



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Dissertação de Mestrado

**Resposta parasitológicas e inflamatória de diferentes doses da
Nitazoxanida na infecção aguda em camundongos C57BL/6 infectados
pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi***

Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa

Ouro Preto

2019

TAMILES CAROLINE FERNANDES PEDROSA

**Resposta parasitológicas e inflamatória de diferentes doses da
Nitazoxanida na infecção aguda em camundongos C57BL/6 infectados
pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. André Talvani

Co-orientador: Dr. Guilherme de Paula Costa

Ouro Preto

P372r Pedrosa , Tamiles Caroline Fernandes .
Resposta parasitológicas e inflamatória de diferentes doses da Nitazoxanida na infecção aguda em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa . - 2019.
44f.: il.: color; graf.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Costa de Paula.

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

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Anti-helmínticos. 3. Inflamação. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Paula, Guilherme Costa de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



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



Aos 01 dias do mês de março do ano de 2019, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Tâmilis Caroline Fernandes Pedrosa, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Andre Talvani Pedrosa da Silva (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Mauro Cesar Isoldi (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. 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 dissertação, concedeu à mestranda Tâmilis Caroline Fernandes Pedrosa 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Respostas Parasitológica e Inflamatória de Diferentes Doses do Nitazoxanida Na Infecção Aguda em Camundongos C57bl/6 Infectados Pela Cepa Y do Trypanosoma Cruzi", 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 dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti; segundo, Prof. Mauro Cesar Isoldi; terceiro, Prof. Andre Talvani Pedrosa da Silva. 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 mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação 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 mestranda. Ouro Preto, 01 de março de 2019.

Presidente: _____

Membro: _____

Membro: _____

Mestrando: _____

* Professor Rodolfo Giunchetti (videscorfinancia)

DEDICATÓRIA

Á Deus que me deu força nesta caminhada, a minha mãe Nilda e minha irmã Taci por todo apoio e amor. “Tudo posso naquele que me fortalece” Filipenses 4-13.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus que sempre esteve à frente de tudo. Agradeço imensamente minha mãe Nilda que fez dos meus sonhos os seus e não mediu esforços para realiza-los. Tudo que sou é graças a senhora, que sempre batalhou para que pudéssemos ter tudo que almejamos. Agradeço a minha irmã Taciane, que sempre foi minha amiga, minha companheira de todas as horas e que apesar das brigas nunca me deixou na mão. E agradeço ao meu filho canino Niklaus (Nik) pela companhia inseparável. Vocês são minha base, amo vocês!

Agradeço toda minha família que sempre me apoiou, em especial ao tio Hélio e tio Dico que estará sempre em meu coração.

Agradeço ao meu orientador André Talvani por ter me proporcionado esses anos de ensinamentos, carinho e amizade. Ao meu co-orientador Guilherme por tudo e a todos os membros dessa grande família chamada LABIIN por toda pesquisa, carinho e troca de conhecimento. Em especial, Ana Luísa, Dani e Suelen por todo apoio psicológico e nos experimentos.

Agradeço as minhas amigas Dani, Miris, Tay, Thays que comigo sofreram, riram, choraram, reclamaram e comemoraram em uma mesa de bar, vocês são incríveis e levarei para o resto de minha vida. Aos meus amigos mais loucos e amáveis Stella, Silence e Maud minha vida não teria graça sem vocês. Ao Lucas por todo companheirismo, carinho e paciência. A minha amiga Any por todos os anos de amizade, amor e compreensão, a Ari, Jean e Claudio que mesmo longe sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço a rep. Hangar minha segunda casa e família por tornarem a caminhada mais leve. Eu amo cada uma de vocês. Agradeço a todos da rep. Virakopos e rep. Forasteiras por todos os rocks, amizade e conversas. Vocês são maravilhosos.

Obrigado a todos!

RESUMO

Descoberta há mais de 100 anos, a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ainda demanda de uma estratégia terapêutica eficaz. O fármaco Benznidazol atua sobre o controle parasitário e regulação da resposta imune em fase aguda, mas apresenta resultados insatisfatórios em fase crônica com alta toxicidade e efeitos diversos, o que acarreta no abandono terapêutico. Por essa razão, novas estratégias farmacológicas têm sido propostas visando a eliminação dos parasitos e a regulação da resposta inflamatória, elementos chaves para a patogênese cardíaca associada a este protozoário. Dentre as novas estratégias, destaca-se o fármaco Nitazoxanida (NTZ) com atividade anti-viral, anti-helmíntica e anti-protozoário. Neste estudo, diferentes doses de NTZ (100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 mg / kg) foram administradas, via gavagem, durante 10 dias (12 em 12 horas) em camundongos C57BL/6 (n=9) infectados com 4.000 formas tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Y), além dos grupos: infectados não tratados e não infectados não tratados. A parasitemia foi realizada diariamente e, após a eutanásia (11º dia de infecção), amostras de macerado cardíaco e de plasma foram destinadas a análise de mediadores inflamatórios (TNF, IL-10, IL-17 e CCL2) e bioquímica (TGO e TGP). Foi observado aumento no pico de parasitemia em todos os animais infectados e tratados com NTZ. Não houve alteração na massa cardíaca após o tratamento com NTZ, porém observou-se 40% de mortalidade nos animais tratados com a dose de 1.200 mg/kg deste fármaco. A produção de TNF, CCL2 e IL-10 reduziu nos grupos tratados com NTZ em relação ao grupo não infectado e sem tratamento. Relativo à produção de IL-17, houve redução nos animais tratados com NTZ em relação ao grupo infectado, porém não tratado. Não houve alteração de TGP associada à infecção e ao tratamento, porém detectou-se níveis elevados de TGO com as doses de 800, 1000 e 1200 mg/kg de NTZ. Concluímos que doses menores de NTZ apresentaram regulação parcial dos mediadores inflamatórios (TNF, IL-10, IL-17 e CCL2) na fase aguda em camundongos infectados pelo *T. cruzi* com aumento no número de parasitos circulantes.

Palavra-chave: *Trypanosoma cruzi* – nitazoxanida – inflamação - coração.

ABSTRACT

After more than 100 years of its discovery, until today, the *Trypanosoma cruzi* infection still demands an effective therapeutic strategy. The therapy with the Benznidazole shows effectiveness on *T. cruzi* control in the acute phase, however, it displays unsatisfactory results in chronic phase exhibiting high toxicity which leads to the therapy abandonment. New pharmacological approaches have been proposed aiming parasite eradication and, in parallel, the regulation of the inflammatory response since it is a key element of the cardiac pathogenesis related to this protozoan. Here, we highlight the anti-helminthic Nitazoxanide (NTZ) in a different dose (100, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 mg / kg) administered by gavage for 10 days (12 to 12 hours) in C57BL/6 mice (n = 9) infected with 4,000 trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain). The parasitemia was performed daily and after euthanasia (11th day post infection), the plasma and heart homogenate were used for the liver enzymes TGO and TGP assays and for ELISA (TNF, IL-10, IL-17 and CCL2). An increase circulating parasites were observed in all infected NTZ-treated animals, but no changes were observed with the relative heart mass. However, 40% mortality was observed in the animals receiving 1200 mg/kg dose of this drug. The production of inflammatory mediators (TNF, CCL2 and IL-10) reduced in the NTZ-treated-groups, when compared to the uninfected/untreated animals. Regarding the production of IL-17, its reduction was observed with the NTZ-treated animals in comparison to the infected control. No change was observed with the TGP associated with the infection and treatments, but higher TGO levels were detected at the doses of 800, 1000 and 1200 mg/kg of NTZ. We conclude that the lower doses of NTZ showed partial regulation of the inflammatory mediators (TNF, IL-10, IL-17 and CCL2) in the acute phase of *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice with an increase in the number of circulating parasites.

Keyword (s): *Trypanosoma cruzi* - nitazoxanide - inflammation - heart.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BZ- Benznidazol

DTU – *Discrete Typing Units*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

g – grama

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

Kg – Quilograma

NTZ – Nitazoxanida

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

TNF – Fator de Necrose Tumoral

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μm - micrômetro

SUMÁRIO

1.0. Introdução	5
1.1. <i>O Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2. Processo inflamatório na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	6
1.3. Estratégias terapêuticas <i>anti-T. cruzi</i>	8
1.4. Nitazoxanida.....	9
2.0. Objetivo Geral	12
2.1. Objetivo específico.....	12
3.0. Materiais e Métodos	12
3.1. Animais.....	12
3.2. Tratamento e eutanásia dos animais.....	13
3.3. Ensaio imunoenzimático.....	14
3.4. Ensaio Bioquímico.....	16
3.4.1 Transaminase oxalacética	16
3.4.2 Transaminase pirúvica.....	17
3.5. Histologia.....	17
3.5.1. Análise histopatológica.....	17
3.5.2. Técnica de coloração Hematoxilina & Eosina (HE).....	18
3.5.3. Avaliação histopatológica.....	18
3.6 Análise estatística.....	19
4.0. Resultados	19
5.0. Discussão	26
6.0. Conclusão	30
7.0. Referências	31
8.0. Anexo	40

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário unicelular que se multiplica por divisão binária e é caracterizado pela presença de um único flagelo e pelo cinetoplasto (Chagas, 1909; Dias *et al.*, 1945). Esse parasito possui um ciclo heteroxênico que passa por multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no inseto vetor, além de uma evidente variação polimórfica, como processo adaptativo, para sobrevivência nos diferentes hospedeiros (Alvarez *et al.* 2008; Garcia & Azambuja 1996; Gonzalez *et al.*, 1988).

A transmissão mais comum deste parasito ocorre por meio de insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiro, que são triatomíneos pertencentes à ordem *Hemiptera* (Ferreira, 2014). No entanto o *T. cruzi* também pode ser transmitido por mecanismos não vetoriais como transplante de órgãos, via congênita, transfusão de sangue e ainda via oral (Brener & Gazzinelli, 1997; Coura, 2009, Coura & Dias, 2009, Bern *et al.*, 2011; Steverding, 2014).

