes tipos leucocitários para o sítio da inflamação, através de gradientes de concentração e conforme a expressão de seus receptores nessas populações celulares (Frangogiannis 2004; Filippatos et al. 2003). Assim, recrutamento de leucócitos pode provocar também o aumento da expressão dos receptores de quimiocinas e das moléculas de adesão envolvidas no processo de recrutamento celular (Ropert et al., 2002).

A proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1)/CCL2 tem sido observada em macrófagos e cardiomiócitos humanos, ele é sintetizada por monócitos, células endoteliais, musculares lisas, epiteliais; (Kim et al., 2005; Machado et al., 2010). Essa quimiocina demonstra importantes correlações clínicas entre peptídeos/proteínas inflamatórias circulantes. Talvani e colaboradores (2004 a e b) reforçam que além de citocinas/quimiocinas (ex. TNF e CCL2), a alta expressão de seus receptores apresentam uma boa correlação com o gravidade da disfunção cardíaca.

A citocina IL-10 apresenta uma marcante atividade regulatória, está envolvida na supressão da proliferação de células T (Taga & Tosato, 1992). A IL-10 é responsável pela diminuição da síntese de IL-2, e secundariamente inibindo o IFN-gama, um importante promotor da resposta pró-inflamatória. Hunter e colaboradores (1997) demonstraram que apesar de camundongos deficientes na produção de IL-10 desenvolverem menor

parasitemia, apresentam índices de mortalidade maiores, mostrando como é essencial o equilíbrio na produção de mediadores pró inflamatórios e regulatórios.

1.3 Participação das metaloproteinases na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Dentre as diferentes MMPs, a MMP-2 e a MMP-9 destacam-se por seu envolvimento em doenças cardíacas pela degradação dos componentes da matriz no coração (Mittal et al. 2014) e, sendo este o alvo de maior relevância para a clínica/pesquisa básica associado à infecção humana/experimental pelo *T. cruzi*, estas MMPs tornaram-se importantes alvos de investigação. Em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e tratados com fármacos da classe das tetraciclinas (doxiciclina), propostas como inibidores exógenos das MMPs (Castro et al. 2011), foi investigada a atividade das MMP-2 e MMP-9 e observado um aumento da sobrevivência destes animais e redução da inflamação cardíaca e dos níveis circulantes de TNF, IFN-gama e óxido nítrico (Gutierrez et al. 2008). Este estudo *in vivo*, sugere a participação destas MMPs na indução da miocardiopatia experimental, possivelmente associada à migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco. Porém, o *T. cruzi* tanto é capaz de reduzir formas latentes e ativas de MMPs em cultura de hepatócitos quanto induzi-las (MMP-2 e MMP-9) em culturas de cardiomiócitos (Geurts et al. 2011). No contexto da transmissão materno-fetal, foi demonstrado que o *T. cruzi* induz expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9 na vilosidade coriônica humana e que, ao ser incubada com parasitos em presença de doxiciclina, há prevenção de lesão tecidual e redução parcial de infecção *ex vivo* neste tecido (Castillo et al. 2012). Por meio de análise densitométrica da atividade das MMPs, recentemente, demonstrou-se que indivíduos soropositivos para o *T. cruzi* apresentaram aumento de MMP-2 e MMP-9 quando comparados com indivíduos sem infecção, sendo a MMP-9 mais relacionada com anormalidades eletrocardiográficas nestes indivíduos, enquanto a MMP-2 relacionou-se mais com a presença de relaxamento anormal cardíaco em indivíduos com cardiomiopatia dilatada (Bautista-Lopes et al. 2013). Ainda, uma associação dos níveis circulantes destas MMPs (2 e 9) foi reforçada em indivíduos com as formas crônicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, onde os níveis séricos de MMP-9 mostrou-se associado com cardiopatia grave (Fares et al. 2013). Estes autores ressaltaram, ainda, as células T CD8+ como as principais fontes tanto de MMP-2 quanto MMP-9. Ainda há poucos estudos envolvendo as MMP-9 e a infecção pelo *T. cruzi*, mas sabe-se que as MMPs são essenciais para o tráfego de leucócitos pelos tecidos atuando na digestão das moléculas

da MEC (Hu et al. 2007, Zozulya et al. 2007, Figueiredo et al. 2018). Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 são capazes, ainda, de clivar quimiocinas essenciais no processo inflamatório associado à infecção pelo *T. cruzi*, como a CCL2, TGF- β e IL-1 β promovendo um mecanismo indireto de regulação de fluxo de células para o foco inflamatório (Deschamps & Spinale 2006, Paiva et al. 2009). As MMPs tornam-se, portanto, cruciais para a instalação da resposta inflamatória na infecção cardíaca pelo *T. cruzi* sendo que a atividade descontrolada destas proteases traduziria em dano tecidual grave e até morte ao hospedeiro mamífero.

1.4 A aplicabilidade do modelo cão no estudo da cardiopatia chagásica

O modelo cão tem sido utilizado por diversos pesquisadores por apresentar aspectos fisiológicos e cardíacos semelhantes da doença de Chagas desenvolvida no homem (Lumb et al., 1959; Mirowski et al., 1970).

Durante a fase aguda da infecção em cães é possível observar alterações cardíacas como: bloqueio de ramo esquerdo e intraventricular, lesões apoptóticas e necróticas, além de um intenso processo inflamatório acarretando em citotoxicidade. Os animais que sobrevivem a esta fase passam a uma fase latente da infecção, sem sinais de doença, com eletrocardiogramas normais (Andrade et al., 1981; Andrade, 1984). Já na fase crônica, o modelo cão pode desenvolver a forma cardíaca apresentando: cardiomegalia, arritmias, edema periférico, ascite e derrame pericárdico e um quadro de miocardite crônica progressiva. É possível observar, também, o desenvolvimento de uma inflamação cardíaca difusa, característica da CC humana (Tafuri et al., 1988; Caldas et al 2009; Diniz et al., 2010).

Estudo realizado por Lana e colaboradores (1992), demonstrou que cães sem raça definida infectados pelo *T. cruzi* apresentam reações sorológicas positivas (IgM, IgG e IgA) bem como o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica fibrosante difusa, similares a cardiopatia chagásica crônica humana. Guedes e colaboradores (2002) demonstraram que animais infectados com as diferentes cepas (Be-78, Y e Colombiana) que receberam tratamento com benznidazol (Bz) apresentaram aumento de sobrevivência e a cura parasitológica; sendo em 68,75% dos animais na fase aguda; e 38,7% dos crônicos infectados com a cepa Be-78 apresentaram cura. Esses resultados mostraram que a

resposta terapêutica a essa droga foi similar àquela encontrada em triagens clínicas de pacientes tratados com o fármaco.

Diante desses dados o cão se apresenta como um modelo ideal pois ao longo da infecção é possível o isolamento do parasito. O cão apresenta reações sorológicas positivas que indica a persistência da infecção; ele também apresenta manifestações clínicas da doença de Chagas crônica induzindo resposta imune contra o tecido do hospedeiro (Laranja 1953, Lana et al. 1992, Andrade et al., 1996; Sosa Estani et al., 1998; Guedes et al. 2009; Chan et al, 2009; WHO, 2017)

1.5. Estratégias farmacológicas

O Bz permanece como o fármaco de escolha para o tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil sendo sua maior eficácia terapêutica na fase aguda da infecção (Andrade et al.,1992). Este fármaco atua na via formação de radicais livres responsáveis pelas atividades *anti-T.cruzi*, exercendo uma função tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao próprio DNA do *T. cruzi*. O tratamento com esse fármaco visa a eliminação do parasito e, secundariamente, o retardo da progressão inflamatória nos tecidos acometidos (Stoppani et al, 1999; Urbina, et al 2010).

No entanto a procura por outros fármacos que apresentam este foco de atuação na resposta imune do hospedeiro apresenta-se como uma terapêutica necessária (Silveira *et al.*, 2000). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa teve como presente objeto de investigação um antibiótico da classe tetraciclina – a doxiciclina (Dox). A Dox atua inibindo a síntese protéica bacteriana e apresenta uma atividade nas infecções bacterianas possuindo um largo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Apresenta diversas propriedades favoráveis, tais como amplo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo e podem ser, na maioria dos casos, administradas por via oral (Liu et al, 2017).

A Dox é parcialmente inativada pelo metabolismo hepático, sendo esta tetraciclina capaz de atingir seu nível sérico entre 2 a 4 horas com meia-vida de 12 a 22 horas, sendo eliminada pelas fezes enquanto outras tetraciclinas são excretadas pelo rim (lactMed, 2006). Alguns efeitos adversos frequentes causados pela classe das tetraciclinas e suas formas semi-sintéticas são distúrbios gastrointestinais, incluindo anorexia, vômito,

náuseas e diarreia, ulcerações na boca, irritação da região perianal e reação de fotossensibilidade (Griffin et al 2010).

Portanto, ao utilizar terapia com doses sub-microbiais da doxiciclina (antibiótico com ação inibidora de MMPs) em concomitância com o benznidazol (fármaco com ação anti-*T.cruzi*), nossa hipótese é que a mesma atue inibindo moléculas de matriz extracelular, citocinas, quimiocinas e receptores associados aos aspectos histopatológicos promovendo, desta forma, um ambiente protetor cardíaco em cães com a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

2.0. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o perfil inflamatório e funcional no ventrículo esquerdo de cães infectados com a cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* após terapia com doxiciclina e benznidazol.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a função contrátil cardíaca em cães cronicamente infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e tratados com a doxiciclina e benznidazol.
- 2- Avaliar a estrutura microscópica do tecido muscular cardíaco (ventrículo esquerdo - VE) com a quantificação do infiltrado celular nestes animais
- 3- Avaliar a produção da quimiocina CCL2 no plasma e no VE dos cães infectados e estabelecer sua cinética.
- 4- Identificar o perfil de expressão dos receptores de quimiocinas (CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8 e CXCR3) no VE dos animais infectados com o *T. cruzi*.
- 5- Identificar o perfil de expressão das citocinas TNF, IFN-gama e IL-10 e no VE.
- 6- Avaliar a atividade e expressão proteica da MMP-2 e MMP-9 no VE.
- 7- Estabelecer correlações entre os parâmetros inflamatórios cardíacos e os parâmetros ecocardiográficos nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*

4.0. Metodologia

4.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados 30 cães sem raça definida, com 4 meses de idade, de ambos os sexos, provenientes pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP). Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum* e separados em baias de acordo com seu respectivo sexo. Antes do início dos experimentos, foi realizado tratamento com anti-helmínticos e vacinação contra doenças infecciosas (Cinomose, Adenovírus tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose canina).

Após este período, para melhor monitoramento, foi construída uma ficha individual para cada cão. Essa ficha era composta por: identificação, fotografia, idade, sexo, grupo experimental, medida naso-anal (do focinho até a base da cauda), peso e identificação das amostras de sangue colhidas de cada animal (Anexo 1).

Os procedimentos adotados neste trabalho 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 da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), com Protocolo No. 2013/60, de 12 de fevereiro de 2014 (Anexo 2).

4.2. Parasitos e infecção

Foram utilizados parasitos da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* obtidos camundongos *Swiss*, mantidos no CCA-UFOP. Para esse procedimento foi realizada a contagem dos tripomastigotas em uma amostra isolada do material sanguíneo. Essa amostra foi posteriormente diluída em solução salina a fim de determinar a existência de 2×10^3 parasitos em 0,5 ml de solução, que foi inoculada em cada animal.

Aos quatro meses de idade os cães foram inoculados, via intraperitoneal, com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* por quilograma de peso corporal dos animais. A infectividade da cepa foi verificada pela observação, através do exame de sangue a fresco, de parasitos no sangue periférico dos cães inoculados.

4.3. Tratamento e eutanásia

Os animais infectados foram divididos em quatro grupos experimentais contendo seis cães em cada um, de acordo com a natureza do tratamento. Seis cães constituíram o grupo controle não infectado. Os grupos foram distribuídos de acordo com mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais avaliados no experimento de quimioterapia

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

Os fármacos utilizados foram Doxiciclina (Dox) ((4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-(dimethylamino)- 3,5,10,12,12a-pentahydroxy- 6-methyl- 1,11-dioxo1,4,4a,5,5a,6,11, 12a-octahydrotetracene- 2-carboxamide) (Pharmlab®) e Benznidazol (Bz) (N-benzyl-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl) acetamide) (LAFEPE).

