UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Potenciais ações terapêuticas da associação melatonina-meloxicam sobre a cardiomiopatia chagásica crônica em ratos wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

-RIBEIRÃO PRETO-
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Potenciais ações terapêuticas da associação melatonina-meloxicam sobre a cardiomiopatia chagásica crônica em ratos wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

-RIBEIRÃO PRETO-

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Luiz Gustavo Rodrigues

Potenciais ações terapêuticas da associação melatonina-meloxicam sobre a cardiomiopatia chagásica crônica em ratos wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto 2013.

97p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prado Junior, José Clóvis

1. *Trypanosoma cruzi*.
2. Melatonina.
3. Meloxicam.
4. Citocinas.
5. Cardiomiopatia Chagásica Crônica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira

Potenciais ações terapêuticas da associação melatonina-meloxicam sobre a cardiomiopatia chagásica crônica em ratos wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus..

Pela saúde e por todas as graças concebidas

*Aos meus pais Vicente de Paulo Oliveira e Maria das Graças Rodrigues Oliveira
por ensinar a honestidade e dignidade, oferecendo sempre amor e carinho
incondicionais.*

*Ao meu irmão Douglas Rodrigues Oliveira, exemplo de amizade, caráter e
determinação o qual tento me espelhar.*

*Ao meu irmão Fábio Rodrigues Oliveira por ser sempre o meu melhor amigo em
todos os momentos, meu exemplo de força e coragem.*

*As minhas sobrinhas Ana Beatriz Silva Oliveira e Gabriela Silva Oliveira por
transmitirem toda a alegria pura e ingênua de criança que nos torna mais felizes.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Aos amigos Christian Collins Kuehn, Carla Domingues dos Santos Sponchiado, Cássia Mariana Bronzon da Costa, Mariana Rosa da Silva, Kelly Cristina Rodrigues, Mariana Bryan Augusto, Mariza Abreu Miranda, Gisele Bulhões Portapilla, Larissa Alves dos Reis Dias, Junior Furini que compartilham todas as experiências positivas ou negativas no laboratório, sempre ajudando e incentivando.

Às amigas: Maria Angelina Lázaro Castilho, Patrícia Aparecida Ramos Marcuz, Josiane Aparecida Gabriel Bevilacqua e Analuiza Souza Costa que participaram de maneira fundamental na conclusão deste importante passo de minha vida.

Aos amigos Danilo Candido de Almeida e Antonio Sousa Santos pelo importante apoio e atenção dispensados a mim.

A minha namorada Kelly Cristiane Teodoro pelo apoio e carinho tão importantes para meu equilíbrio felicidade e crescimento como pessoa.

Aos técnicos de laboratório de parasitologia, Míriam Paula Alonso Toldo, Cristiana Gonzalez, Antônia Ferreira Cruz, Inara Fernanda Lage Gallo e Georgius Luiz de Oliveira pela ajuda fundamental e amizade.

Às funcionárias da FCFRP-USP Maraísa Palhão Vêrri, Regina de Albuquerque, Vânia Cláudia de Albuquerque e Wânia Maria Tavares da Silva.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto (*in memoriam*) e Laura M. Kawasse, do laboratório de Patologia da FMRP-USP, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado e concessão do auxílio financeiro para execução deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche no exterior.

Aos Professores Dr. João Aristeu da Rosa, Dra. María Dolores Barges Castilló pela co-orientação no Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES

Meus sinceros agradecimentos a todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para realização deste trabalho.