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* são facilmente encontradas no sangue dos pacientes e as manifestações clínicas se iniciam seis a dez dias após a infecção (Chagas, 1909; Barrett *et al.*, 2003; Steverding, 2014). Dentre elas destacam-se febre, mal-estar e linfadenopatia e outros sintomas clínicos inespecíficos (Andrade *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015) Além disso, após a penetração do parasito, os pacientes podem apresentar um intenso infiltrado mononuclear : edema periorbital unilateral (sinal de Romana) e o chagoma de inoculação. (Romana *et al.*, 1935; Teixeira *et al.*, 2012). Em crianças, a

miocardite aguda e meningoencefalite aguda são manifestações clínicas eventualmente observadas, no qual na maioria dos casos, são fatais (Murcia *et al.*, 2013; Steverding, 2014).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, há maior replicação do parasito e por isso a resposta inflamatória torna-se mais evidente na tentativa do controle inflamatório, no entanto não previne a progressão para a fase crônica. A fase crônica pode ser denominada (i) indeterminada/assintomática, na qual a maioria dos indivíduos apresentam anticorpos anti-*T. cruzi* no soro, porém são assintomáticos com eletro- e ecocardiograma, raio-X de tórax e exames de contraste (esôfago e colón) normais; ou (ii) sintomática onde há presença de acometimentos cardíacos e digestivos de diferentes graus. (Coura e De Castro, 2002; Montgomery *et al.*, 2014; Dias, 1989; Rassi Jr *et al.*, 2010). A forma clínica cardíaca é considerada a mais grave, com a manifestação de insuficiência cardíaca congestiva, dilatação das câmaras cardíacas, bloqueios de ramo direito e/ou esquerdo e, em decorrência de alterações concomitantes no sistema nervoso autônomo, há ainda o relato de morte súbita nesta parcela de indivíduos chagásicos (Prata, 2001; Rassi *et al.* 2010).

Sabendo-se disso, a resposta inflamatória, decorrente da infecção pelo *T. cruzi*, torna-se elemento fundamental de proteção do hospedeiro, porém atuando também na patogênese associada a esta infecção (Teixeira *et al.*, 2002). Não se pode desconsiderar, ainda, a participação da variabilidade genética do hospedeiro e do parasito no processo de desenvolvimento e no desfecho da doença (De Andrade *et al.*, 1996; Bermudez *et al.*, 2016).

1.2. Processo inflamatório na infecção pelo T. cruzi

A presença do *T. cruzi* no organismo de mamíferos induz uma interação complexa entre suas moléculas e as células de defesa do hospedeiro. Neste hospedeiro, parte das

vias de sinalização desencadeadas pelo parasito podem culminar em uma resposta inflamatória responsável pela patogênese (Yoshida, 2006).

O processo inflamatório iniciado dessa interação é dependente de algumas proteínas de superfície como as GPs-mucinas que atuam na ativação de receptores do tipo Toll ou receptores do tipo NOD resultando na produção de mediadores inflamatórios como TNF, IFN-gama, IL-12 e outros mediadores proteicos e lipídicos essenciais para o controle do parasitismo (Bafica et al. 2006; Cardoso et al. 2016). Além disso, estes mediadores inflamatórios ativam células do sistema fagocitário mononuclear a se diferenciarem e produzirem o óxido nítrico pela via da L-arginina, elemento responsável pelo controle da replicação intracelular deste parasito (Gutierrez et al. 2009; Yoshida, 2006; Pinazo et al., 2015). Ressalta-se, ainda, um outro grupo de mediadores inflamatórios denominado de quimiocina, responsável pelo recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Estas quimiocinas com perfil inflamatório (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, e rCXCL11) ou regulatório (CCL1, CCL17, CCL24, e CCL26) atuam na infecção pelo *T. cruzi* definindo o perfil fenotípico do infiltrado inflamatório e definindo, em alguns modelos experimentais, o prognóstico clínico cardíaco (Paula-Costa et al. 2016, Horta et al. 2018).

De uma forma geral, o processo inflamatório tem como finalidade restaurar a integridade e função de células e tecidos após a infecção pelo *T. cruzi* (Bafica et al., 2006; Gutierrez, 2011; Cardoso *et al.*, 2016).

No entanto, a intensidade deste processo inflamatório mostra-se diretamente relacionado a alguns fatores a via de infecção do parasito, a cepa do agente etiológico, além da particularidade genética de cada hospedeiro vertebrado e, em conjunto, estes fatores parecem definir o curso e a evolução da doença (Magalhães et. al, 2015; Machado, 2013). Dessa forma, estando a carga parasitária relacionada à intensidade da resposta

inflamatória, fármacos que reduzam a parasitemia atuam também na regulação do processo inflamatório sistêmico e/ou local, como vem sendo demonstrado com o Benznidazol (Caldas *et al.*, 2008; Fragata-Filho *et al.* 2016; Salomão *et al.* 2016; Viotti *et al.* 1994).

Porém, terapias aplicadas contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* atualmente, não são totalmente eficazes, havendo sucesso parcial apenas durante a fase aguda e não sendo eficientes contra todas as populações deste parasito (Urbina *et al.* 2003; Salomão *et al.* 2016). Mesmo havendo alguma taxa de cura parasitológica com os fármacos atualmente utilizados, a presença do parasito no organismo sensibiliza o sistema imunológico do hospedeiro, ocasionando respostas inflamatórias exacerbadas e lesões teciduais. Por esta razão, a busca por fármacos que eliminem o parasito ao mesmo tempo que regulem parcialmente a resposta imune do hospedeiro mamífero seria uma almejada estratégia farmacológica para a terapia anti-*T. cruzi*.

1.3. Estratégias terapêuticas anti-*T. cruzi*

O tratamento atual da doença de Chagas é baseado em dois compostos nitro heterocíclicos de amplo espectro, caracterizados por um grupo nitro ligado a um anel aromático, o Nifurtimox (NFX; Lampit®, Bayer) e o Benznidazol (Bz) (Rochagan®, Rodanil®, Roche), ambos eficazes contra uma variedade de agentes bacterianos e parasitários. Porém o mecanismo de ação desses fármacos ainda é pouco conhecido (Wilkinson *et al.*, 2008; Maya *et al.* 2007).

No Brasil, o fármaco de escolha para o tratamento desta doença é o Bz (De Fátima Oliveira *et al.*, 2008; Bermudez *et al.*, 2016). O Bz atua causando estresse redutivo envolvendo reações covalentes de macromoléculas, originados por componentes celulares como lipídeos, proteínas e RNA do *T. cruzi* e nitro-redução de radicais

intermediários (Docampo, 1990; Maya *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2011). Contudo, estes fármacos são parcialmente efetivos e apresentam severos efeitos colaterais adversos acarretando no abandono terapêutico pelos pacientes (Coura & Castro, 2002). Os efeitos mais frequentes para o Bz são as manifestações de hipersensibilidade (dermatite com erupção cutânea, edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares); depressão da medula óssea (incluindo neuropatia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica) e polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (Castro *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2009).

Além disso, o Bz não possui eficácia na fase crônica da doença, demonstrando limitações quanto sua penetração tecidual (Barrett *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008). Frente a este cenário, um grupo de pesquisadores realizou um estudo prospectivo multicêntrico randomizado denominado BENEFIT (Avaliação do Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase), considerado o maior ensaio clínico proposto para avaliar o papel do Bz em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (Morillo *et al.* 2015). Esse estudo concluiu que o medicamento benznidazol não conseguiu interromper o agravamento da doença em indivíduos com problemas cardíacos já estabelecidos (Dias *et al.* 2016; Morillo *et al.* 2015).

Sabendo-se disso, torna-se importante a identificação de novos fármacos ou compostos que atuem de forma isolada ou de concomitância com o Bz minimizando os danos cardíacos no hospedeiro mamífero.

1.4. Nitazoxanida

Descrita pela primeira vez por Jean François Rossignol na década de 80 e tendo seu desenvolvimento reiniciado em 1994, o fármaco Nitazoxanida (NTZ), conhecido

comercialmente por Annita® ou Anilla®, é um antiparasitário de amplo espectro, derivado da nitrotiazolil-salicilamida para administração oral (Gilles & Hoffman, 2002; White Jr., 2003). Este fármaco é considerado seguro e bem tolerado quando administrado na dose recomendada, com efeitos colaterais geralmente leves e transitórios, os quais incluem dor abdominal, diarreia e náusea (Gupta et al. 2017; Navarrete-Vazquez et al. 2011).

A NTZ é um pó cristalino amarelo, pertencente ao grupo biofarmacêutico classe II (alta permeabilidade, baixa solubilidade) (Marcelín-Jiménez et al. 2012). Identificado pela fórmula química 2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida, apresenta a fórmula molecular C₁₂H₉N₃O₅S (peso molecular, 307,3) (Suresh & Nangia, 2016; Marcelín-Jiménez et al. 2012). Esse fármaco é proveniente de uma classe de medicamentos denominados tiazolidas estabelecido pelo laboratório *Romark Research Laboratories* (Tampa, EUA) e é rapidamente absorvido e metabolizado pelo fígado, transformando-se na sua forma ativa, a tizoxanida (**Figura 1**) (Gomes et. al, 2017; Hemphill et al. 2016). Com biodisponibilidade após a administração oral de 70%, apresenta meia-vida plasmática de aproximadamente 1,5 h. A tizoxanida é, então, glucuronizada amplamente no fígado (aumentando sua hidrofiliabilidade, logP = -0,6) e excretada 66% e 31,5% pela bile e urina, respectivamente (Broekhuysen et al, 2000; Gomes et. al, 2017; Gupta et. al 2017).