Para o tratamento diário dos animais foram empregados comprimidos, contendo 100 mg de Dox (diluídos em PBS + carboximetilcelulose 0.5% acrescido de caldo de carne para melhorar a palatabilidade), administrados individualmente por via oral. O medicamento foi administrado em duas doses de 50mg (manhã – início da noite), o tratamento foi iniciado aos 2 meses após a infecção pelo *T. cruzi* e administrado durante todo período do experimento, totalizando 12 meses de tratamento.

A terapia com o Bz teve início a partir do 9º mês de infecção com duração de 60 dias na dose diária de 7mg/kg por animal, administrado em duas doses (manhã - início da noite). O tratamento foi realizado por uma dupla de pesquisadores/estudantes, onde um pesquisador imobilizava o animal e o outro ministrava os medicamentos em uma seringa por via oral.

Durante o período de tratamento, seis amostras de 10mL sangue foram coletadas para obtenção de plasma e armazenadas em Freezer -80°C para realização de testes bioquímicos e avaliação de citocinas. O sangue foi coletado em tubo estéril (esterilizado com raio gama) de coleta S-Monovette® 90mm x 13mm contendo heparina acoplado a agulha múltipla estéril 0,8 x 25MM (Sarstedt Ltd, São Paulo, Brasil).

Para a eutanásia, os animais foram submetidos a um procedimento de anestesia com Tiopental sódico (Tiopentax, Cristália®) na dose de 20mg/Kg, seguido de uma injeção de 20 ml de cloreto de potássio (KCl) a 19,1%. Após constatação do óbito o animal era transferido para uma mesa de necropsia, em uma sala isolada, no laboratório de práticas cirúrgicas do CCA-UFOP. A Eutanásia foi realizada quando os animais completaram 18 meses de vida.

Para avaliar a ocorrência de variações no peso dos cães durante o tratamento, os animais foram pesados mensalmente durante todo o período de tratamento. O ganho de peso dos animais logo após o tratamento foi calculado subtraindo-se o peso de cada cão um dia após o término do tratamento pelo peso imediatamente antes do tratamento.

4.4. Ecocardiografia

Os animais foram submetidos a exames de ecorcardiograma: na pré-infecção, aos 2, 4, 8, 11 e 14 meses pós infecção, para avaliação funcional do órgão, em particular do ventrículo esquerdo. Para tal procedimento, o animal era pesado e posteriormente anestesiado com 0,5 mL/Kg corporal de Tiopental sódico (0,03 g/mL de solução salina 0,9%) por via endovenosa e logo após posicionados em decúbito lateral direito, com os membros mantidos em ângulo de 90° em relação ao corpo, sobre uma superfície isolante elétrica. Após esse procedimento era realizada a tricotomia (nas patas e região torácica), aplicação de gel e inserção dos eletrodos. Foram avaliados os dados de eixo longo e eixo curto durante a diástole e a sístole; com esses parâmetros calculou-se os valores de área do ventrículo esquerdo durante diástole, volume ventricular em diástole, volume ventricular em sístole e fração de ejeção. As imagens da ecocardiografia eram obtidas por intermédio do aparelho MyLab 30 cardiovascular (Esaote), as leituras e interpretações foram realizadas por um operador devidamente treinado e que desconhecia os tratamentos e/ou grupos experimentais.



Figura 1: Imagem ilustrativa do procedimento de ecocardiografia realizado em um dos cães do grupo experimental. Local: Centro de Ciências Animals (setor do canil) da UFOP.

4.5. Ensaios imunoenzimáticos

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado utilizando –se o plasma e o macerado do ventrículo esquerdo. Para este ensaio foram utilizados kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos - R&D Systems, Minneapolis, USA. Em placas de 96 poços foram adicionados 100 μ l de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-Tween (PBS adicionado de 0,05% de Tween 20) e as placas foram bloqueadas com 100 μ l/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. As amostras foram aplicadas em um volume de 100 μ l para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias

concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente.

Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente.

O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (Color Reagent B - R&D Systems, Minneapolis, USA). Cinco ml do cromógeno foi adicionado a 5 ml de água oxigenada (H₂O₂) adquirida pelo mesmo fabricante (Color reagent A - R&D Systems, Minneapolis, USA). Cem microlitros dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após vinte minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µl de H₂SO₄ 2,5M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, imediatamente após a adição de H₂SO₄ para o bloqueio das reações. A quantificação da citocina presente nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas dos peptídeos, analisadas pelo software SOFTmax PRO 4.0.

Os ensaios imunoenzimáticos de ELISA, realizados segundo o procedimento descrito a cima, foram aplicados para detecção dos níveis da quimiocina CCL2/MCP1, utilizando kit R&D Systems, Minneapolis, USA.

4.6. Histologia convencional:

4.6.1. Preparação do tecido

O tecido muscular cardíaco, fixado em formaldeído tamponado a 10%, foi desidratado em banhos sucessivos em álcool etílico, permanecendo, respectivamente, em álcool 70%, 80%, 90%, e 2 banhos de álcool absoluto em diferentes recipientes cada banho, por 30 minutos em cada um. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados com dois sucessivos banhos em xilol, permanecendo trinta minutos em cada recipiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a dois sucessivos banhos de 15 minutos cada um, respectivamente, em parafina I, parafina II a 60°C. Após esse procedimento os tecidos foram incluídos em blocos de parafina.

As lâminas que receberam os tecidos foram tratadas com álcool etílico e albumina com cânfora. Os cortes foram feitos em micrótomo com espessura de 4 μ m. Depois de realizado os cortes, o fragmento destacado do bloco foi rapidamente colocado em um recipiente contendo água e álcool e, logo após, em água a 40°C para distender o corte.

4.6.2. Coloração com Hematoxilina & Eosina

As lâminas montadas foram submetidas à coloração de Hematoxilina & Eosina (H.E) para análise do infiltrado inflamatório e parasitismo em tecido muscular cardíaco.

Inicialmente os cortes foram deparafinizados com dois sucessivos banhos em Xilol em recipientes diferentes por 30 minutos cada e, a seguir, hidratados com sucessivos banhos em concentrações decrescentes de álcool, sendo dois banhos de 15 minutos cada em álcool absoluto em diferentes recipientes, um em álcool 90%, 80% e 70% por 5 minutos cada. Após a hidratação, os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos, corados pela hematoxilina por 1,5 minutos e lavados em água corrente novamente durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela eosina por 40 segundos e lavados com 3 imersões em água corrente e mais 3 em álcool absoluto. Para montagem, as lâminas receberam uma lamínula com Entelan® (Merck, Alemanha).

4.6.3. Fotodocumentação

Antes da quantificação dos núcleos celulares e quantificação da área ocupada pelos parasitos (ninhos de amastigotas) no tecido muscular cardíaco, foi estabelecido o número mínimo de campos microscópicos que deveriam ser analisados para haver representatividade estatística. Foi utilizado um método onde o coeficiente de variação (CV) foi determinado a partir de contagens sucessivas dos campos histológicos. O método consistiu na obtenção de subgrupos menores de uma amostra de 70 campos aleatórios diferentes, avaliados de uma lâmina escolhida ao acaso. Foram sorteados subgrupos com número crescente de campos, onde os pontos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 campos serão escolhidos. A análise dos valores obtidos foi feita pelo cálculo estatístico descritivo do conjunto de valores obtidos em cada subgrupo. Dessa forma, foram determinadas a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) dos

resultados encontrados. Os sucessivos CV foram analisados até a obtenção de resultados constantes e o número de campos considerado como mínimo representativo será definido quando o incremento de campos não resultar em alteração superior a 20% no valor do CV.

Foram feitas análises quantitativas do tecido muscular cardíaco dos animais para o infiltrado inflamatório e para a carga parasitária. Para quantificação do número de núcleos foram obtidas imagens (campos) aleatórias (área total percorrida i no microscópio foi igual à $2,24 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) de cada coração, com objetiva de 40X, utilizando uma microcâmara Leica DM 5000 B e o software de captura de imagens (*Leica Application Suite versão 2.4.0R1*). As imagens serão processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3.

Para quantificação da carga parasitária no coração dos animais, foram obtidas imagens aleatórias de cada coração, com objetiva de 40X, em mesmo equipamento mencionado anteriormente e mensurada a área total de ninhos das formas amastigotas presente nos corações dos animais de cada grupo. Para esta análise será utilizado o software de domínio público *MacBiophotonics ImageJ 1,43m*, de distribuição gratuita pela *National Institutes of Health, USA (NIH)*

4.7.

4.7 Avaliação da expressão gênica por qRT-PCR para CCR5, CCR6, CXCR3, CCR3, CCR4 e CCR8 das citocinas TNF, IFN-gama e IL-10

4.8.1 Extração e purificação do RNA total das amostras de ventrículo esquerdo

Para a extração do RNA total, foram utilizadas aproximadamente 20mg de amostras de ventrículo esquerdo dos cães. Aos tubos contendo os fragmentos de tecido foram adicionados 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras foram maceradas utilizando um homogeneizador de tecidos (Tissue Lyser II, Quiagen, Hilden, Alemanha) e todos os instrumentos utilizados no processo de maceração, foram lavados com água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) e posteriormente limpos com gaze embebida com um removedor de nucleases (RNAses) RNaseAway (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Posteriormente, o homogeneizado de cada amostra foi transferido para um tubo “eppendorf” de 1,5mL e mantidos no gelo até que todas fossem maceradas. Após o término, as amostras foram retiradas do gelo e incubadas à temperatura de 21-23°C para

permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, USA) para cada 1mL de TRIzol® aos tubos contendo o homogeneizado e em seguida foram fechados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubado por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g em centrífuga (Eppendorf, NY, USA). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo “eppendorf” de 1,5mL, seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% (v/v) (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneizado suavemente invertendo o tubo por três vezes para precipitação do RNA total. Para purificação do RNA total contido na amostra, utilizou-se o kit de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega, Madison, USA) com algumas adaptações descritas a seguir. O RNA obtido como descrito acima, foi transferido para um “spin basket” acoplado a um tubo coletor de 2mL e centrifugado a 12000 x g por 2 minutos em centrífuga. O líquido residual no tubo coletor foi descartado após as centrifugações. Foram então adicionados 600µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e em seguida centrifugado a 12000 x g por 2 minutos. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para assegurar a ausência de contaminação por DNA genômico. Para isso, foi preparado um mix contendo 40µL de “yellow core buffer”, 5,0µL MnCl₂ 0,09M e 5µL de DNase e aplicado sobre a membrana do spin e incubado por 25 minutos a temperatura de 21-25°C. Posteriormente, foi adicionado 200µL de “SV DNase Stop Solution” para inibição da atividade enzimática da DNase. Realizou-se então a centrifugação a 12000 x g por 2 minutos e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 600L de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e centrifugado por 12000 x g por 2 minutos. Adicionou-se então, 250µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution), seguido de centrifugação a 14000 x g por 3 minutos. Posteriormente, o spin foi transferido para um tubo de eluição e adicionou-se 100µL de água livre de nucleases seguido de centrifugação a 12000 x g por 2 minutos. As amostras foram armazenadas em -80°C até o momento do uso.

4.8.2 Quantificação, avaliação do grau de pureza e integridade do RNA total extraído

Para a quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA extraído, foi utilizado espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA). Foi utilizado 2µL de RNA total e o grau de pureza em relação à presença de proteínas foi avaliado utilizando a

relação dos valores de absorvância obtidos a A260/280nm. O grau de contaminação por outros compostos (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) foi avaliado pela absorvância A260/230nm. A integridade do RNA extraído foi realizada em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA. As amostras consideradas adequadas para avaliação dos níveis de transcritos de mRNA foram as que apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades do RNA ribossomal.

4.8.3 Transcrição reversa (síntese da 1ª fita de DNA complementar- cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Applied Biosystems, Foster City, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, adicionou-se em um tubo 1µg de RNA total extraído presente em um volume final máximo de 10µL. Posteriormente, foi adicionado 10µL do mix de transcrição reversa (RT Buffer 10X, dNTP Mix (100Mm) 25X, RT Random primers 10X, enzima Multiscribe, Rnase inhibitor e água livre de nucleases) em cada tudo de 0,2mL contendo o RNA. Além disso, foi adicionado um controle negativo contendo todos os reagentes menos a amostra, com o objetivo de se verificar possíveis contaminações dos reagentes. Subsequentemente, os tubos contendo as amostras foram colocados no termociclador (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 4°C, consecutivamente. Após o término, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real.

4.8.4 Expressão de citocinas por qRT-PCR

O ensaio para avaliação da expressão gênica das citocinas TNF, IFN-gama e IL-10 nas amostras de ventrículo esquerdo, foi realizado utilizando os iniciadores (primers) na concentração de 2,5p/mol, SYBR™ Green (Applied Biosystems, EUA), cDNA diluído 5x em água livre de nucleases, perfazendo um volume final de 10µL de reação sendo a reação processada em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). Os primers utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela 3, assim como a sequência de nucleotídeos, a função e o tamanho dos amplicons. O ensaio foi realizado em duplicata para todos os genes juntamente com o gene normalizador presente na mesma placa que os genes avaliados. Os resultados foram expressos pelo

método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) que consiste de uma quantificação relativa que utiliza fórmulas aritméticas para determinar as diferenças na expressão de um alvo de uma amostra comparando com a sua expressão em uma amostra controle. Sendo assim, neste tipo de análise é realizada uma normalização de expressão deste alvo para cada amplificação, ou seja, sua expressão é subtraída pela expressão de um gene constitutivo que é expresso de maneira semelhante em diferentes tecidos e em diferentes condições. Assim, para cada amostra alvo, foram amplificados os genes das citocinas (TNF, IFN-gama, IL-10 e TGF- β) e o gene constitutivo (GAPDH), de forma a se obter os valores dos Threshold Cycles (Ct) correspondentes e a realização dos cálculos para obtenção dos resultados.

Tabela 2: Sequência dos primers para receptores de quimionas CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR3 e citocinas TNF, IFN-gama e IL-10

As sequências utilizadas foram baseadas nos nucleotídeos obtidos do Gen Bank Database.

Alvo	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Alvo	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')
CCR3	<i>CTAGCAGCCTCCCTGAATTA TGTTCACTCCTTTGGGACT</i>	CCR6	<i>AGCTGTTTGTGCCAATTGCTTA AAAATATTGCCAGGAGGC</i>
CCR4	<i>TTTGGACTAGGTCTCTGCAAGA AAAAGCCCACCAGGTACATC</i>	CCR8	<i>TGATATCATCTCAAGCCCCTG AGCAACTTGCTGTCTCTTTGGA</i>
CCR5	<i>TGTGTCTGCTTCAAAGCCC TCACTTGTCACCACCCAAA</i>	CXCR3	<i>TTCTTTGCCATCCCAGATTTT ATGCATGGCATTAGGCG</i>
TNF	<i>TTCCACGGCACAGTCAAG ACTCAGCACCAGCATCAC</i>	IFN-γ	<i>TCAACCCCTTCTCGCCACT GCTGCCTACTTGGTCCCTGA</i>
IL-10	<i>AGAACCACGACCCAGACATC CCACCGCCTTGCTCTTATT</i>		

4.9- Zimografia

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito por SUNG e colaboradores, 2007. Utilizou-se gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina do tipo A de pele suína (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo. EUA ou gelatina padrão comercial) na concentração de 2 mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (p/v) empregando-se placas de 0,75mm. Após obter a concentração proteica, se acrescentou o volume necessário para um total de 30 µg de proteína para cada amostra (de acordo com cálculos realizados para cada amostra), o tampão RIPA e tampão de amostra para SDS-PAGE. Antes da aplicação no gel as mesmas foram aquecidas por dois minutos a 37°C banho úmido. Um volume de 10 µL do marcador padrão de massa molecular (BLUeye Prestained Protein Ladder – Genedirex) foi utilizado em todas as corridas. A corrida da eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100 V no mesmo sistema utilizado para o western blotting. Após a eletroforese os géis foram cuidadosamente lavados 3 vezes em 2.5% Triton X-100 para total remoção do SDS seguido de incubação a 37°C por 24h em tampão contendo o substrato (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% NaN₃ (pH 7.5)). O SDS é o agente responsável pela ativação das metaloproteases mesmo na forma inativa sem clivagem proteolítica (TALHOUK et al. 1991).

Os géis foram corados com 0.05% Coomassie Brilliant blue G-250 por 3 horas e descorados com solução descorante (4% metanol, 8% ácido acético e água). A atividade gelatinolítica foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína.

4.9.1 - Análise da densitometria de bandas

A análise das bandas dos géis provenientes da Zimografia foram quantificadas com auxílio do software Quantity One (BioRad) utilizando uma estação de captura de imagem (Carestream 4000 MM Pro Image Station) e do software ImageJ versão 1.32j de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/> onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Foi utilizado como parâmetro para análise o volume ajustado das bandas, diminuído do background. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar outra banda.

4.10. Análises Estatísticas

Todos os resultados foram submetidos a testes estatísticos para confirmação matemática das possíveis diferenças entre grupos em suas respectivas análises. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para comparação simples entre 2 colunas foi utilizado o Teste t student. Para múltiplas comparações utilizou-se o teste One way ANOVA com pós-teste de *Tukey* quando as amostras apresentaram normalidade e *Kruskal-Wallis* com pós-teste *Dunn's* para conjunto de dados não paramétricos. Para os testes de correlação foi utilizado o teste de *Pearson e Spearman*.

Todas as análises e gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.01 e foi assumido um grau de significância de $p < 0,05$

5.0. Resultados

5.1. Observações experimentais qualitativas

Durante o experimento não foi observado nenhum comportamento anormal dos cães independente da infecção e dos tratamentos recebidos. Não houve perda de animais relacionadas à infecção ou aos tratamentos. Todos os animais mantiveram a docilidade da fase “de filhote” não havendo incidentes com pesquisadores/estudantes que participaram dos experimentos. No entanto, foram relatados alguns eventos de agressividade entre os cães, dentro das baias, atribuídos aos períodos de cio das fêmeas.

A figura 2 mostra a alteração de peso dos cães tratados com Dox e Bz comparativamente aos cães infectados e não tratados. Não houve perda de peso significativa nos animais tratados, mostrando um aumento deste parâmetro proporcionalmente ao crescimento dos animais.

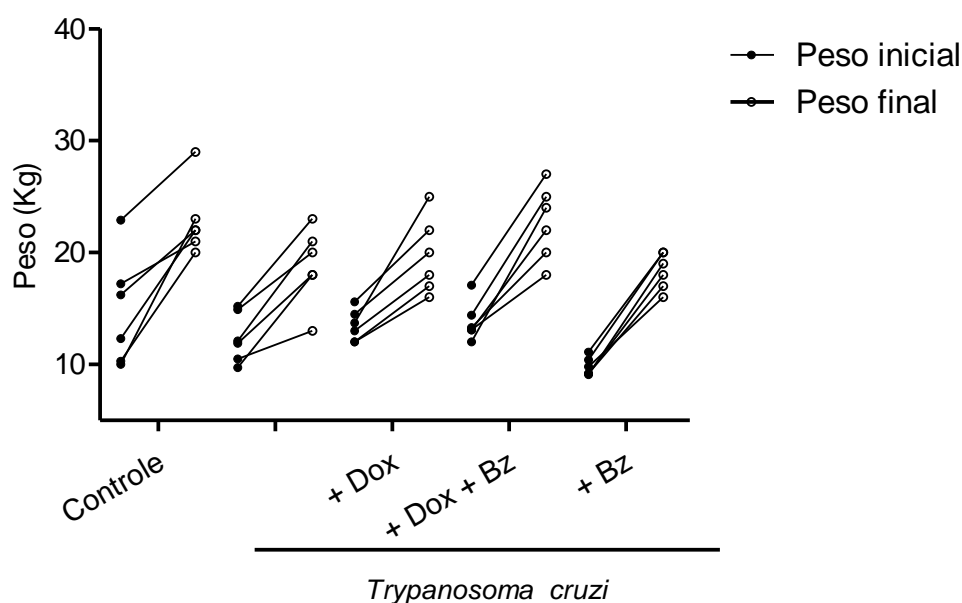


Figura 2: Peso corporal dos cães. Peso corporal dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob tratamento com Dox, Dox+Bz e Bz. Animais foram pesados no início da infecção (Peso inicial) e ao final do tratamento/eutanásia (Peso final). Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. Controle: animais não infectados. Infecção *T. cruzi*: animais infectados não tratado.

5.2 Processo inflamatório no ventrículo esquerdo

O tecido muscular cardíaco (região ventricular esquerda) foi avaliado pela coloração de H&E e observou-se um padrão inflamatório de células mononucleares, de caráter difuso e elevado em todos os animais infectados.

Não se observou diferença entre os grupos de tratamento com Dox e grupo tratado com Dox + Bz (Figura 3). Todos os grupos tratados apresentaram diferença em relação ao grupo de animais infectados não tratados

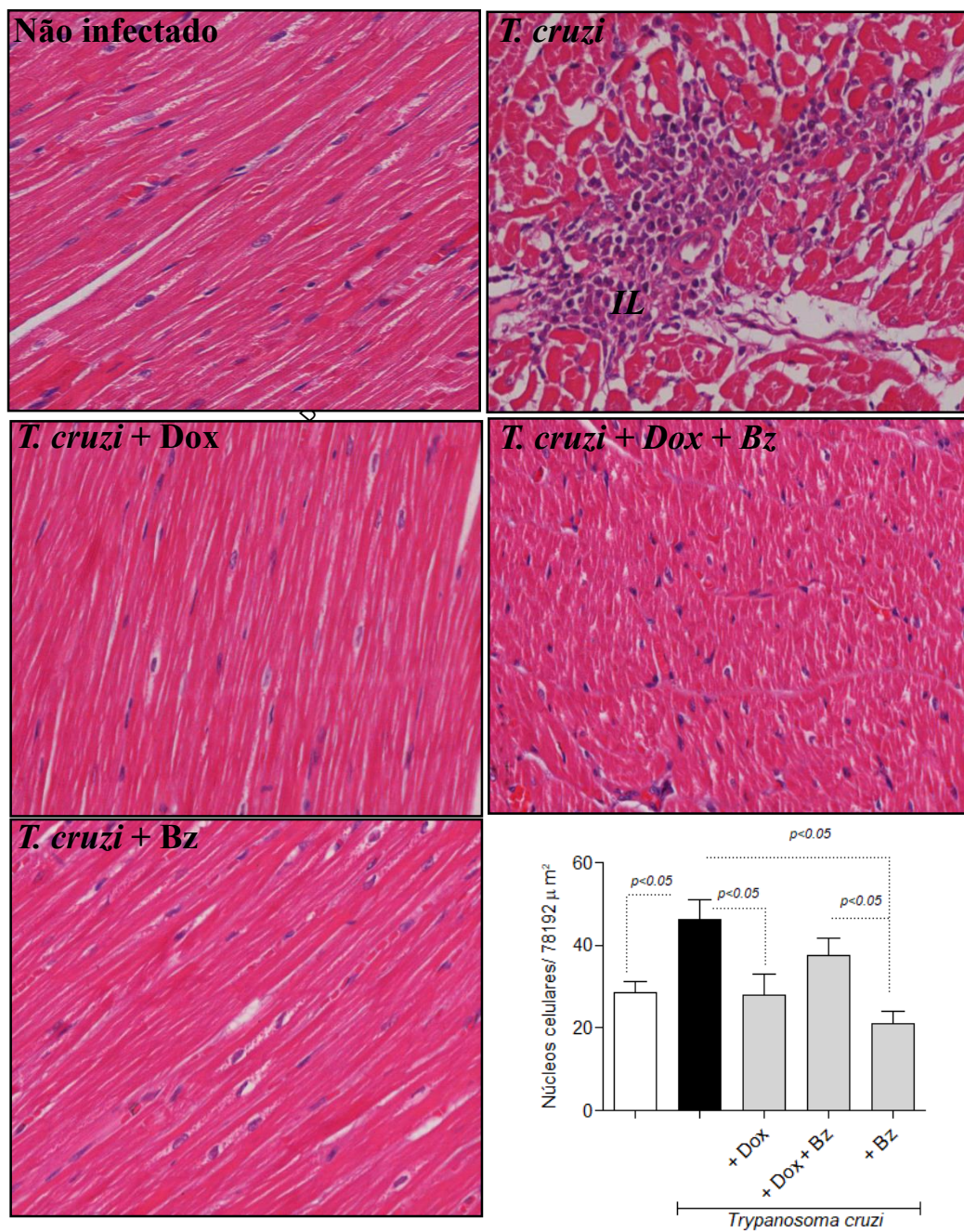


Figura 3. Número de células inflamatórias (coloração H&E). Ventrículo esquerdo dos animais não infectados e infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos. Cães infectados com *T. cruzi* e tratados com doxiciclina (Dox), com benznidazol (Bz), ou com a associação de Dox + Bz. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). IL: infiltração de leucócitos. Nesta imagem não tinha a régua de proporção de tamanho? Não é a do artigo? Lembro que o Wanderson colocou a pedido da revista.