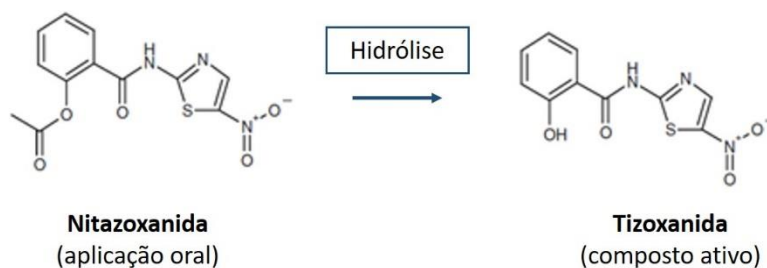


Figura 1. Estrutura química. Estrutura química da Nitazoxanida e Tizoxanida.

A Nitazoxanida tem demonstrado atividade contra *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Vittaforma corneae*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Isohora belli*, *Blastocystis hominis*, *Balantidium coli*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* e *Fasciola hepática* (Fox et. al 2005; Pankuch et. al 2006). Este fato decorre de sua atuação de forma não competitiva na inibição da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), enzima que participa na geração de energia nestes organismos, por meio da descarboxilação oxidativa do piruvato para a acetil coenzima A em parasitas, além de atuar inibindo o complexo mTORC1 na célula hospedeira promovendo a autofagia (Marcelín-Jiménez et. al, 2012; Hoffman et. al, 2018; Gupta et. al, 2017).

Além disso, estudos vêm mostrando que a NTZ possui uma atividade contra a infecção pelo vírus da hepatite C e B (Korba et al. 2008; Keeffe & Rossignol, 2009), contra o norovírus causador de gastroenterite em populações imunossuprimidas (Rossignol, 2014; Bok & Green 2012) e, ainda, exibe propriedades anti-inflamatórias (Hemphill et.al 2006).

Assim, por apresentar um variado espectro de atividade anti-parasitária em kinetoplastídeos e apicomplexas (Chan-Bacab et. al., 2009; Navarrete-Vazquez et. al., 2011) e ação imunoreguladora, a NTZ torna-se um fármaco em potencial para investigação na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

2.0. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento agudo com diferentes doses de Nitazoxanida sob as respostas parasitológicas e inflamatória em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

2.1. Objetivo específicos

- (i) Determinar os índices parasitêmicos em camundongos C57BL/6 infectados e tratados, ou não, com as diferentes doses de NTZ;
- (ii) Avaliar a sobrevivência dos animais em relação à dose de NTZ e à infecção com o *T. cruzi*, bem como mensurar a massa relativa do coração;
- (iii) Quantificar a produção plasmática dos marcadores inflamatórios TNF, IL-10, IL-17 e CCL2;
- (iv) Mensurar os marcadores hepáticos plasmáticos TGO e TGP;
- (v) Quantificar os infiltrados inflamatórios cardíacos.

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados camundongos fêmeas adultas da linhagem C57BL/6 com idade de 6-8 semanas pesando 18-20g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantidos sem restrição de água e ração. Os procedimentos adotados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal pré-estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP, protocolo nº 2018/03.

Para a infecção dos camundongos foram utilizadas 4.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa “Y” do *T. cruzi*, armazenadas em nitrogênio líquido e mantidas *in vivo* por sucessivas passagens em camundongos da linhagem *Swiss* no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP). A coleta dos parasitos sanguíneos ocorreu no pico máximo da parasitemia (7º dia) e o sangue diluído em salina 0,9% para ajuste da concentração desejada, sendo o inóculo calculado segundo Brener (1962) e realizado por via intraperitoneal.

3.2 Tratamento e eutanásia dos animais

Conforme a norma estabelecida pela CEUA, o número de animais necessários para cada grupo experimental, foi estabelecida por meio do cálculo amostral utilizando o programa BIOESTAT 5.0 com nível de confiança de 95% e *p*-valor igual a 0,05, no qual gerou a necessidade de 9 animais por grupo sendo 9 grupos diferentes no estudo.

Os animais experimentais foram divididos em grupos como descrito a seguir: (i) não infectado e não tratado; (ii) infectado e não tratado, (iii) infectado e tratado com 100mg/kg de NTZ, (iv) infectado e tratado com 200mg/kg de NTZ, (v) infectado e tratado com 400mg/kg de NTZ, (vi) infectado e tratado com 600mg/kg de NTZ, (vii) infectado e tratado com 800mg/kg de NTZ, (viii) infectado e tratado com 1000mg/kg de NTZ e (ix) infectado e tratado com 1200mg/kg de NTZ.

Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos por via oral (gavagem) iniciado 12 h após a infecção. As análises parasitológicas foram realizadas diariamente por meio da coleta de 5µl de sangue da artéria coccígea ventral. No 11º dia (fase aguda) após a infecção, ocorreu a coleta de sangue realizada pelo plexo retro-orbital com os animais anestesiados, anteriormente à eutanásia, para obtenção de plasma. Após a

eutanásia houve coleta e armazenamento de tecido muscular cardíaco e tecido hepático para as técnicas imunopatológicas a serem descritas posteriormente.

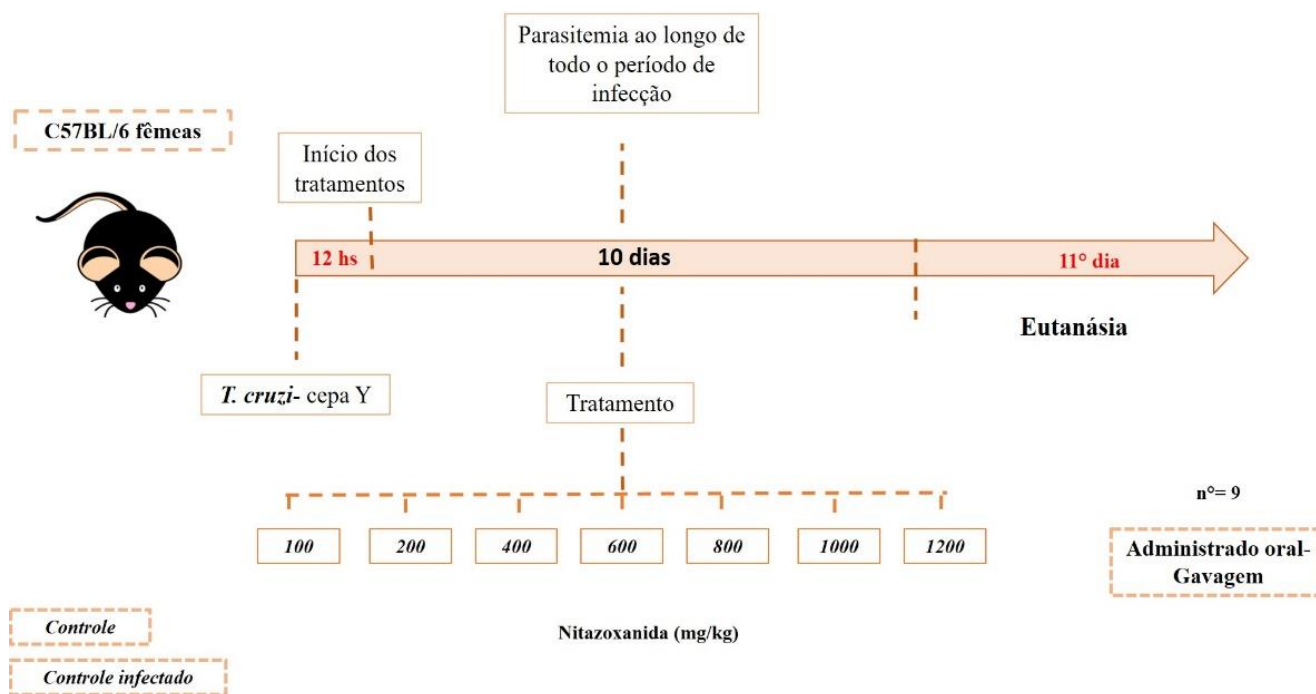


Figura 2-Deliamento experimental. Após 6-8 semanas de vida os camundongos C57BL/6 foram infectados com 4000 formas tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi*. Após 12 horas, iniciou-se o tratamento com as diferentes doses propostas. Os animais foram tratados durante 10 dias e eutanasiados no 11º dia.

3.3. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados para detecção das citocinas plasmáticas (TNF, CCL-2, IL-17 e IL-10), utilizando-se o macerado do coração dos camundongos infectados, ou não, pelo *T. cruzi* e tratados, ou não, com a NTZ. Os ensaios, assim como a preparação das soluções utilizadas, foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante (PeproTech, NJ, EUA).

Para o procedimento foram utilizadas placas de 96 poços e, em cada poço adicionados 100 µl de anticorpo monoclonal contra a proteína (anticorpo de captura), diluídos em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos foram descartados por inversão e através de sucessivas lavagens em PBS-*Tween*. Posteriormente as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante uma hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente. As amostras de plasma foram adicionadas em um volume de 100µl para cada poço. Concomitante, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para a construção da curva padrão e, em seguida as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem dos poços, os anticorpos secundários (anticorpo de detecção) foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente. As amostras do macerado foram adicionadas em um volume de 100µl para cada poço. Concomitante, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para a construção da curva padrão e, em seguida, as placas incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem dos poços, os anticorpos secundários (anticorpo de detecção) foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase em PBS-BSA 0,1% adicionados às placas que permaneceram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi utilizado para a revelação 5mL de cromógeno adicionados a 5mL de água oxigenada. Cem microlitros dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após 20 minutos de incubação na ausência de luz, a reação foi bloqueada a partir da adição de 100 µl de H₂SO₄ 2,5M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada através de um leitor óptico de microplacas utilizando um comprimento de onda de 450 nM, 30 minutos após a adição de H₂SO₄ para bloqueio das reações. A quantificação das

quimiocina e citocinas foi realizada a partir da densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas dos peptídeos, analisadas pelo software SOFTmax PRO 4.0.