5.3. Ecocardiografia

Os dados relativos à funcionalidade cardíaca nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (fração de ejeção, à espessura da parede cardíaca e septal) foram apresentados utilizando-se uma curva com início do tratamento e 2, 4, 8 11 e 14 meses após início da terapia, sendo a eutanásia realizada após a última coleta (14º mês).

As curvas das médias de porcentagem da fração de ejeção/m² apresentaram um declínio para os animais infectados, independente de existir ou não tratamento farmacológico. Ao término do tratamento, os animais infectados pelo *T. cruzi* apresentaram menor porcentagem na fração de ejeção/m² menor quando comparado aos animais não infectados (Figura 4).

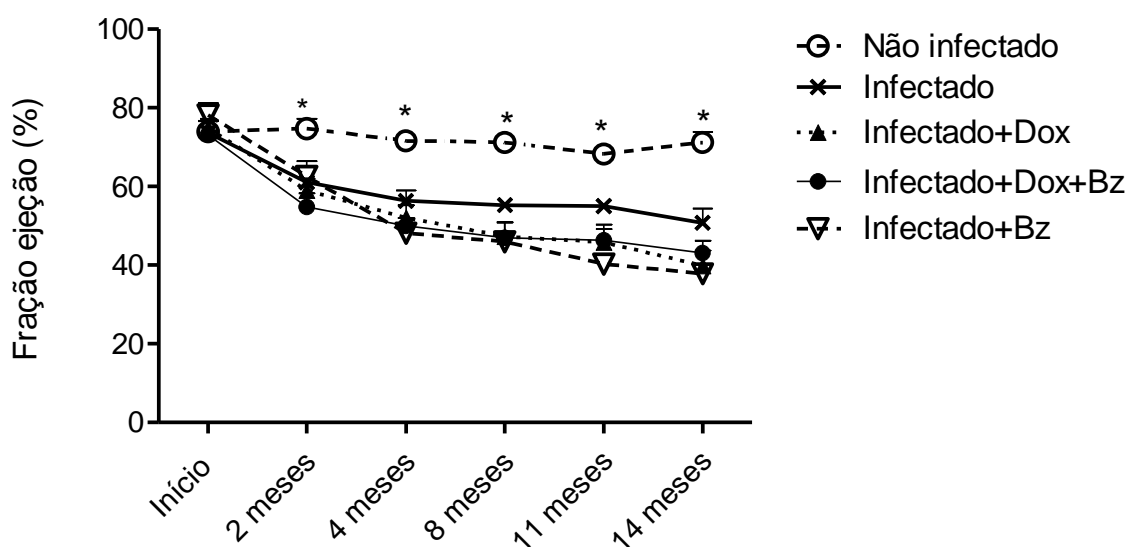


Figura 4: Porcentagem da fração de ejeção. Curva das médias de porcentagem de fração de ejeção/m² nos 6 diferentes pontos; entre o ponto inicial e o ponto final de coleta de dados (14 meses) de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados ou não com Doxiciclina (Dox) e/ou Benznidazol (Bz). Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. Símbolo (*) representa diferença estatística entre animais não infectados em relação aos animais infectados não tratados e animais infectados com os diferentes tratamentos.

Na avaliação da espessura da parede cardíaca do ventrículo esquerdo não houve diferença ao longo do tratamento. No momento da eutanásia (14 meses de infecção) os animais tratados com Dox apresentaram maior espessura da parede quando comparados com os animais não infectados e aqueles tratados com Bz (Figura 5).

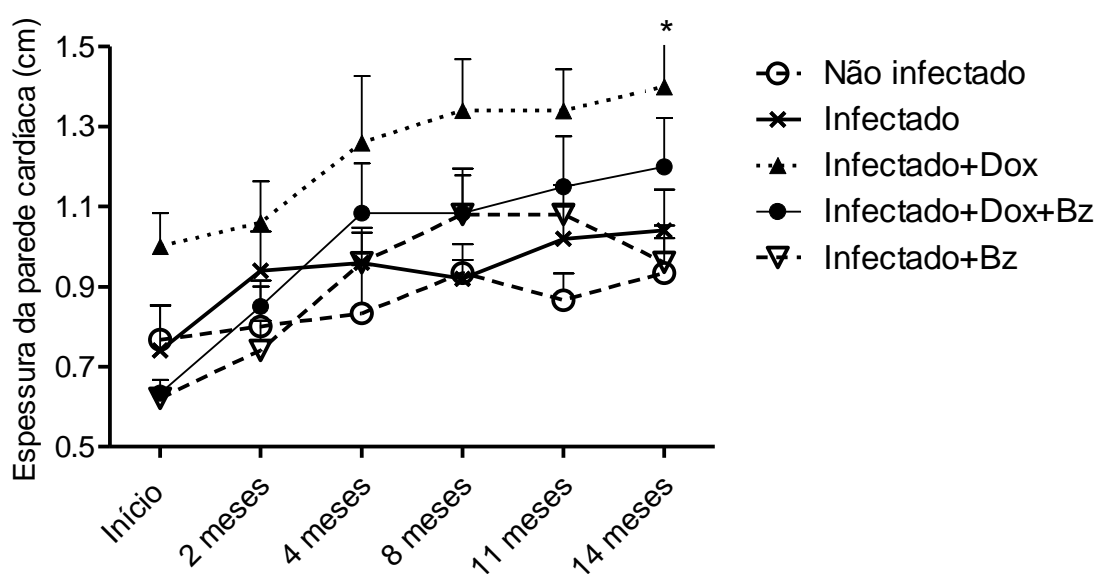


Figura 5: Espessura da parede cardíaca. Curva das médias da espessura da parede cardíaca em centímetros (cm); entre o ponto inicial e o ponto final de coleta de dados (14 meses) de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados ou não com Doxiciclina (Dox) e/ou Benznidazol (Bz). Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. (*) representa diferença estatística entre animais tratados com Dox e os animais tratados com Bz e não infectados (controle) no 14º mês.

Semelhante ao descrito anteriormente, as curvas de espessura da parede posterior também não apresentaram diferenças entres os tratamentos, ao longo do experimento. No 14º mês de tratamento os animais do grupo tratado com a combinação Dox + Bz apresentaram maior espessura da parede posterior quando comparada com o grupo de animais não infectados (Figura 6).

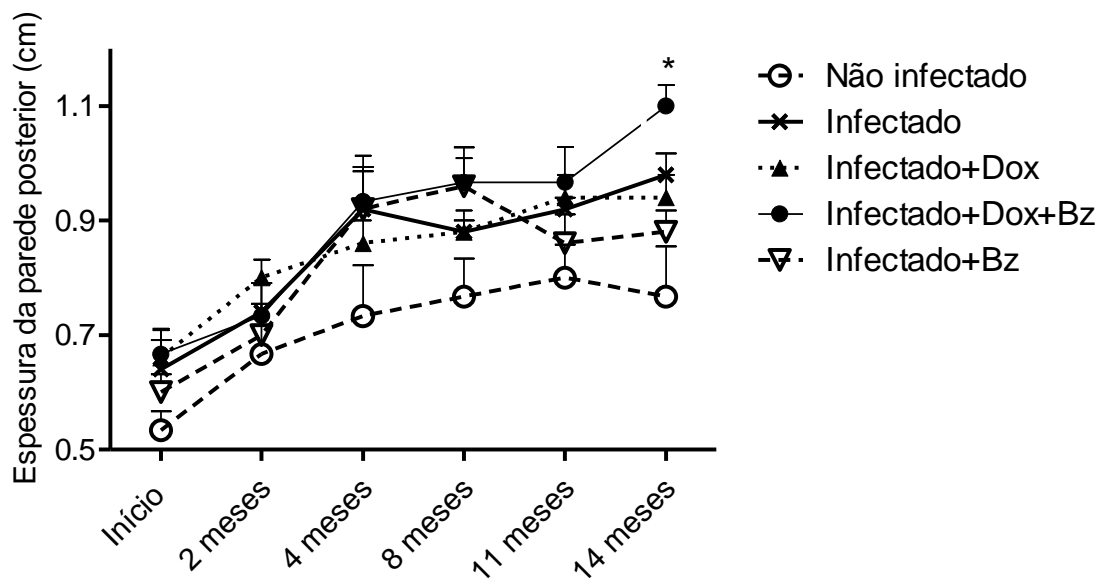


Figura 6: Espessura da parede posterior cardíaca. Curva das médias da espessura da parede posterior em centímetros (cm); entre o ponto inicial e o ponto final de coleta de dados (14 meses) de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados ou não com Doxiciclina (Dox) e/ou Benznidazol (Bz). Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. (*) representa diferença estatística entre animais tratados com Dox + Bz e os animais não infectados (controle) no 14º mês.

5.5. PCR em tempo real

Na avaliação da expressão de mRNA para os receptores de quimiocinas pela técnica de PCR em tempo real, os dados foram divididos em 2 painéis sendo - Painel A contendo CCR5, CCR6, CXCR3 (Figura 7) e Painel B contendo CCR3, CCR4 e CCR8 (Figura 8).

No painel A, é possível notar que a expressão do receptor da quimiocina CCR5 encontra-se aumentada nos animais infectados em relação ao grupo não infectado. Esse grupo de animais infectados também apresenta maior expressão do receptor em relação aos grupos de animais tratados com Dox + Bz e tratado com Bz. Em relação ao grupo de animais tratados com Dox a expressão do receptor da quimiocina foi semelhante aos animais infectados não tratados (Figura 7).

Na avaliação de CCR6 apresentou perfil de expressão aumentada nos animais infectados, sendo que seus níveis apresentaram redução nos diferentes grupos de tratamento. Não foi observada diferença na expressão de CCR6 entre o grupo de animais infectado não tratados e o grupo não infectado.

Avaliando a expressão da quimiocina CXCR3 os animais não infectados apresentaram maior expressão apresentando diferença quando comparado ao grupo de tratamento com Dox + Bz com o grupo tratado com Bz. Os animais infectados não tratados não apresentaram diferença em seus níveis de expressão CXCR3 frente aos demais grupos avaliados.

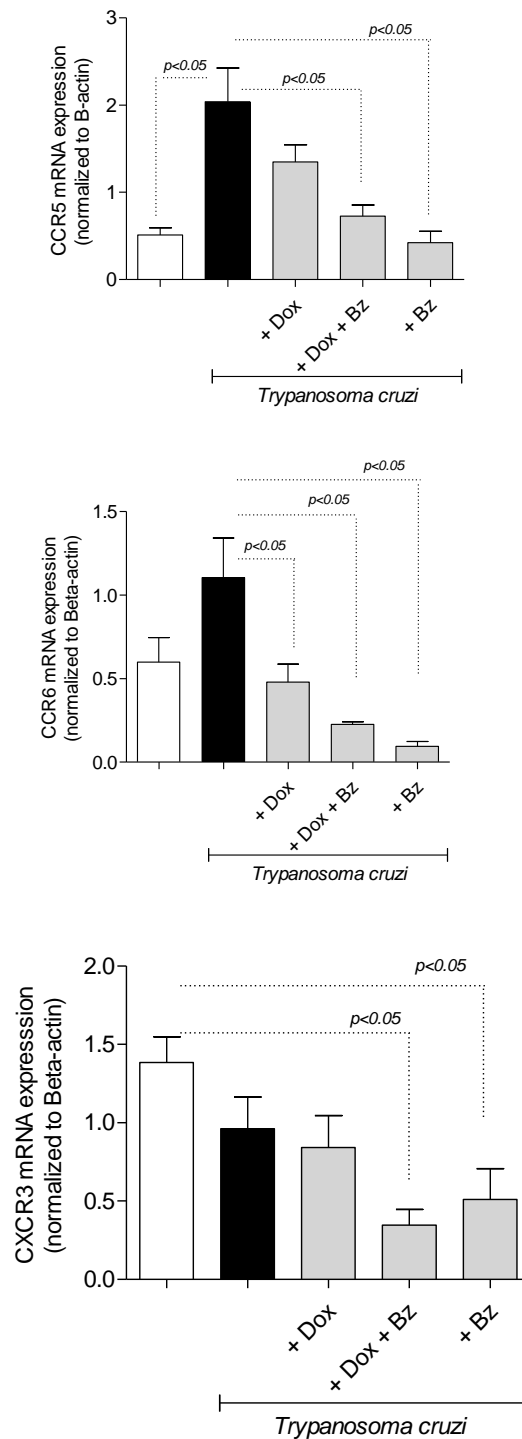


Figura 7: Expressão de receptores de quimiocinas CCR5, CCR6 e CXCR3. Expressão de mRNA dos receptores de quimiocinas semelhantes a Th1 (CCR5, CCR6 e CXCR3) avaliada nos tecidos do ventrículo esquerdo de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os dados são representativos dos grupos ($n = 5$ animais) em que a expressão dos receptores de quimiocinas foi normalizada para a beta-actina. Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

No painel B (Figura 8), a expressão do receptor da quimiocina CCR3 apresentou menor expressão no grupo tratado com Dox+ Bz quando comparado ao grupo de animais infectados não tratados.