3.4. Exames bioquímicos

Para se avaliar marcadores de dano tecidual hepático, foram realizados testes bioquímicos para se dosar proteínas no plasma dos animais. Todos os exames foram executados com kits comerciais da Bioclin/Quibasa (Minas Gerais, Brasil) e os procedimentos foram seguidos rigorosamente com sugerido pelo fabricante.

3.4.1 Transaminase oxalacética

Para a dosagem da enzima transaminase oxalacética (TGO) foi utilizado o método colorimétrico de Reitman e Frankel (1957) (Reitman e Frankel, 1957) que se baseia na transferência, catalisada pela TGO, do grupamento amino de um alfa-aminoácido para um alfa-cetoácido segundo a reação a seguir:



Junto à reação é adicionado um reagente de cor (dinitrofenilhidrazina) que reage com o oxaloacetato formando a hidrazina. A intensidade de cor é diretamente proporcional à produção de oxaloacetato, que por sua vez, representa a atividade enzimática.

Para este método são necessárias 3 soluções: A primeira possui PBS, ácido L-maspártico, ácido alfa cetoglutárico e azida sódica. A segunda, o reagente de cor que

contém dinitrofenilhidrazina e ácido clorídrico. Por fim a terceira uma solução de hidróxido de sódio.

Para realização do método 250µl da primeira solução foi incubada a 37°C por 3 minutos, em seguida será adicionada 100µl da amostra de plasma e incubado por mais 30 minutos também a 37°C. Adiciona-se então 250µl da segunda solução e o sistema foi deixado em repouso por 20 minutos. Por fim foi adicionado 2,5ml do hidróxido de sódio. Após 5 minutos a 37°C o conteúdo foi transferido para cubeta de quartzo e lida em espectrofotômetro com comprimento de onda 505nm.

O cálculo final é conseguido a partir dos valores de diluição de uma curva padrão pré-determinada pelo kit.

3.4.2 Transaminase pirúvica

O método para se dosar a enzima transaminase pirúvica (TGP) é muito semelhante ao descrito para a TGO, também foi utilizando do método colorimétrico de Reitman e Frankel (1957) (Reitman e Frankel, 1957), no entanto, a reação em que se baseia o método e as soluções para execução possuem a alteração do L-aspartato pela L-alanina e do oxaloacetado pelo piruvato.



O restante do método permanece inalterado em relação ao descrito para TGO.

3.5. Histologia

3.5.1 Análises histopatológicas

Fragmentos do coração foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes

com espessura de 4µm. As lâminas dos blocos parafinizados dos órgãos coletados foram confeccionadas para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise do processo inflamatório em microscópio óptico.

3.5.2 Técnica de coloração Hematoxilina & Eosina

O processo inflamatório no tecido cardíaco foi analisado quantitativamente e qualitativamente, realizada por coloração de Hematoxilina & Eosina (HE). Para a desparafinização, cortes com 4µm de espessuras passaram por dois banhos de xilol (15 minutos em cada), hidratados em solução alcoólicas de concentração decrescente de álcool – 100%, 90%, 80% e 70% (10 minutos em cada), posteriormente lavados em água corrente (10 minutos) e PBS pH 7,2 (5 minutos). Logo depois, os cortes foram corados pela hematoxilina (10 minutos), lavados com água corrente e diferenciados em álcool acidulado e, em seguida, lavados novamente com água corrente. Depois foram corados pela eosina (1 minuto). Logo após o último processo em água, as lâminas foram acondicionadas em estufa a 56° C para secagem e submetidas a um banho de xilol (30 minutos). Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e Entelan® (Merck, Alemanha).

3.5.3. Avaliação histopatológica

Para todas as análises presentes nos cortes histológicos, as imagens foram digitalizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B (Laboratório Multiusuário – UFOP) com uma microcâmara acoplada e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica QWin V3. O processo inflamatório foi avaliado através da quantificação de todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do coração em 20 imagens aleatórias ($1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) obtidas pelo teste de estabilidade, com a objetiva de 40x. O mesmo foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não-infectados \pm desvio padrão. Os animais infectados com o *T. cruzi* que apresentarem valores de quantificação de núcleos celulares acima desta média serão considerados como

inflamação cardíaca. A avaliação da neoformação de colágeno foi feita de forma semi-quantitativa. Para todas as análises foram utilizadas objetiva de 20x.

3.7 Análise estatística

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

4.0 RESULTADO

Com base nas curvas de parasitemia (**figura 3**), observamos que os parasitos no sangue começaram a ser detectados a partir do 4º dia de infecção, com um pico de parasitos no 8º dia de infecção. As formas tripomastigotas sanguíneas do parasito apresentaram-se mais elevadas nos animais tratados com as maiores doses de Nitazoxanida.

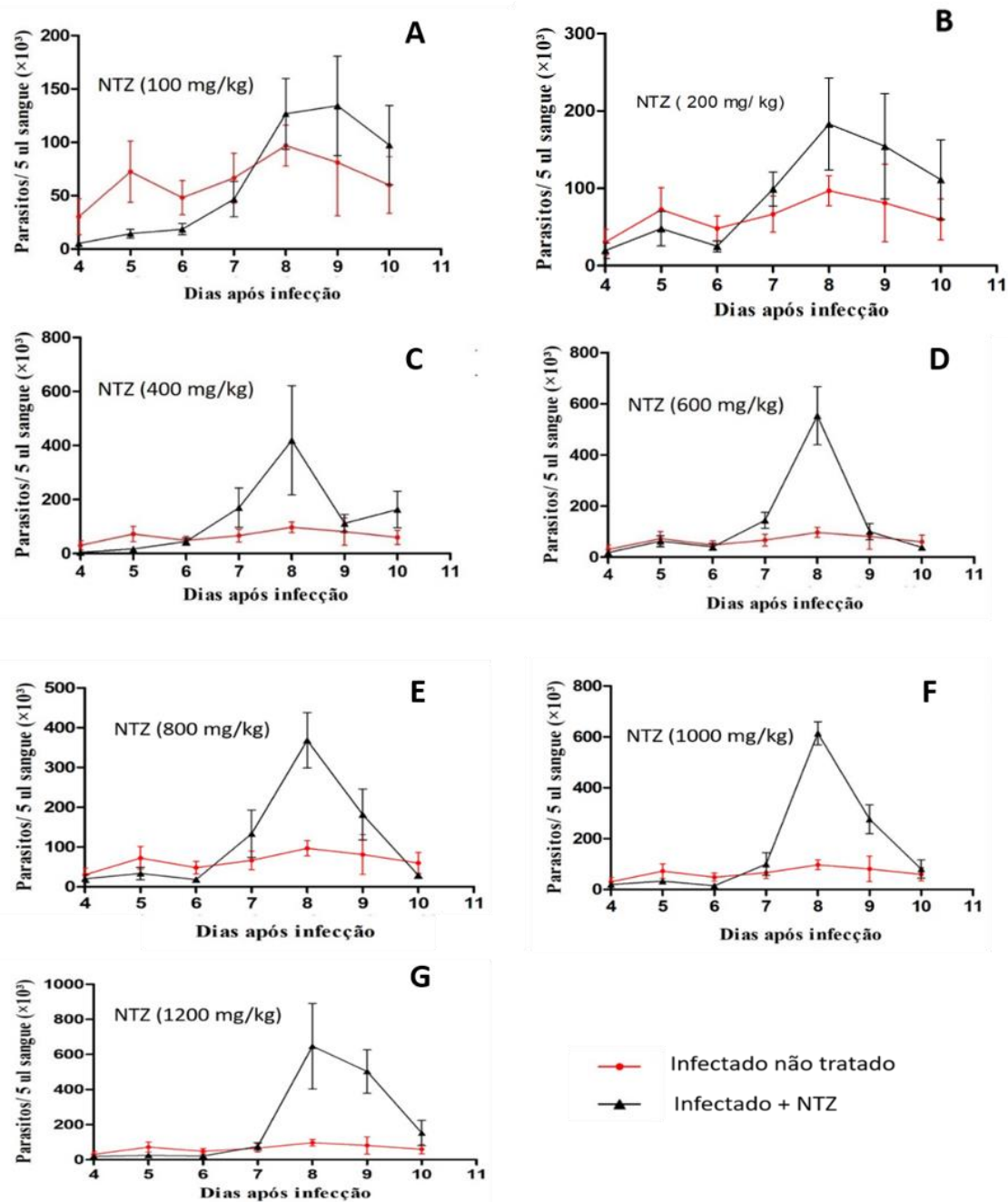


Figura 3. Curvas de parasitemia. Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* tratados com Nitazoxanida na dose de (A) 100 mg/kg, (B) 200 mg/kg, (C) 400 mg/kg, (D) 600 mg/kg, (E) 800 mg/kg, (F) 1000 mg/kg, (G) 1200 mg/kg, ou não tratados. As curvas são referentes a 10 dias de infecção e tratamento. Os dados em cada ponto da curva equivalem à média da parasitemia/ dia a cada grupo.

Nota-se que a taxa de sobrevivência (**figura 4**) dos animais foi de 100% naqueles infectados não tratados e infectados tratados com as doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de NTZ. Os animais infectados e tratados com as doses de 400, 600, 800 e 1000 mg/kg de NTZ obtiveram uma sobrevivência de aproximadamente 88%. Já aqueles que receberam a maior dose do Nitazoxanida apresentaram cerca de 55% de sobrevivência ao final dos 10 dias.

No entanto nos resultados da massa relativa do coração (**figura 5**), observa-se que não houve diferença comprovada estatisticamente entre nenhum dos grupos experimentais.