Analisando a expressão do receptor das quimiocinas CCR4 e CCR8 podemos observar o mesmo perfil, onde os grupos de cães tratados com Dox + Bz e o grupo tratado com Bz apresentaram redução na expressão quando comparado aos animais infectados e não tratados. Para ambas as quimiocinas (CCR4 e CCR8), não observamos diferença na expressão do seu receptor entre os grupos de animais não infectados e animais infectados não tratados.

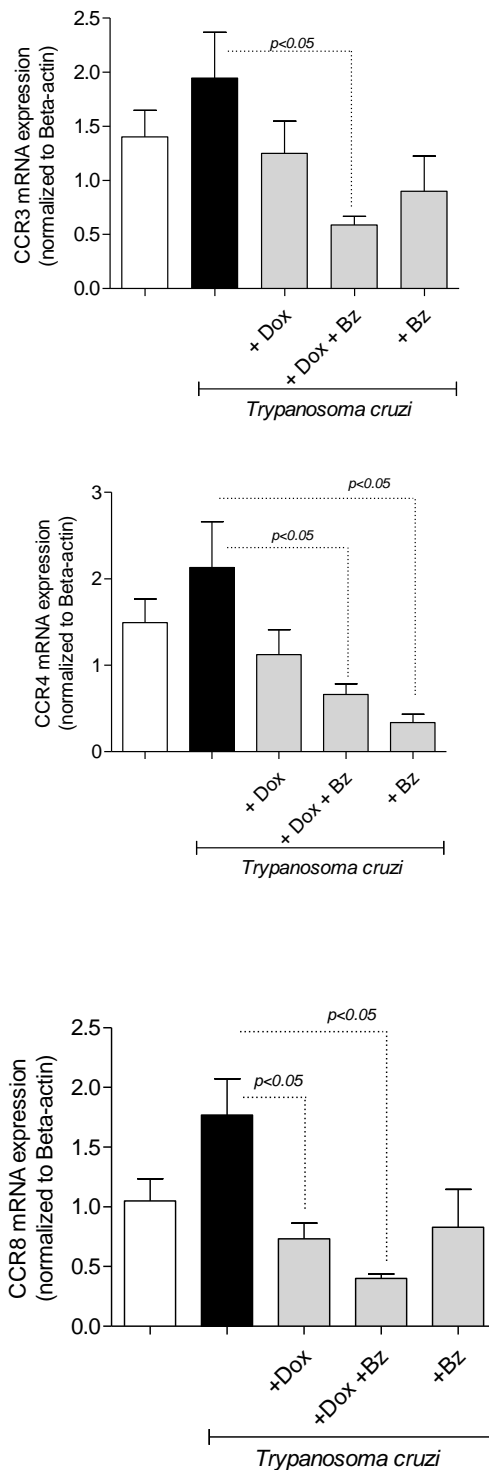


Figura 8: Expressão de receptores de quimiocinas CCR3, CCR4 e CCR8. Expressão de mRNA dos receptores de quimiocinas semelhantes a Th1 (CCR3, CCR4 e CCR8) avaliada nos tecidos do ventrículo esquerdo de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os dados são representativos dos grupos ($n = 5$ animais) em que a expressão dos receptores de quimiocinas foi normalizada para a beta-actina. Dados (mean \pm SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na análise da expressão do mRNA para as citocinas IFN-gama e TNF, foi observado aumento em sua expressão no grupo de animais infectados não tratados; esse grupo demonstrou diferença na expressão quando comparado aos animais não infectados (Figura 9).

Sendo assim ambas as citocinas apresentaram o mesmo perfil de expressão, onde observamos um aumento da expressão no grupo de animais infectados não tratado quando comparamos o grupo de animais infectados Dox+Bz e Bz. Não foi observada diferença na expressão das citocinas IFN-gama e TNF entre os grupos de animais tratados com os diferentes fármacos.

Na expressão da citocina IL-10 (no ventrículo esquerdo dos cães, houve um aumento no grupo de animais infectados não tratados quando comparado ao grupo de animais tratado com Bz (Figura 10).

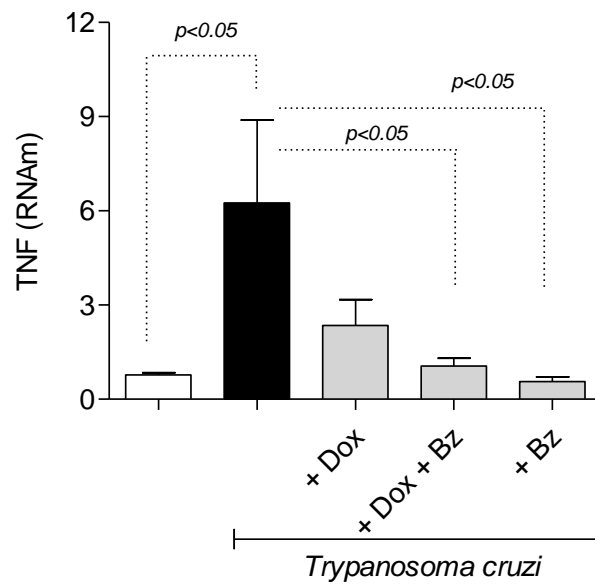
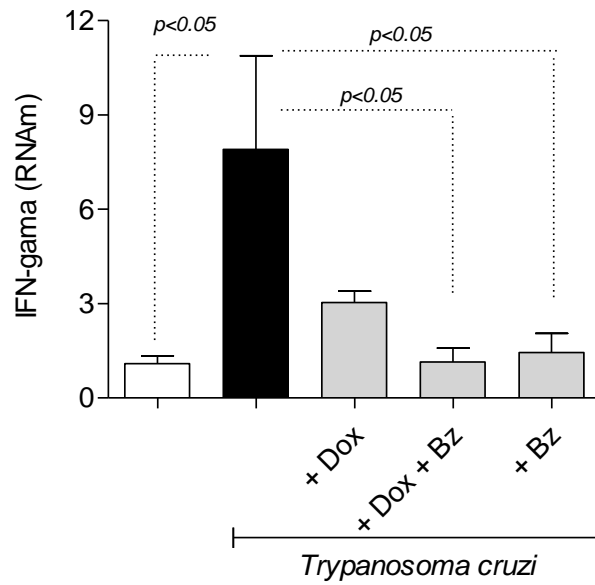


Figura 9: Expressão do mRNA da citocina IFN-gama e TNF. Expressão do mRNA da citocina IFN-gama e TNF ventrículo esquerdo de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os dados são representativos dos grupos ($n = 5$ animais) em que a expressão dos receptores de quimiocinas foi normalizada para a beta-actina. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos.

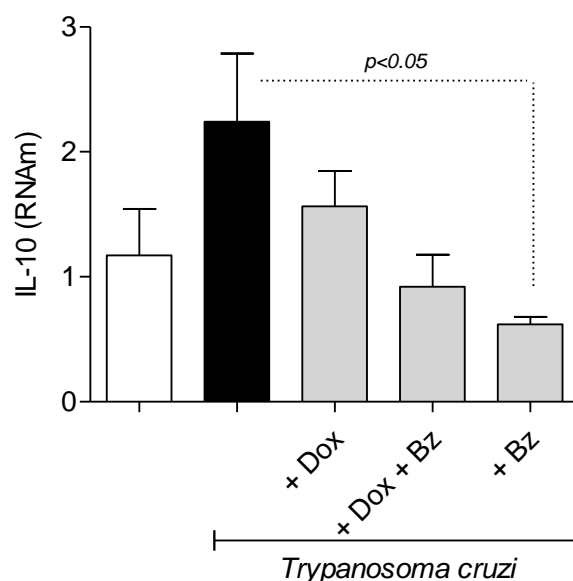


Figura 10: Expressão do mRNA da citocina IL-10. Expressão do mRNA da citocina IL-10 ventrículo esquerdo de cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os dados são representativos dos grupos ($n = 5$ animais) em que a expressão dos receptores de quimiocinas foi normalizada para a beta-actina. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

5.6 Cinética de produção da CCL2

Na cinética de avaliação sorológica dos níveis de CCL2 foram observadas concentrações maiores desta quimiocina após 8 meses de infecção nos grupos de animais infectados não tratado e no grupo de animais tratados com Bz em comparação ao grupo controle (não infectado). Essa mesma diferença foi observada no tempo de 14 meses após infecção, não sendo observada diferença entre os grupos com os distintos tratamentos farmacológicos (Figura 11).

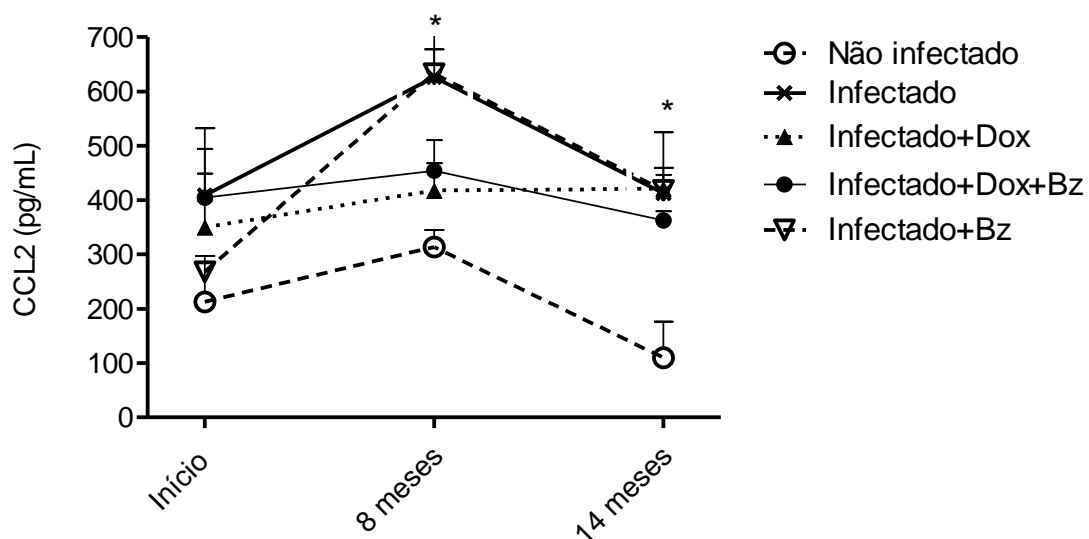


Figura 1: Concentração plasmática da quimiocinas CCL2. Dosagem plasmática da quimiocina CCL2 por ensaio imunoenzimático (ELISA) dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos entre o ponto inicial, 8 meses e 14 meses após infecção. Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. Símbolo (*) representam diferença estatística quando comparado ao grupo de animais não infectados.

Foi realizada, também, a avaliação da quimiocina CCL2 no macerado do ventrículo esquerdo dos animais no 14º mês de infecção. No entanto não houve nenhuma alteração entre os grupos experimentais (Figura 12).