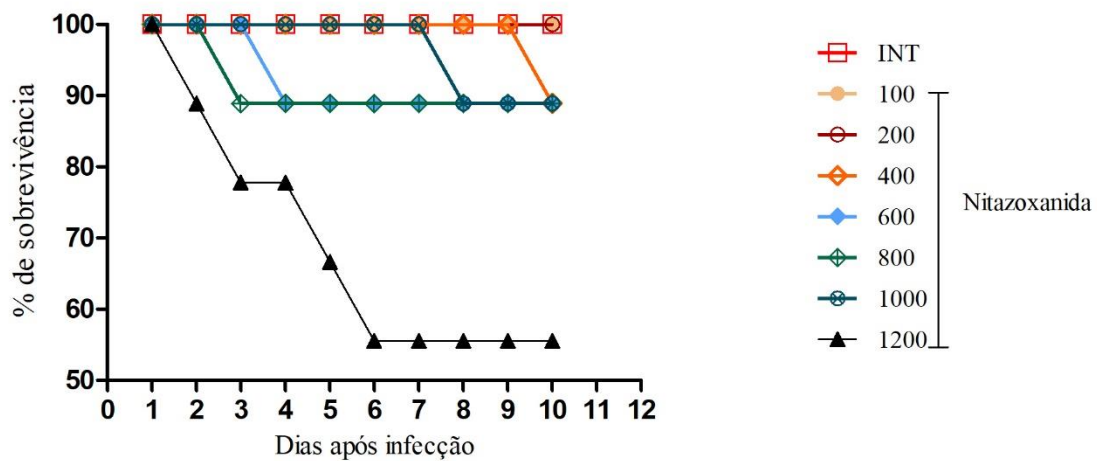


Figura 4. Curva de sobrevivência. Camundongos C56BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* tratados, ou não, com diferentes doses de Nitazoxanida. Curvas referentes ao período entre o 1º e o 10º dia de infecção.

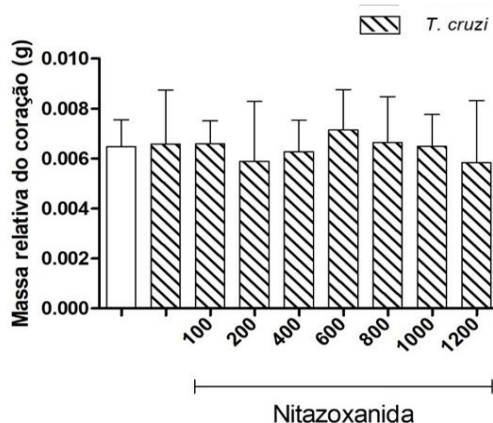


Figura 5. Massa relativa do coração. Camundongos C56BL/6 foram infectados, ou não, com a cepa Y do *T. cruzi* tratados, ou não, com a Nitazoxanida. A barra branca representa os animais não infectados e não tratados (controle), barra hachurada representa os animais infectados com *T. cruzi*, que receberam ou não as diferentes doses do fármaco.

A resposta imune resultante do tratamento com diferentes doses do NTZ, foi avaliada por meio de ensaios imunoenzimáticos para as citocinas inflamatórias TNF e IL-17, para a citocina regulatória IL-10 e para a quimiocina CCL2.

Ao analisarmos a produção do TNF (**Figura 6 A**) observou-se um aumento nos níveis dessa citocina no macerado do coração quando se utilizou a dose de 400 mg/kg da NTZ em relação ao grupo de animais não infectados e não tratados. Já para os animais que receberam as doses de 200, 600, 1000 e 1200mg/kg deste mesmo fármaco, observou-se diminuição na produção do TNF em relação ao grupo infectado não tratado.

Relativo à IL-17 (**Figura 6 B**), observamos uma diminuição nas doses de 400, 600, 1200mg/kg da NTZ em relação ao grupo infectado não tratado. Ainda, observou-se diminuição desta citocina na dose de 400 mg/kg do fármaco quando comparado aos animais não infectados não tratados.

Na produção da IL-10 (**figura 6 C**) nota-se uma diminuição da mesma nos grupos de animais infectados e tratados com Nitazoxanida nas doses de 200, 400 e 600mg/kg quando comparado ao grupo não infectado não tratado, assim como uma diminuição nas

doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg quando comparados ao grupo infectado não tratado. Já os níveis da quimiocina CCL2 (**figura 6 D**), foram observadas um aumento em sua produção nos animais que receberam as doses de 200, 600 e 800 mg/ kg de NTZ em relação aos animais não infectados não tratados.

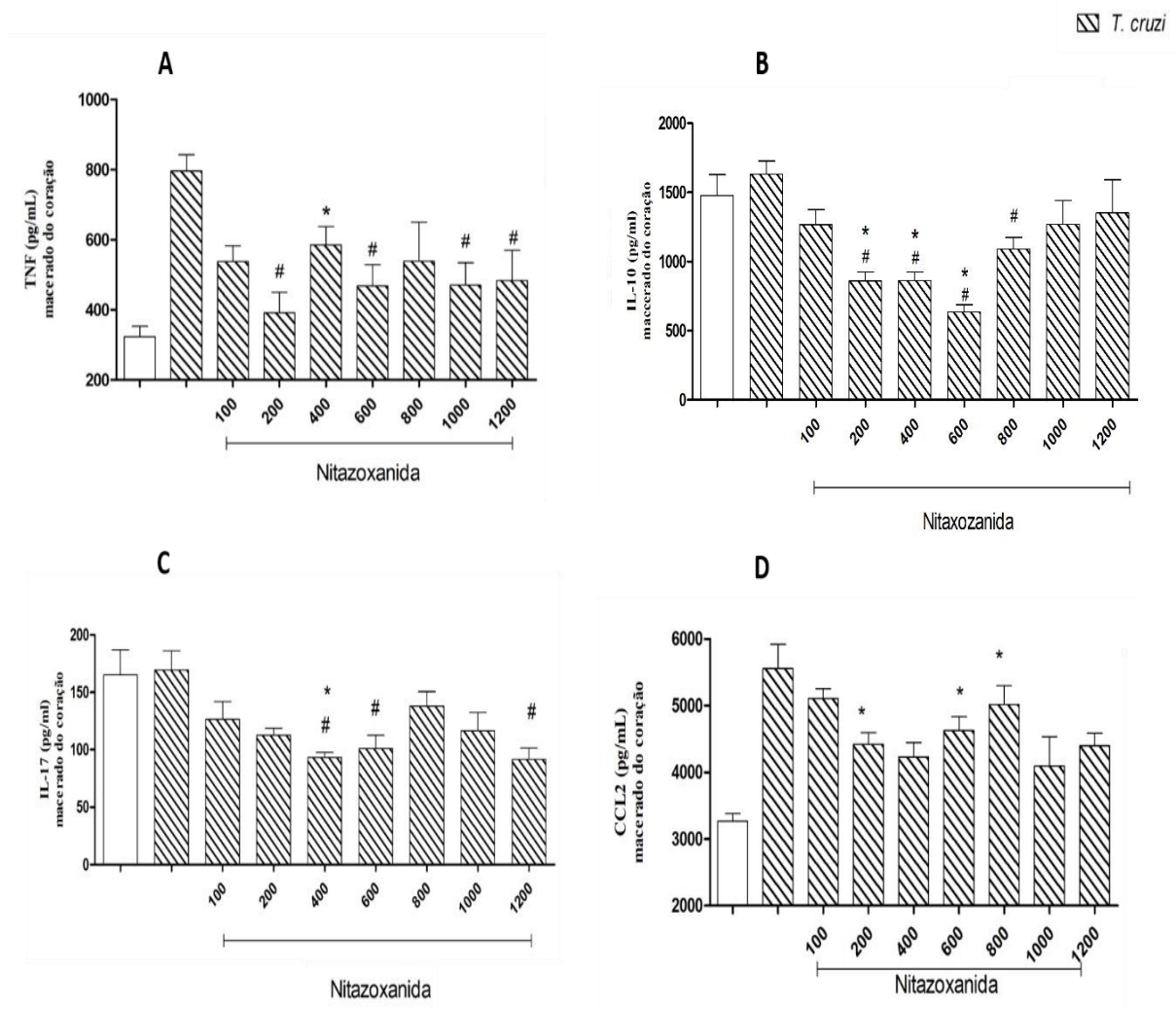


Figura 6. Produção de citocinas (TNF, IL-17, IL-10 e CCL2). Níveis das citocinas TNF (a), IL-17 (b), IL-10 (c), CCL2 (d) no macerado do coração de animais C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com NTZ. A barra branca representa animais não infectados e não tratados enquanto as barras hachuradas representam os animais infectados que receberam ou não as doses do fármaco. Símbolos diferentes significam diferença estatística com o $p < 0,05$. (*) para diferença em relação ao grupo controle não infectado e (#) para diferença em relação ao grupo infectado não tratado.

Em decorrência do tratamento farmacológico com diferentes doses da NTZ e também, assumindo a infecção pelo *T. cruzi* conjuntamente com o tratamento, avaliou-se o perfil das enzimas transaminases TGO e TGP, indicativas de função hepática nestes animais. A infecção pelo *T. cruzi* não alterou a concentração plasmática da enzima TGP (**Figura 7A**). Da mesma forma, a terapia com NTZ até a dose de 600mg/kg não foi capaz de elevar ou reduzir os índices da enzima TGO, porém, doses iguais e superiores a 800mg/kg elevaram o seu índice em relação aos animais não infectados não tratados (**Figura 7B**).