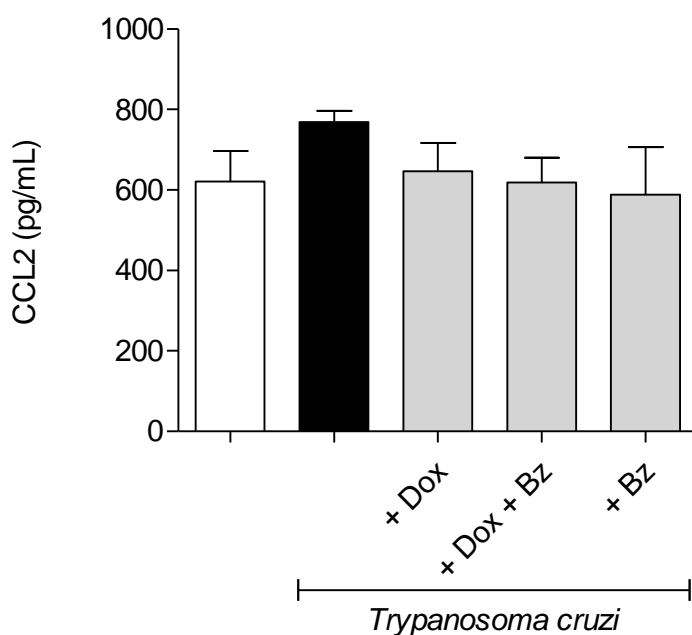


Figura 2: Concentração da quimiocinas CCL2 no ventrículo esquerdo. Dosagem no macerado tecidual da quimiocina CCL2 por ensaio imunoenzimático (ELISA) dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos. Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey.

5.7. Atividade das metaloproteinasas 2 e 9 no ventrículo esquerdo

Ao analisar a atividade da MMP-9 no ventrículo esquerdo (Figura 13) de cães na fase crônica, observa-se uma redução em sua atividade no grupo que recebeu intervenção terapêutica com a Dox em relação ao grupo de animais infectados não tratados.

Ao avaliar a atividade da MMP-2 (Figura 14), nota-se aumento em sua atividade no grupo de animais infectados não tratados em comparação ao grupo que não recebeu intervenção terapêutica. Podemos observar redução da atividade da MMP-2 nos grupos infectados que recebam tratamento com Dox e grupo de tratamento com Bz em relação ao grupo de animais infectados não tratado. A figura 15 é representativa do gel de Zimogênio

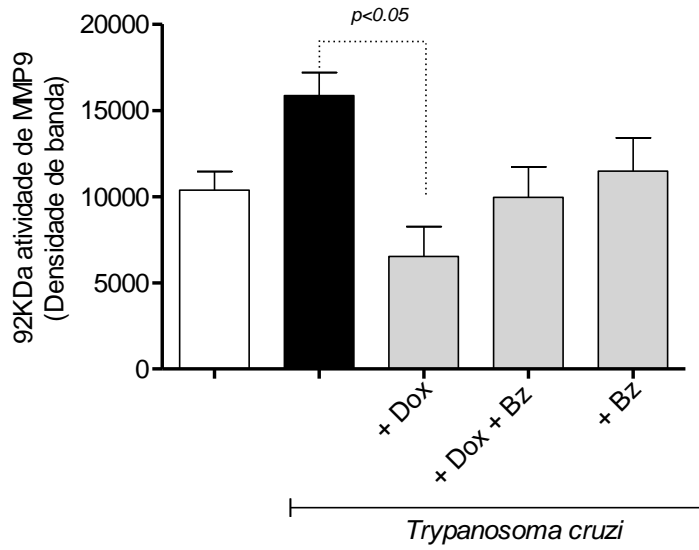


Figura 13- Atividade de metaloproteinase 9 (MMP9) no ventrículo esquerdo. Fragmentos do ventrículo esquerdo dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos, foram processados por zimografia de gelatina para avaliação de da atividade das MMP-9. Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p<0,05$).

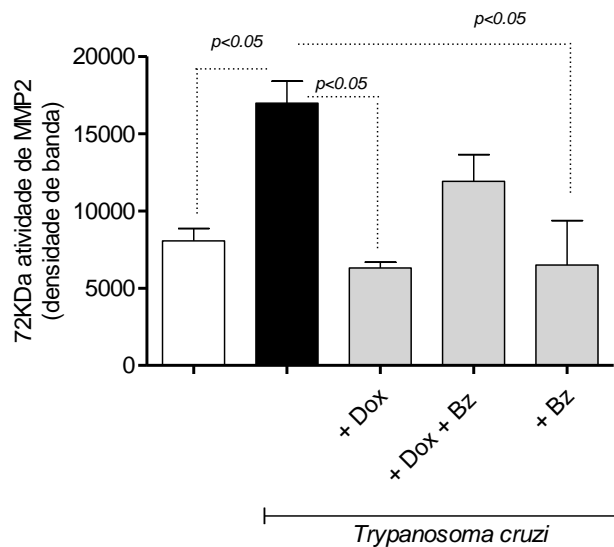


Figura 14- Atividade de metaloproteinase 2 (MMP2) no ventrículo esquerdo. Fragmentos do ventrículo esquerdo dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos, foram processados por zimografia de gelatina para avaliação de da atividade das MMP-2. Dados (mean±SEM) submetidos a One way ANOVA com pós-teste Tukey. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

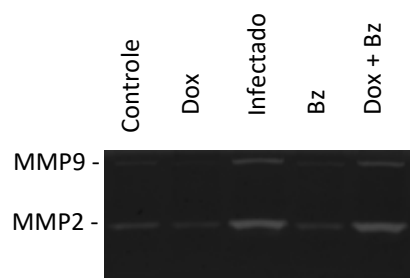


Figura 15- Imagem representativa das bandas de MMP- 9 e 2. Imagem do gel de zimografia de gelatina, obtido a partir do soro dos cães não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos. O gel foi digitalizado utilizando o scanner GS-800 *Calibrated Densitometer* (Bio-Rad) e a quantificação das bandas foi realizada através do software *Quantity One*®.

5. 8 Correlação quimiocina CCL2

Em relação à quimiocina CCL2, responsável pela quimiotaxia de monócitos/macrófagos para o sítio inflamatório, foi também estabelecido um estudo de correlação. As análises de correlação foram realizadas com a concentração plasmática da e outros parâmetros inflamatórios e cardíacos.

A quimiocina CCL2 e os núcleos inflamatórios da histologia em HE, não apresentaram correlação entre os grupos estudados. Não houve associação significativa quando relacionado às concentrações de CCL2 com porcentagem de fração de ejeção (%). Foram avaliadas a correlação entre as concentrações de citocina plasmática e no macerado do ventrículo esquerdo. No entanto não apresentaram correlação entre os grupos estudados (Figura 16).

A Figura 17 mostra as análises de correlação que foram realizadas com a concentração plasmática da quimiocina CCL2 obtida do macerado cardíaco do ventrículo esquerdo dos animais e as dosagens de IFN-gama, TNF e IL-10. Não houve associação significativa quando relacionado às concentrações de CCL2 com TNF e IL-10. No entanto os níveis de IFN-gama apresentaram correlação com os níveis da quimiocina CCL2 obtida do macerado cardíaco do ventrículo dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos.

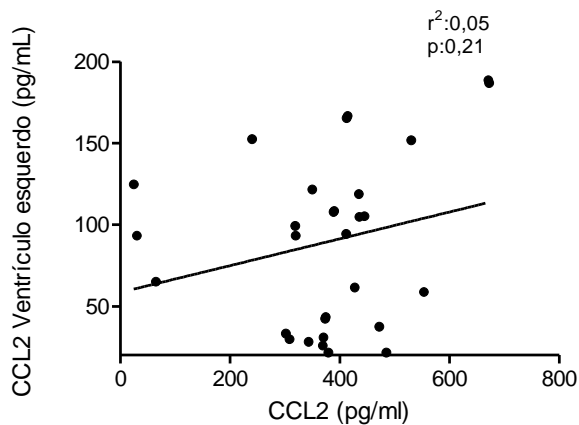
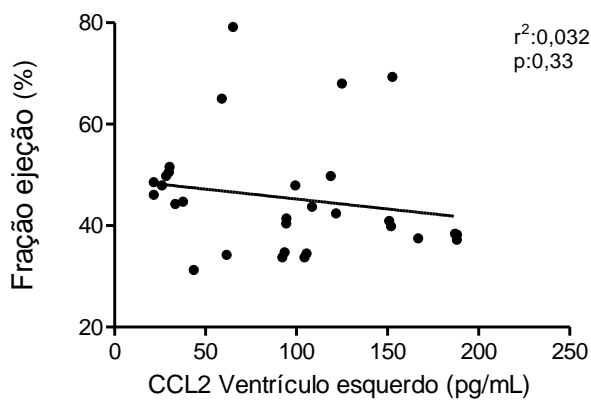
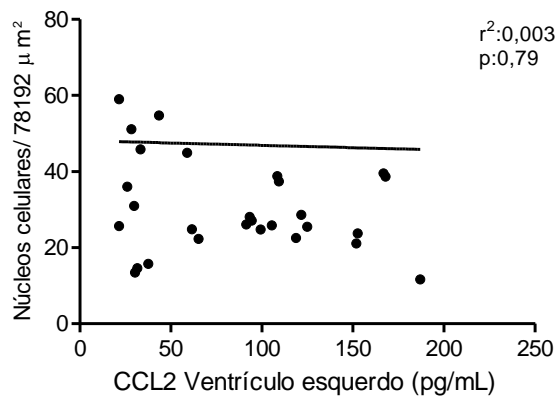


Figura 16: Correlação da quimiocina CCL2 parâmetros inflamatórios e cardíacos.

A quimiocina CCL2 foi relacionada com os núcleos celulares inflamatórios, porcentagem de fração de ejeção e a concentração da quimiocina CCL2 obtida do macerado cardíaco do ventrículo esquerdo dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos. Realizado o teste de correlação de *Pearson e Spearman*.

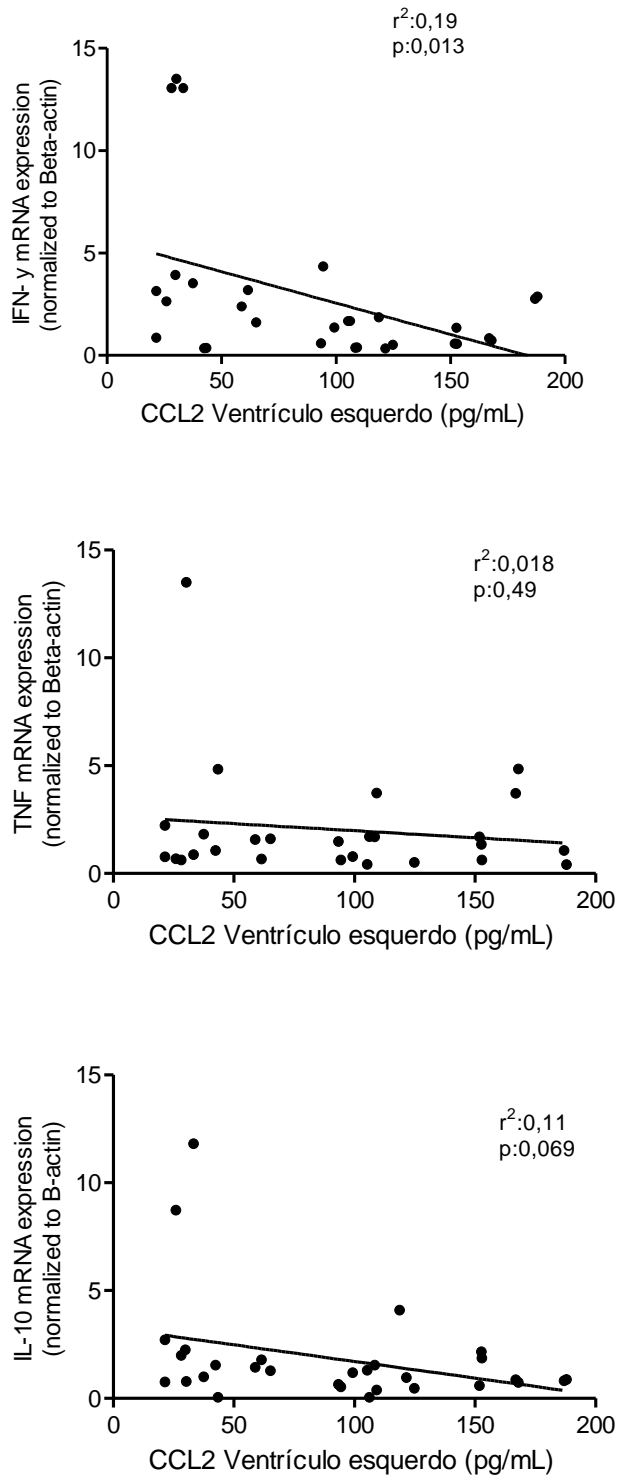


Figura 17: Correlação da quimiocina CCL2 com IFN- γ , TNF e IL-10. A quimiocina CCL2 foi relacionada com IFN- γ , TNF e IL-10 e a concentração da quimiocina CCL2 obtida do macerado cardíaco do ventrículo esquerdo dos animais não infectados e infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* sob diferentes tratamentos farmacológicos. Realizado o teste de correlação de *Pearson e Spearman*.