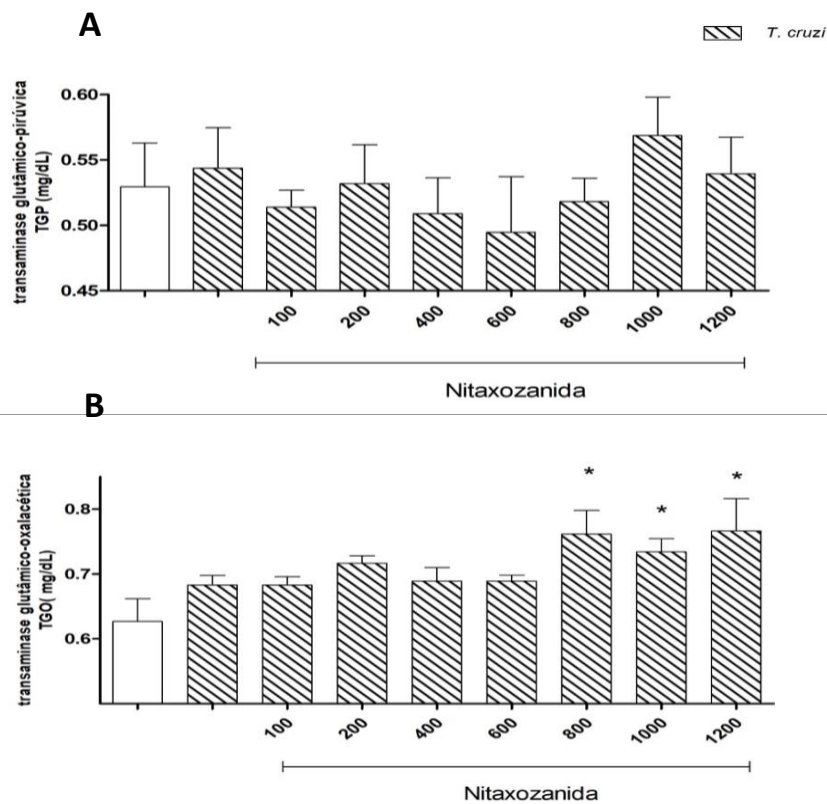


Figura 7. Atividade das enzimas transaminases. Concentração das enzimas transaminase glutâmico – pirúvica (a) e transaminase glutâmico – oxalacética (b) no plasma de animais C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com Nitazoxanida. Barra branca representa animais não infectados e não tratados, barra listrada representa animais

infectados que receberam ou não as doses do referido fármaco. $p < 0,05$. (*) para diferença em relação ao grupo controle não infectado.

A contagem de núcleos celulares foi utilizada para quantificar os núcleos presentes nas células musculares cardíacas e nos leucócitos presentes no infiltrado inflamatório dos animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados com as diferentes doses de NTZ. Observamos um nítido aumento das células inflamatórias nos animais infectados pelo *T. cruzi*, porém a terapia com NTZ não foi capaz de alterar esta quantificação celular em nenhuma das doses utilizadas (**Figura 8**). Ressalta-se ainda, a presença de um padrão fenotípico mononuclear para as células constituintes deste infiltrado inflamatório cardíaco. Em relação aos cortes histológicos (**Figura 9**) podemos observar um intenso infiltrado inflamatório nos animais infectados e não tratados, assim como nos animais tratados com NTZ com doses altas igual 600 mg/kg e superiores. Também podemos observar um infiltrado inflamatório moderado nos animais tratados nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg de NTZ.

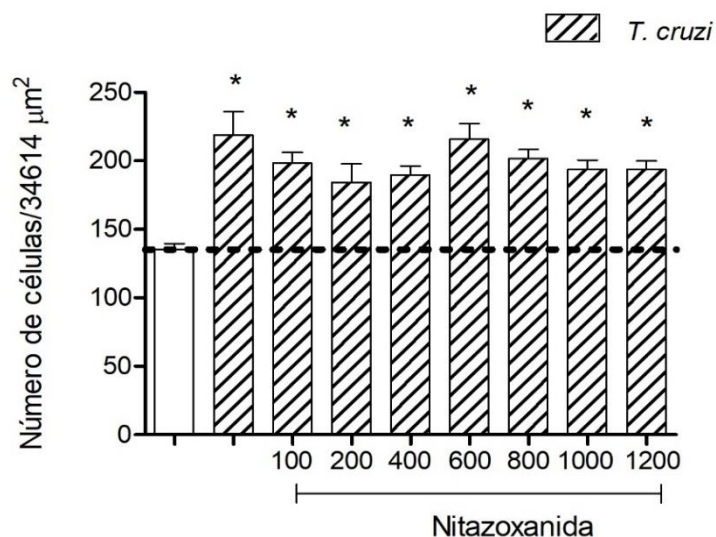


Figura 8. Quantificação do processo inflamatório no tecido cardíaco. Análise do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco em de animais C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com NTZ. A barra branca representa animais não infectados e não tratados enquanto as barras hachuradas representam os animais infectados que receberam ou

não as doses do fármaco. Símbolos diferentes significam diferença estatística com o $p < 0,05$. (*) para diferença em relação ao grupo controle não infectado.

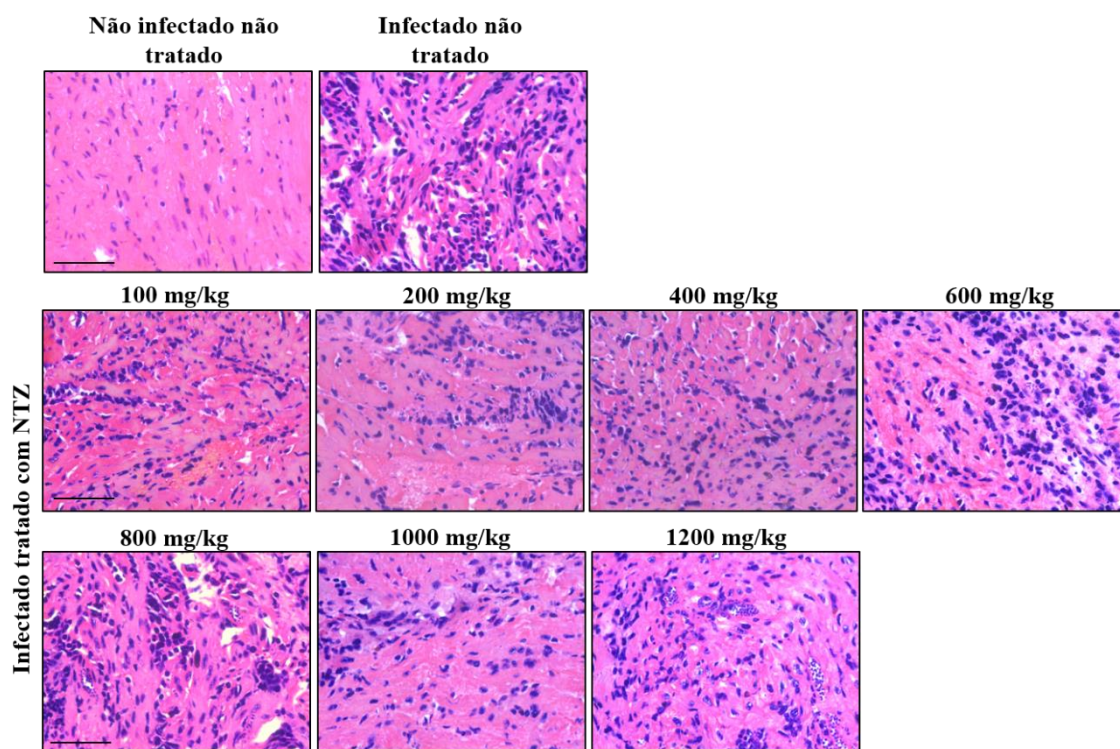


Figura 9. Análise qualitativa do coração: Fotomicrografias do coração de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, tratados ou não com NTZ. Aspecto histológico do tecido muscular cardíaco normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório intenso nos animais infectados e não tratados e nos animais infectados e tratados com NTZ nas doses de 600, 800, 1000 e 1200 mg/kg; e infiltrado moderado nos animais infectados e tratados com NTZ nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Hematoxilina-Eosina. Barra=50 μ m.

5.0 DISCUSSÃO

A Nitazoxanida é um antiparasitário sintético indicado para o tratamento de helmintíases provocadas por nematódeos, cestódeos e trematódeos, amebíase, criptosporidíase, blastocistose (Anderson & Curran, 2007). No presente estudo,

mostramos que a Nitazoxanida, administrado diariamente de 12 em 12 horas, em concomitância com a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos C57BL/6, foi capaz de elevar o nível de parasitos circulantes, reduzir a produção de citocinas inflamatórias e elevar o infiltrado inflamatório no coração, além de ser dose-dependente na mortalidade.

Há poucos trabalhos na literatura estudando a NTZ em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi*. O trabalho de Valle-Reyes e cols, utilizando a dose de 100mg/kg e 1000 mg/ kg da NTZ em camundongos Balb/c infectados com uma cepa isolada do México (Albarrada), demonstrou aumento no nível de parasitemia, na mortalidade dos animais e no dano tecidual no coração, tecido esquelético e pulmão (Valle-Reyes et al., 2017). Por outro lado, Ferreira 2014, utilizando 50 mg/kg da NTZ em camundongos Swiss infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, demonstrou uma diminuição nos parasitos circulantes, além de uma diminuição da sobrevivência do grupo tratado com NTZ (Ferreira, 2014). Apesar da dose baixa utilizada neste último estudo, estes resultados poderiam ser explicados por uma possível toxicidade do fármaco, uma vez que a autora administrou a NTZ pela via intraperitoneal. Além disso, a autora mostrou, também, uma efetividade de 51 vezes do NTZ em formas amastigotas (in vitro) quando comparado com o Bz.

Contudo o delineamento experimental destes trabalhos são distintos e, como já é descrito na literatura científica, a genética tanto do parasito quanto de seu hospedeiro mamífero (modelo experimental) interfere no perfil inflamatório, na patogênese cardíaca, na infectividade, no nível de parasitemia, na virulência e na mortalidade dos animais experimentais (Andrade, 1985; Brener 1977; Melo e Brener, 1978).