6. Discussão

A resposta inflamatória induzida pelo *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros mamíferos é mediada por diferentes produtos celulares e por componentes moleculares da matriz extracelular, sendo responsáveis pela ativação e recrutamento celular, pelo aumento do estresse oxidativo e, como causa final, pela destruição e reparo tecidual. Portanto, esta resposta inflamatória atua como um “gatilho” para iniciar as alterações morfo-fisiológicas descritas na fase recente e tardia da infecção afetando, em especial, o coração de mamíferos. Estudos apontam para uma participação ativa do parasito no desenvolvimento da miocardite em pacientes chagásicos crônicos (Cunha-Neto et al, 2009; Talvani et al, 2004; Tarleton, 2001; Caldas et al., 2012). Considerando que a permanência e a relação direta do parasito com seu hospedeiro são importantes fatores para a gênese das lesões cardíacas, torna-se essencial conhecer as características da cepa Be-78 de *T. cruzi*, utilizada no presente estudo.

A cepa Be-78 foi isolada por Lana & Chiari em 1978. O primeiro caso clínico descrito pela literatura por apresentar a forma clínica assintomática da Doença de Chagas foi relatado na paciente Berenice. A cepa Be-78 é considerada sensível à quimioterapia com Bz (Caldas *et al.*, 2008) e pertence à DTU II (Moreno *et al.*, 2010). Ressalta-se que uma cepa pode apresentar comportamento diferenciado, de acordo com o hospedeiro mamífero utilizado no processo de infecção. Estudos prévios demonstraram que a cepa Be-78 apresentava pouca virulência e patogenicidade em camundongos. No entanto, quando o modelo utilizado era o cão, esta cepa mostrou-se mais virulenta e patogênica, em relação a outras como a cepa Be-62 (Lana et al, 1988; Lana et al, 1992). Lana *et al.* (1992) demonstraram que a cepa Be-78, quando inculada em cães, foi capaz de induzir uma cardiopatia crônica fibrosante difusa. Neste estudo, 80% de cães em fase aguda da infecção já demonstraram alterações eletrocardiográficas como arritmias e bloqueio átrio ventricular.

No presente estudo, observamos por intermédio da ecocardiografia uma menor fração de ejeção associada aos cães infectados quando comparado ao grupo de animais não infectados. Esse perfil foi observado à partir do 2º mês de tratamento com a Dox, mantendo esta ejeção reduzida durante todo período de tratamento (Dox e Bz) dos animais.

Santos e colaboradores, 2016, no estudo realizado com cães infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi*, tratados com Bz a 7,0 mg/kg por 60 dias, na fase crônica, mostrou que este tratamento induziu melhora moderada na disfunção sistólica dos animais; entretanto que essa melhora não seria acompanhada pela preservação do crescimento das câmaras cardíacas, refletindo no volume do átrio esquerdo. Outro estudo, também em modelo cão, avaliou a eficácia do tratamento com Bz para prevenir alterações ecocardiográficas induzidas por diferentes cepas do *T. cruzi* - Be-78, suscetível ao tratamento com Bz e as cepas VL - 10 e AAS consideradas resistentes ao tratamento esse fármaco (Caldas, et al; 2013). A terapia com Bz, neste referido estudo, preveniu a fibrose cardíacas nos animais infectados com cepa Be-78 e reduziu a fibrose nos animais infectados com a cepa AAS. No entanto, nos animais infectados com a cepa VL-10 o tratamento específico não alterou a deposição de colágeno apresentando alterações no bloqueio atrioventricular e na sobrecarga da câmara cardíaca aos 120 e 270 dias pós-infecção.

Retomando o destaque para a cepa Be-78 do *T. cruzi*, avaliamos o perfil de quimionas e seus receptores no ventrículo esquerdo dos cães infectados, sendo observado uma redução significativa da expressão de mRNA para as quimiocinas com perfil de resposta Th1 e Th2 e Th17. Animais tratados com Bz, Dox ou mesmo a combinação Dox+Bz apresentaram redução da expressão de mRNA para CCL20, IL-17, CCR6 e CXCR3 (Paula Costa & Lopes, et al; 2016).

Um estudo similar avaliou a expressão de mRNA cardíaco de cães da raça Beagle infectados pelas cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*, nas fases aguda e crônica. Os cães foram avaliados pelo grau de acometimento cardíaco, sendo os animais com forma cardíaca grave apresentadores de CCL5, CCL4 e CXCR3, quimiocinas com o perfil de resposta Th1, quando comparados àqueles com forma indeterminada de doença (Guedes, et al, 2010).

A importância das quimiocinas inflamatórias e/ou regulatórias, para a imunopatogênese da infecção foram extensivamente relatadas em modelos experimentais mas também evidenciadas em pacientes chagásicos nas últimas décadas (Virginia et al, 2017; Talvani et al. 2004a, b). As alterações cardíacas observadas nos indivíduos crônicos, pode estar associada a interação entre IFN-gama e algumas quimiocinas e seus receptores, apresentando correlação de seus parâmetros. (Cunha-Neto et al. 2009).

Nossos dados revelam um efeito imuno-modulador com o uso do Bz, em primeira instância e secundariamente com a Dox durante a fase crônica da infecção em modelo cão. Esta relação entre a interação farmacológica e a expressão de quimiocinas e seus receptores pode estar associada a uma baixa destruição celular e a preservação da arquitetura cardíaca. As MMPs, contribuem para a degradação e remodelação do colágeno da MEC, as MMPs também desempenham papéis-chave na ativação de fatores de crescimento, de quimiocinas e de citocinas produzidas por muitos tipos de células, incluindo linfócitos, granulócitos e, em particular, macrófagos ativados. Sua síntese e secreção parecem ser importantes em vários processos fisiológicos, incluindo o processo inflamatório (Gutierrez et al; 2008)

A atividade das MMP-2 e MMP-9 na miocardite induzida pela infecção do *T. cruzi* em camundongos C57BL/6 apresentou elevação aos 14 dias após a infecção. Os camundongos foram tratados com doxiciclina para inibição de MMP e os resultados refletiram numa inflamação cardíaca reduzida, num atraso do pico de parasitemia e numa melhoria nas taxas de sobrevivência dos animais (Gutierrez et al; 2008). Outro estudo analisou a participação de MMPs no remodelamento da MEC durante a infecção *ex vivo* por *T. cruzi*, mostrando que a infecção induzia a expressão e a atividade de MMP-2 e MMP-9 em vilosidades coriônicas. A inibição das MMPs previniu o dano tecidual induzido pelo *T. cruzi* e diminuiu, parcialmente, a infecção *ex vivo* das vilosidades coriônicas (Castilho et al, 2012).

Pacientes de um estudo de coorte prospectivo, foram agrupados em pacientes que apresentavam a forma crônica indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e os níveis de MMP-2 e MMP-9 da matriz sérica e de IL-1 β e TNF avaliados (Fares et al, 2013). Demonstrou-se o envolvimento diferencial de MMP-2 e MMP-9 na patogênese da doença de Chagas. A MMP-9 mostrou-se envolvida na intensificação do remodelamento cardíaco e favorecimento do desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas enquanto o aumento nos níveis de MMP-2 associou-se a um remodelamento cardíaco menos intenso e/ou forma crônica assintomática. Recentemente, Medeiros e Colaboradores, 2017, avaliaram, nesse mesmo grupo de pacientes, a expressão de MMP-2, MMP-9, IL-1 β , TNF, TGF- β e IL-10 por neutrófilos e monócitos, antes e após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (Cepa Y). Os resultados mostraram que os antígenos derivados do *T. cruzi* promovem uma expressão diferencial de MMP-2 e MMP-9 em pacientes

chagásicos podendo regular a expressão de MMPs em neutrófilos e monócitos, principalmente na ausência de alteração cardíaca.

7. Conclusão

O tratamento crônico com a dose subantimicrobial da Dox, embora se apresente promissor por reduzir a expressão de quimiocinas e modulação de mediadores inflamatórios no tecido cardíaco no presente modelo experimental, utilizando cães sem raça definida e infectados pela cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, não repercutiu melhoria funcional cardíaca expressiva nos parâmetros avaliados neste estudo, tanto após monoterapia quanto em terapia de combinação com o Bz.

8.0 Referências Bibliográficas

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3a Ed., Garland publishing. Inc, NY.

Andrade, L.O. e Andrews, N.W. 2000. The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews*, v.3(10), p. 819-823.

Andrade, S.G.; Magalhães, J.B. e Pontes, A.L. 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi of different types. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, p. 721-726.

Andrade, S.G.; Rassi, A.; Magalhães, J.B.; Filho, F.F. e Luquetti, A.O. 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 86, p. 624-626.

Bahia, M. T.; Tafuri, W. L.; Caliari, M. V.; Veloso, V. M.; Carneiro, C. M.; Coelho, G. L.; Lana, M. Comparison of Trypanosoma cruzi infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, p.339-345, 2002.

Bautista-López NL, Morillo CA, López-Jaramillo P, Quiroz R, Luengas C, Silva SY, Galipeau J, Lala MM, Schulz R. Matrix metalloproteinases 2 and 9 as diagnostic markers in the progression to Chagas cardiomyopathy. 2013 *Am Heart J*. 165:558-566.

Benck L, Kransdorf E, Patel J. Diagnosis and Management of Chagas Cardiomyopathy in the United States. 2018. *Curr Cardiol Rep*. Oct 11;20(12):131.

Berenice-78 strains of Trypanosoma cruzi: comparison of their susceptibility to benznidazole. 1995. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 201.

Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. 2007. *J Dec*;213(3):56573.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. 1987. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4: 389-396.

Brener, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 27, p 347- 382, 1973.

Brener, Z. e Gazzinelli, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. 1997. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v. 114, p. 103-110.

Brener, z.; Chiari, e. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. 1973. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* v.5, p.220–244, *Cardiovasc Drug Discov.* 5:196-207.

Caldas IS, da Matta Guedes PM, dos Santos FM, de Figueiredo Diniz L, Martins TA, da Silva do Nascimento AF, Azevedo MA, de Lima WG, Neto RM, Torres RM, Talvani A, Bahia MT. 2013. Myocardial scars correlate with electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop Med Int Health.* Jan;18(1):75-84.

Caldas, I. S.; Talvani, A.; Caldas, S.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Guedes, P.M. e Bahia, M.T. (2009). Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol. Res.*, v. 103, p. 413-421.

Castillo C, López-Muñoz R, Duaso J, Galanti N, Jaña F, Ferreira J, Cabrera G, Maya. JD, Kemmerling U. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. 2012. *Placenta.* 33:991-997.

Castillo C, López-Muñoz R, Duaso J, Galanti N, Jaña F, Ferreira J, Cabrera G, Maya JD, Kemmerling U. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. 2012. *Placenta.* Dec;33(12):991-7. Chagas heart disease: *Circulation.* 115: 1109-1123, 2007.

Castro MM, Kandasamy AD, Youssef N, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases.. 2011. *Pharmacol Res.* 64:551-560.

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, Silva JS, Canizzaro H, Gazzinelli RT, Teixeira MM. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. 2002 *J Leukoc Biol.* May;71(5):837-44.

Cohn J.N., Ferrari R., Sharpe N. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. 2014. *J Am Coll. Cardiol*, v. 35, p. 569-82.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. 2007. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102(1):113-122.

Coura, J.R. e de Castro, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. 2010. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 97, p. 3–24.

Cruz R.E, Macedo AM, Barnabé C, Freitas JM, Chiari E, Veloso VM, Carneiro CM, Bahia MT, Tafuri WL E Lana M (2006). Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains (Be-62 and Be- 78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). Acta Trop. 97:239-246.

Cunha-Neto, E., Nogueira, L.G., Teixeira, P.C., Ramasawmy, R., Drigo, S.A., Goldeberg, A.C., Fonseca, S.G., Bilate, A.M., Kalil, J. Immunological and nonimmunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. 2009. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 252-258.

Deepak A. Rao. T Cells That Help B Cells in Chronically Inflamed Tissues. 2018. Division of Rheumatology, Immunology, Allergy, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical

Deschamps A.M, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heartfailure: bioactive molecules and transcriptional regulation. Cardiovas Res. 69: 666-676, 2006.

Diniz L.F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, Talvani A, Urbina JA, Bahia MT. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. 2010. Antimicrob Agents Chemother. Jul;54(7):2979-86.

dos Santos, V.P.; Roffe, E.; Santiago, H.C.; Torres, R.A.; Marino, A.P.; Paiva, C.N.; Silva, A.A.; Gazzinelli, R.T. e Lannes-Vieira, J. 2001. Prevalence of CD8 β T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN-g-inducible adhesion and chemoattractant molecules. Microbes Infect., v.3, p. 971-984.

Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Induction of cellular proliferation in a human astrocytoma cell line by a *Trypanosoma cruzi*-derived antigen: a mechanism of pathogenesis?. 2017. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). Jan 30;63(1):23-27

Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. 2008. *Curr Opin Infect Dis.* Jun;21(3):287-92.

Egui A, Lasso P, Perez-Antón E, Thomas MC, Lopez MC. Dynamics of T cells repertoire during *Trypanosoma cruzi* infection and its post-treatment modulation. 2018. *Curr Med Chem.* Nov 1. doi: 10.2174/0929867325.

Fares RC, Gomes Jde A, Garzoni LR, Waghbi MC, Saraiva RM, Medeiros NI, Oliveira-Prado R, Sangenis LH, Chambela Mda C, de Araújo FF, Teixeira-Carvalho A, Damásio MP, Valente VA, Ferreira KS, Sousa GR, Rocha MO, Correa-Oliveira R. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. 2013. *Infect Immun.* 81:3600-3608,

Figueiredo VP, Junior ESL, Lopes LR, Simões NF, Penitente AR, Bearzoti E, Vieira PMA, Schulz R, Talvani A. High fat diet modulates inflammatory parameters in the heart and liver during acute *Trypanosoma cruzi* infection. 2018. *Int Immunopharmacol.* Nov; 64:192-200.

Filippatos G., Parissis J.T., Adamopoulos S., Kardaras F. 2003 . Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications. *Curr Mol Med*, v. 3(2), p. 139-47.

Florentino PTV, Real F, Orikaza CM, da Cunha JPC, Vitorino FNL, Cordero EM, Sobreira TJP, Mortara RA. A Carbohydrate Moiety of Secreted Stage-Specific Glycoprotein 4 Participates in Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Extracellular Amastigotes. 2018 *Front Microbiol.* Apr 10; 9:693.

Frangogiannis N.G. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res.* 2004. v. 53(11), p. 585-95.

Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 2010. Oct;26(10):499-505. doi: 10.1016/j.pt.2010.07.003.

Gazzinelli, R.T.; Oswald, I.P.; Hieny, S.; James, S.L. e Sher, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. 2004 *European Journal of Immunology*, v. 22, p. 2501-2506.

Geurts N, Opdenakker G, Van den Steen PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. 2012. *Pharmacol Ther.* Mar;133(3):257-79.

Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic Family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. 2010. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C539-548.

Guedes P. M. M., Veloso V. M., A. Talvani et al., "Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 138, no. 1-2, pp. 106–

Guedes, P. M.; Veloso, V.M.; Afonso, L.C.C.; Caliari, M.V.; Carneiro, C.M.; Diniz, L.F.; Marques-da-Silva, E.A.; Caldas, I.S.; Do Valle Matta, M.A.; Souza, S.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Galvão, L.M. e Bahia, M.T. 2009. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 130, p. 43-52.

Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Galvão, L.M.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Soares, K.A e Bahia, M.T. 2002. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.*, v.84(1), p. 9-17.

Gutierrez FR, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, Santos JE, Torres-Dueñas D, Cunha FQ, Schulz R, Silva JS. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. 2008. *J Infect Dis.* May 15;197(10):1468-76.

Hu J, Steen PEV, Sang QXA, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. 2007. *Nature Rev Drug Discovery.* 6: 481-498.

Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. 1997. *J Immunol.* Apr 1;158(7):3311-6.

Kielty CM, Wess TJ, Haston L, Ashworth JL, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. 2002. *Motil.*23(5-6):581-96.

Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NAJ. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption. 2005. *Biol Chem.* Jan 13;281(2):1274-85.

LactMed - Drugs and Lactation Database. 2006. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US);

Lana, M.; Chiari, C.A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 3, p. 247-253.

Lana, M.; Chiari, E. e Tafuri, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. 1992. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87 (1), p. 59-71.

Lana, M.; Tafuri, W.L.; Caliari, M.V.; Bambirra, E.A.; Chiari, C.A.; Rios Leite, V.H.; Barbosa, A.J.A.; Toledo, M.J.O.; Chiari, E. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão. 1988. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, p.113-121,

Laranja F.S.(1980). Aspectos clinicos da molestia de Chagas. *Rev Bras Med*, v. 107, p. 482-4

Ledoux T, Aridgides D, Salvador R, Ngwenyama N, Panagiotidou S, Alcaide P, Blanton R, Perrin MA. *Trypanosoma cruzi* Neurotrophic Factor Facilitates Cardiac Repair in a Mouse Model of Chronic Chagas Disease. 2018. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct 22. pii: jpet.118.251900.

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. 2000. *Cardiovascular Research.* 46: 214-224.

Lumb G, Shacklett rs, Dawkins WA. The cardiac conduction tissue and its blood supply in the dog. 1959 *Am J Pathol.* May-Jun;35(3):467-87.

Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, Silva JS. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. 2000. *Microbes Infect.* Nov-Dec;10(14-15):1558-66.

- Marin-Neto JA, Romano MMD, Moreira HT, Schmidt A, Maciel BC. Imaging Diagnosis of Right Ventricle Involvement in Chagas Cardiomyopathy. 2017. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:3820191.
- Medeiros NI, Gomes JAS, Correa-Oliveira R. Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy. 2017. *Parasite Immunol.* Aug;39(8).
- Mirowski M, Lau SH, Bobb GA, Steiner C, Damato AN. Studies on left atrial automaticity in dogs. 1970. *Circ Res.* Mar;26(3):317-25.
- Mittal B, Mishra A, Srivastava A, Kumar S, Garg N. Matrix metallo proteinases in coronary artery disease. *Adv Clin Chem.* 64:1-72, 2014.
- Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bocchi EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. 2005. *Eur J Heart Fail.* Aug;7(5):869-73.
- Moreno M., D'Avila D.A., Silva M.N., Galvao 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. 2010. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 918-924.
- Paiva, C.N., Figueiredo, R.T., Kroll-Palhares, K., Silva, A.A., Silve´rio, J.C., Gibaldi, D., et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute Trypanosoma cruzi infection. 2009. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1239–1246.
- Paula Costa G, Lopes LR, da Silva MC, Horta AL, Pontes WM, Milanezi CM, Guedes PM, de Lima WG, Schulz R, da Silva JS, Talvani A. Doxycycline and Benznidazole Reduce the Profile of Th1, Th2, and Th17 Chemokines and Chemokine Receptors in Cardiac Tissue from Chronic Trypanosoma cruzi-Infected Dogs. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3694714.
- Peretolchina T, Pavan MG, Corrêa-Antônio J, Gurgel-Gonçalves R, Lima MM, Monteiro FA. Phylogeography and demographic history of the Chagas disease vector *Rhodnius nasutus* (Hemiptera: Reduviidae) in the Brazilian Caatinga biome. 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* Sep 24;12(9):e0006731.

- Peretolchina T, Pavan MG, Corrêa-Antônio J, Gurgel-Gonçalves R, Lima MM5, Monteiro FA. Phylogeography and demographic history of the Chagas disease vector *Rhodnius nasutus* (Hemiptera: Reduviidae) in the Brazilian Caatinga biome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Sep 24;12(9):e0006731.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.*, 1994. v. 1(2), p. 92-100.
- Rocha M.O.; Teixeira M.M.; Ribeiro A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. 2007. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 5,727-743.
- Robert C, Ferreira LR, Campos MA, Procópio DO, Travassos LR, Ferguson MA, Reis L.F, Teixeira MM, Almeida IC, Gazzinelli RT. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. 2002. *Microbes Infect*. Jul;4(9):1015-25.
- Rossini R, Senni M, Musumeci G, Ferrazzi P, Gavazzi A. Prevention of left ventricular remodelling after acute myocardial infarction: an update. 2010. *Recent Pat*. 1987-95.
- Santos FM, Lima WG, Gravel AS, Martins TA, Talvani A, Torres RM, Bahia MT. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. 2012. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Aug;67(8):1987-95.
- Silveira A.C . Current situation with chagas disease vector control in the Americas. 2000. *Cad Saude Publica*. 2000;16 Suppl 2:35-42.
- Sosa Estani, S. e Segura, E.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1998. v. 94 (1), p. 363-365.
- Souza, W. *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int. J Cell Biol*. 295394, 2014.
- Spinale F.G, Sapp AA. Cardiovascular Risk and Matrix Metalloproteinase Polymorphisms: Not Just a Simple Substitution. 2017. *Circ Cardiovasc Genet*. Dec;10(6):e001958.
- Stoppani A.O. The chemotherapy of Chagas disease. 1999. *Medicina (B Aires)*. 1999;59 Suppl 2:147-65.

Krakauer T and M. Buckley, "Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 11, pp. 3630–3633, 2003.

Tafuri, W.L.; Lana, M.; Chiari, E.; Caliari, M.V.; Bambirra, E.A.; Rios-leite, V.H.; Barbosa, A.J.A. O cão como modelo experimental para o estudo da História Natural da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, p.77-82, 1988.

Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol.* 1992 Feb 15;148(4):1143-8.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, et.al. 2000. Kinetic of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy – tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection.* 2: 851- 866.

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

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

Talvani A, Teixeira MM. 2006. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol.* 76: 171-194.

Tanowitz, H.B.; Machado, F.S.; Jelicks, L.A.; Shirani, J.; de Carvalho, A.C.C.; Spray, D.C.; Factor, S.M.; Kirchhoff, L.V. e Weiss, L.M. (2009). Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas Disease). *Progress in Cardiovascular Diseases*, v.51 (6), p.524-539.

Tarleton, R.L. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*, v.31, p.550-554, 2001.

Toledo, M.J.O.; Gasperi, M.V.; Marques de Araújo, S. e Lana, M. (1995). Berenice-62 and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benzidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 201.

Turner DC, Flier LA, Carbonetto S. Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J Neurosci.* 1989; 9:3287-3296.

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 115:55-68, 2010.

Virginia Balouz, Fernán Agüero, and Carlos A. Buscaglia. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. 2016. *Adv Parasitol.* 2017; 97: 1–45.

WHO - Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Updated. March 2017.

Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. 2010. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11;411(21-22):1570-9. WHO. Chagas disease American trypanosomiasis. Fact sheet N°340. 2017.

Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z. Dendritic celltransmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix m

Anexo I



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2013/60, intitulado "*Avaliação terapêutica de tetraciclinas no remodelamento cardíaco em cães infectados pelo Trypanosoma cruzi*", que tem como responsável o Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 20/02/2015.

Ouro Preto, 12 de fevereiro de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP

Anexo II

Cão 22

Preto, sobrelha e bochecha marrom, peito e patas brancas (Macho)



(foto com 4 meses de idade)

Grupo 4 – Infectado tratado com Doxiciclina + Benznidazol (Infecção 03/01/2014)

Medidas:

Tempo	Medida
4 meses	82 cm
6 meses	92 cm
8 meses	100 cm
12 meses	100 cm
15 meses	100 cm
18 meses	106 cm

Peso

Tempo	Peso
4 meses	11,6 kg
6 meses	14,4 kg
8 meses	20,6 kg
12 meses	23,0 kg
15 meses	25,0 kg
18 meses	27,0 kg

Coleta de sangue (plasma)

Tempo	Etiqueta da amostra
4 meses	38
6 meses	67
8 meses	95
12 meses	124
15 meses	153
18 meses	181