Durante suas pesquisas Carlos Chagas também observou diferenças nas formas dos tripomastigotas sanguíneos (formas largas e delgadas), onde notou-se que as formas largas apresentavam tropismo pelas células cardíacas, baixa virulência e são resistentes

aos anticorpos do hospedeiro (Chagas, 1909). Por sua vez, as formas delgadas apresentam tropismo pelos macrófagos, ocorrem principalmente em cepas de alta virulência, demonstram parasitemia precoce e são mais susceptíveis aos anticorpos circulantes (Brener, 1965; Brener, 1969; Andrade, 1974, Chagas, 1909).

Após estudar as diferenças entre parâmetros morfológicos e histopatológicos encontrados nas formas tripomastigotas sanguíneas, Andrade propôs uma subdivisão das populações de *T. cruzi*, onde perfis similares de comportamento biológico em camundongos foram agrupados (Andrade, 1974). Foram, então, definidos inicialmente três grupos distintos (I, II e III) e, em 1997, Andrade e Magalhães propuseram o termo biodema - associação entre aspectos biológicos e perfil de isoenzimas (Andrade e Magalhães, 1997).

A cepa Y, proposta em nosso trabalho, é caracterizada no tipo I ou biodema I, sendo constituído por cepas com predomínio das formas delgadas e que apresentam uma elevada e precoce parasitemia. Foi isolada de um paciente na fase aguda da infecção em 1950, Marília, São Paulo, e previamente caracterizada por Filardi e Brener em 1987. A morte dos camundongos ocorre geralmente entre o 7º e o 12º dia da infecção e há um predomínio de macrófago tropismo na fase inicial da infecção. Essa cepa é susceptível ou parcialmente resistente ao tratamento com Bz (Silva e Nussenzweig, 1953; Zingales *et al.*, 2009). Por estas características, a cepa Y foi utilizada nesse trabalho devido a sua alta infectividade em camundongos C57BL/6, podendo ter uma compreensão rápida a resposta ao tratamento com o NTZ, uma vez que o experimento foi realizado em dez dias.

Apesar dela ser considerada tóxica em altas doses, segundo Murphy e Friedmann, 1985 (Murphy e Friedmann, 1985), no qual preconiza uma dose mínima do NTZ de 100mg/kg e máxima de 1400 mg/kg (dose máxima letal) em camundongos, ela é capaz de alterar a resposta inflamatória em doses moderadas (Rossignol, 2016; Aquino

& Fonseca 2010, Hong et. al, 2012). Tendo a inflamação como base da patogênese da infecção pelo *T. cruzi*, este fármaco poderia amenizar a produção de elementos imunes a ponto de aumentar a sobrevivência de animais infectados.

Nossos resultados corroboram com estes estudos reforçando a capacidade da Nitazoxanida foi capaz de diminuir a concentração de TNF, IL-10 e IL-17 em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* em fase aguda da infecção. Relativo à quimiocina CCL2, essa quimiocina está associada ao recrutamento celular para o sítio inflamatório de células mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos (Talvani et. al 2012). O aumento inicial da replicação parasitária poderia contribuir para o aumento desta quimiocina, mas a terapia com NTZ foi capaz de reduzir sua produção, reforçando a concepção de imunorregulação deste fármaco. Por isso, podemos observar que em doses mais baixas a NTZ desempenhou um papel imunoregulador de citocina pró-inflamatória na fase aguda da infecção por esse parasito. Observamos também, que nessas doses menores ainda houve uma diminuição do infiltrado inflamatório nos tecidos do coração). Além disso, o nosso estudo mostrou que o índice de TGP e TGO não se alteram na fase aguda, exceto nas doses da NTZ mais elevada. Este fato corrobora o trabalho de Murphy e Friedmann, 1985 (Murphy e Friedmann, 1985) onde apesar do modelo experimental ter sido ratos, os autores mostraram que o tratamento subcrônico de 14 semanas com a NTZ não apresentou efeito sistêmico nem anomalias, sugerindo que o tratamento repetido seria seguro. E este é um ponto que merece investigação futura em relação a NTZ – qual seria o tempo ideal para o tratamento com o intuito de eliminar o *T. cruzi* e regular a resposta inflamatória do hospedeiro. O tratamento pontual na fase aguda seria suficiente para a mudança deste perfil imunoparasitológico a ponto de refletir no quadro clínico nos animais em fase aguda ou a terapia deveria persistir ao longo de todo o tempo de infecção. Quando se utiliza roedores como modelos experimentais, a

administração de qualquer fármaco via gavagem possui como limitação o risco de possíveis lesões no esôfago do animal, mesmo com um administrador/pesquisador experiente. Dessa forma, a avaliação da NTZ por longa duração poderia ser repensada em administração na água ou em outros veículos e/ou vias que não trouxessem riscos para o animal. O papel regulador da NTZ já é evidenciado após as primeiras doses em animais infectados com o *T. cruzi*, não havendo garantia apenas se este efeito refletiria em melhora patológica em fase crônica.

Em suma, a terapia com diferentes doses do fármaco Nitazoxanida administrada em fase inicial, demonstrou atuar sobre a resposta inflamatória de animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e que, apesar do aumento no parasitismo sanguíneo este fármaco foi capaz de regular a produção plasmática e cardíaca de mediadores inflamatórios sem, no entanto, afetar drasticamente o funcionamento hepático nestes animais.

6.0 CONCLUSÃO

Concluimos que a Nitazoxanida em doses menores apresenta um papel parcial imunomodulador na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*.

7.0 REFERÊNCIAS

- Alvarez, VE, Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, JJ, & Turk, B. Bloqueio de autofagia para evitar a diferenciação de parasitas: uma possível nova estratégia para combater infecções parasitárias. *Autofagia*, 4 (3), 361-363, 2008.
- Anderson, Vanessa R .; Curran, Monique P. Nitazoxanide. *Drogas* , v. 67, n. 13, p. 1947-1967, 2007.
- Andrade, D. V., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(7), e3010, 2014.
- Andrade S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev. Pat. Trop.*, p. 65-121, 1974.
- Andrade S.G. e Magalhães J.B. Biodemes and zimodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, p. 27-35, 1997.
- Andrade S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, p. 39-46, 1985.
- Aquino, Maria Teresa Prudente de; Fonseca, Benedito Antônio Lopes da. Estudo do efeito antiviral das drogas pentoxifilina e nitazoxanida em infecções pelo vírus dengue-2. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- Bafica, A. Santiago, H. C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., & Sher, A.. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, ISSN 0022-1767, 2006.
- Barrett, MP, Burchmore, RJ, Stich, A., Lazzari, JO, Frasch, CA, Cazzulo, JJ, & Krishna, S. As tripanossomíases. *The Lancet* , 362 (9394), 1469-1480, 2003.
- Bermudez, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta tropica*, v. 156, p. 1-16, ISSN 0001-706X, 2016.

Bern, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 4, p. 655-681, ISSN 0893-8512, 2011.

Bok, Karin; Green, Kim Y. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 22, p. 2126-2132, 2012.

Brener, Zigman; Gazzinelli, Ricardo T. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International archives of allergy and immunology*, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, n. 6, p. 389-96, ISSN 0036-4665, 1962.

Brener Z. Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *Scientific Publication*, p. 11-21, 1977.

Brener Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 59, p. 19-26, 1965.

Brener Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 63, p. 215-220, 1969.

Broekhuysen, J., Stockis, A., Lins, R. L., De, J. G., & Rossignol, J. F.. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 38(8), 387-394, 2000.

Caldas, I. S., Talvani, A., Caldas, S., Carneiro, C. M., de Lana, M., da Matta Guedes, P. M., & Bahia, M. T. . Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitology research*, 103(2), 413, 2008.

Cardoso, M. S.; Reis-Cunha, J. L.; Bartholomeu, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology*, v. 6, ISSN 1664-3224, 2016.

Castro, J.A., DE Mecca, M.M. and Bartel, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*, 25(8), 471-479, 2006.

Chagas, C.J. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1, 159-218, 1909.

Chan-Bacab, M. J.; Hernández-Núñez, E.; Navarrete-Vázquez, G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1, 3-thiazol-2-yl) benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 63, n. 6, p. 1292-1293, ISSN 1460-2091, 2009.

Coura, J. R. Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 549-554, 2009.

Coura, J. R. and De Castro, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 3-24, 2002.

Coura, J. R. and Dias, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 31-40, 2009.

De Andrade, A. L. S. S., Zicker, F., de Oliveira, R. M., e Silva, S. A., Luquetti, A., Travassos, L. R., ... & Martelli, C. M.. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, v. 348, n. 9039, p. 1407-1413, ISSN 0140-6736, 1996.

De Fátima Oliveira, M. M., Nagao-Dias, A. T., de Pontes, V. M. O., de Souza Júnior, A. S., Coelho, H. L. L., & Coelho, I. C. B. . Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 3, p. 209-228, ISSN 1980-8178, 2008.

Dias, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 22, n. 3, p. 147-156, ISSN 0037-8682, 1989.

Dias, J. C. P., Cláudio, L. D. G., Lima, M. M., Albajar-Viñas, P., Silva, R. A., Alves, R. V., & Costa, V. M. D.. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, 87-90, 2016.

Dias, E.; Laranja, F. S.; Nobrega, G. Doença de Chagas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 43, n. 3, p. 495-581, ISSN 0074-0276, 1945.

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

Ferreira, Daiane Dias. Reposicionamento de fármacos e estudo de novas combinações terapêuticas no tratamento etiológico da doença de Chagas. 2014.

Filardi, L.; Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 755-759, ISSN 0035-9203, 1987.

Fox, L. M., & Saravolatz, L. D.. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical infectious diseases*, 40(8), 1173-1180, 2005.

Fragata-Filho, A. A., França, F. F., da Silva Fragata, C., Lourenço, A. M., Faccini, C. C., & de Jesus Costa, C. A.. Evaluation of parasiticide treatment with benznidazol in the electrocardiographic, clinical, and serological evolution of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004508, 2016.

Garcia, E.S and Azambuja, P. Infection of Triatomines with *Trypanosoma cruzi*, p. 143-155. In JM Crampton, CB Beard & Louis K (eds), *The Molecular Biology of Insector Disease Vectors: a Methods Manual*, Champ & Hall, London, 1996.

Gilles, Herbert M.; Hoffman, Paul S. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 3, p. 95-97, 2002.

Gonzalez, M.S, Azambuja, P. and Garcia, E.S. The influence of triatomine hormonal regulation on the development of *Trypanosoma cruzi*, p.665-707. In Ru Carcavallo, I Galindez Giron, J Jurberg and H Lent (eds), *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the America*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1988.

Gupta, A., Tulsankar, S. L., Bhatta, R. S., & Misra, A.. Pharmacokinetics, Metabolism, and Partial Biodistribution of “Pincer Therapeutic” Nitazoxanide in Mice following

Pulmonary Delivery of Inhalable Particles. *Molecular pharmaceuticals*, 14(4), 1204-1211, 2017.

Gutierrez, F. R. S. Guedes, P.M.M, Gazzinelli, R.T, e Silva, J.S . The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunology*, v. 31, n. 11, p. 673-685, 2009.

Gutierrez, F. R., Mariano, F. S., Oliveira, C. J., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M., Silva, G. K., ... & Teixeira, M. M. Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. *Infection and immunity*, 79(5), 1873-1881, 2011.

Hemphill, Andrew; Mueller, Joachim; Esposito, Marco. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert opinion on pharmacotherapy*, v. 7, n. 7, p. 953-964, 2006.

Hong, S. K. Kim, HJ, Song, CS, Choi, IS, Lee, JB e Park, SY . Nitazoxanide suppresses IL-6 production in LPS-stimulated mouse macrophages and TG-injected mice. *International immunopharmacology*, v. 13, n. 1, p. 23-27, ISSN 1567-5769, 2012.

Horta, A. L.; Figueiredo, V. P. ; Leite, A. L. J. ; Costa, G. P. ; Menezes, A. P. ; Ramos, C. O. ; Pedrosa, T. C. F. ; Bezerra, F. S. ; Vieira, P. M. A. ; Talvani, A. . The β -blocker carvedilol and the benzimidazole modulate the cardiac immune response in the acute infection induced by Colombian strain of the Trypanosoma cruzi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, p. e180271, 2018.

Keeffe, EB e Rossignol, JF. Tratamento da hepatite viral crônica com nitazoxanida e tiazolides de segunda geração. *Revista Mundial de Gastroenterologia: WJG* , 15(15), 1805, 2009.

Korba, B. E., Montero, A. B., Farrar, K., Gaye, K., Mukerjee, S., Ayers, M. S., & Rossignol, J. F.. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral research*, 77(1), 56-63, 2008.

Malik, L. H.; Singh, G. D.; Amsterdam, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. *Clinical cardiology*, v. 38, n. 9, p. 565-569, ISSN 1932-8737,2015.

Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faundez, M.,Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A*, 146, 601-620, 2007.

Machado, Fabiana S.; Tanowitz, Herbert B.; Ribeiro, Antonio L. Pathogenesis of Chagas Cardiomyopathy: Role of Inflammation and Oxidative Stress. 2013.

Magalhães, L. M., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L. M., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7), e0003816, 2015.

Marcelín-Jiménez, G., Contreras-Zavala, L., Maggi-Castellanos, M., Ángeles-Moreno, A. P., & García-González, A. Development of a method by UPLC–MS/MS for the quantification of tizoxanide in human plasma and its pharmacokinetic application. *Bioanalysis*, 4(8), 909-917, 2012.

Melo, R. C., & Brener, Z.. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *The Journal of parasitology*, 475-482, 1978.

Murphy, J. R., & Friedmann, J. C.. Pre-clinical toxicology of nitazoxanide—a new antiparasitic compound. *Journal of Applied Toxicology*, 5(2), 49-52, 1985.

Montgomery, S. P. Starr, M. C., Cantey, P. T., Edwards, M. S., & Meymandi, S. K.. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 90, n. 5, p. 814-818, ISSN 0002-9637, 2014.

Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F., & Guhl, F. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295-1306, 2015.

Muñoz, M. J., Murcia, L. and Segovia, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 9, 5-7, 2011.

Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31, 26-34, 2013.

Navarrete-Vazquez, G. Chávez-Silva, F., Argotte-Ramos, R., del Carmen Rodríguez-Gutiérrez, M., Chan-Bacab, M. J., Cedillo-Rivera, R., & Hernández-Nuñez, E. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 21, n. 10, p. 3168-3171, ISSN 0960-894X, 2011.

Pankuch, Glenn A.; Appelbaum, Peter C. Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 50, n. 3, p. 1112-1117, 2006.

Paula-Costa, G., Lopes, L. R., Silva, M. C. D., Horta, A. L., Pontes, W. M., Milanezi, C. M., ... & Talvani, A.. Doxycycline and benznidazole reduce the profile of Th1, Th2, and Th17 chemokines and chemokine receptors in cardiac tissue from chronic *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Mediators of inflammation*, 2016.

Pereira da Silva, L. H., & Nussenzweig, V.. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol Clin Biol*, 20, 191-207, 1953.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001. ISSN 1473-3099.

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

Rassi JR, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. ISSN 0140-6736.

Reitman, S.; Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*, v. 28, n. 1, p. 56-63, ISSN 1943-7722, 1957.

Romaña C. A area de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. *MEPRA*, 22, 16-30, 1935.

Rossignol, Jean-François. Nitazoxanida: um agente antiviral de amplo espectro de primeira classe. *Pesquisa antiviral*, v. 110, p. 94-103, 2014.

Salomão, K., Figueiredo Sadok Menna-Barreto, R., & Lisboa de Castro, S. .Stairway to heaven or hell? Perspectives and limitations of Chagas disease chemotherapy. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(20), 2266-2289, 2016.

Santos., Poulin, S. and Hildgen, P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 87(4), 885-95, 2008.

Steverding, D. The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 317, ISSN 1756-3305, 2014.

Suresh, K., Mannava, M. C., & Nangia, A.. Cocrystals and alloys of nitazoxanide: enhanced pharmacokinetics. *Chemical Communications*, 52(22), 4223-4226, 2016.

Talvani, A.; Teixeira, M. M. 8 Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. *Advances in parasitology*, v. 76, p. 171, 2012.

Teixeira, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Silva, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in parasitology*, v. 18, n. 6, p. 262-265, ISSN 1471-4922., 2002.

Urbina, Julio A.; Docampo, Roberto. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

Valle-Reyes, J. S., Melnikov, V., Dobrovinskaya, O., Rodriguez-Hernández, A., Wookee-Zea, C., Pimientel-Rodríguez, V., ... & Espinoza-Gómez, F.. Antiprotozoal drug nitazoxanide enhances parasitemia, tissue lesions and mortality caused by *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental parasitology*, 172, 44-50, 2017.

Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., & Segura, E. . Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American heart journal*, 127(1), 151-162. 1994.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M.G., Petti, M., Bertocchi, G. and Armenti, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(2):157-163,2009.

Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., & Cheeseman, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5022-5027, 2008.

White JR, A. C. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 68, n. 4, p. 382-383, ISSN 0002-9637, 2003.

Yoshida, Nobuko. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., & Miles, M. A.. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054, 2009.

8.0. Anexos

Artigo 1: The β -blocker carvedilol and the benznidazole modulate the cardiac immune response in the acute infection induced by Colombian strain of the *Trypanosoma cruzi*

ORIGINAL ARTICLE

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 113(11): e180271, 2018 1 | 8

The β -blocker carvedilol and the benznidazole modulate the cardiac immune response in the acute infection induced by Colombian strain of the *Trypanosoma cruzi*

Aline Luciano Horta^{1,2}, Vivian Paulino Figueiredo^{1,2}, Ana Luisa Junqueira Leite^{1,2},
Guilherme de Paula Costa^{1,2}, Ana Paula de Jesus Menezes^{1,2}, Camila de Oliveira Ramos^{1,2},
Tamiles Caroline Fernandes Pedrosa^{1,2}, Frank Silva Bezerra^{1,2,3},
Paula Melo de Abreu Vieira^{1,2}, André Talvani^{1,2,3,4/+}

¹Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Ciências Biológicas, Ouro Preto, MG, Brasil

²Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Ouro Preto, MG, Brasil

³Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Ouro Preto, MG, Brasil

⁴Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Biomas Tropicais, Ouro Preto, MG, Brasil

BACKGROUND The infection led by *Trypanosoma cruzi* persists in mammalian tissues causing an inflammatory imbalance. Carvedilol (Cv), a non-selective beta blocker drug indicated to treat heart failure and antihypertensive has shown to promote antioxidant and immunomodulatory properties which might improve the inflammation induced by *T. cruzi*.

OBJECTIVES Evaluate the role of Cv on the inflammatory response of C57BL/6 mice acutely infected with the Colombian strain of *T. cruzi*.

METHODS Animals were infected with the Colombian strain of *T. cruzi* and treated with Cv (25 mg/kg/day), benznidazole (Bz) (100 mg/kg/day) or their combination. On the 28th day of infection and 23 days of treatment, the euthanasia occurred, and the heart preserved for histopathological, oxidative stress (SOD, catalase, TBARS, carbonylated proteins) and plasma (CCL2, CCL5, TNF, IL-10) analyses. Parasitaemia and survival were assessed along the infection.

FINDINGS Cv decreased TBARS, but increased the mortality rate, the parasitaemia and the levels of CCL2, CCL5, catalase and the inflammatory infiltrate in the cardiac tissue. Bz led the reduction of the inflammatory infiltrate and circulating levels of oxidative stress and inflammatory mediators in the infected mice.

MAIN CONCLUSIONS Our data suggest that Cv, in this experimental model using the Colombian strain of *T. cruzi*, caused damage to the host.

Key words: carvedilol - *Trypanosoma cruzi* - inflammation - heart disease - chemokines