RESUMO

OLIVEIRA, L.G.R. **Potenciais ações terapêuticas da associação melatonina-meloxicam sobre a cardiomiopatia chagásica crônica em ratos wistar infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2013. 97f. Tese (Doutorado) Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O sistema imune do hospedeiro acometido pela doença de Chagas tem sido alvo de importantes pesquisas que podem favorecer avanços no entendimento dos mecanismos patogênicos relacionados à doença. No presente estudo, investigamos possíveis ações benéficas provenientes de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da associação terapêutica (melatonina/meloxicam) sobre a cardiomiopatia chagásica crônica. Foram analisadas citocinas e outros mediadores envolvidos no processo inflamatório característico da infecção. Além disso, níveis plasmáticos de Creatina Fosfoquinase MB (CK-MB), número de focos inflamatórios no tecido cardíaco e análise do peso relativo do coração foram avaliados como fatores preditivos da redução dos danos no miocárdio após os diferentes tratamentos. Como modelo experimental, foram utilizados ratos wistar infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e tratados ou não com melatonina, meloxicam, ou associação de ambos. As células inflamatórias e o parasitismo tecidual cardíaco foram avaliados por meio de técnica histológica. A técnica ELISA foi utilizada para detecção e quantificação de citocinas pró-inflamatórias e modulatórias no miocárdio e nos soros dos animais experimentais. Também foram investigados os níveis de nitrito produzidos por macrófagos e por células cardíacas dos grupos experimentais pela reação de Griess. Os parâmetros foram investigados durante a fase: crônica (90, 120 e 180) dias após a infecção. O estudo poderá contribuir para um melhor entendimento das respostas imunológicas anti-*T. cruzi*, bem como da patogenia da disfunção cardíaca chagásica crônica.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, citocinas, melatonina, meloxicam, Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L.G.R. **Potential therapeutic actions of the melatonin-meloxicam association on the chagasic myocarditis in wistar rats infected with the y strain of *Trypanosoma cruzi*.** 2013. 97f. Thesis (Doctoral). Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The host immune system affected by Chagas disease has been the subject of important research that can promote advances in the understanding the pathogenic mechanisms related to the disease. In the present study, it was investigated the possible beneficial actions of the anti-inflammatory and antioxidant combination therapy (melatonin / meloxicam) on chronic Chagas cardiomyopathy. Some cytokines and other mediators involved in the inflammatory process characteristic of infection were analyzed. In addition, plasma levels of creatine phosphokinase MB (CK-MB), number of inflammatory foci in the cardiac tissue and analysis of the relative weight of the heart were evaluated as predictors of damage reduction in the myocardium after different treatments. As experimental model, we used Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Some groups were untreated and others treated with melatonin, meloxicam, or combination of both. Inflammatory cells and heart tissue parasitism were evaluated by histological technique. Some pro-inflammatory and modulatory cytokines were quantified by ELISA technique in the myocardium and serum from experimental animals. The production of nitrite by macrophages and cardiac cells of the experimental groups was also investigated through Griess reaction. The parameters were observed during the chronic stage: (90, 120, and 180) days after infection. The study may contribute to a better understanding of the anti-*T. cruzi* immunological responses, as well as the pathogenesis of chronic Chagas heart dysfunction.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, cytokines, melatonin, meloxicam, Chronic Chagas Cardiomyopathy.

RESUMEN

OLIVEIRA, L.G.R. **Potenciales acciones terapéuticas de la asociación melatonina-meloxicam en la enfermedad crónica de Chagas en ratas wistar infectadas con la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.** 2013. 97f. Tesis (Doctoral) Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El sistema inmune del huésped afectado por la enfermedad de Chagas ha sido objeto de importantes investigaciones que pueden promover los avances en la comprensión de los mecanismos patogénicos relacionados con la enfermedad. En el presente estudio, se investigó posibles acciones beneficiosas de la terapia de combinación anti-inflamatoria y antioxidante (melatonina / meloxicam) en la cardiopatía chagásica crónica. Se analizaron las citocinas y otros mediadores que participan en el proceso inflamatorio característico de la infección. Además, se evaluaron los niveles plasmáticos de creatina fosfoquinasa MB (CK-MB), el número de focos inflamatorios en el tejido cardíaco y el análisis del peso relativo del corazón como predictores de la reducción del daño en el miocardio después de diferentes tratamientos. Como modelo experimental, hemos utilizado ratas wistar infectadas con la cepa Y de *T. cruzi* y tratadas o no con melatonina, meloxicam, o combinación de ambos. Las células inflamatorias y el parasitismo del corazón se evaluaron por la técnica histológica. La técnica de ELISA se utilizó para detectar y cuantificar citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el miocardio y en el suero de los animales experimentales. También se investigaron los niveles de nitrito producidos por los macrófagos y por las células cardíacas por la reacción de Griess. Los parámetros fueron investigados durante la etapa de: (90, 120, y 180) días después de la infección crónica. El estudio puede contribuir para una mejor comprensión de la inmunológica anti-*T. cruzi*, así como la patogénesis de la disfunción cardíaca crónica de Chagas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, las citoquinas, melatonina, meloxicam, cardiopatía chagásica crónica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de imigrantes que partem da América latina em direção aos países europeus, Austrália, Japão, Estados Unidos e Canadá e estimativa do número de indivíduos infectados nos países não endêmicos	2
Figura 2. Immunopatogênese da forma cardíaca da doença de Chagas	9
Figura 3. Biossíntese de melatonina na glândula pineal.....	12
Figura 4. Efeitos antiinflamatórios de melatonina.....	14
Figura 5. Comparação da eficiência de melatonina na captação de radicais livres de diferentes naturezas. *k – constante da reação de melatonina com diferentes radicais	15
Figura 6. Curso da infecção durante as fases aguda e crônica no modelo experimental de ratos wistar infectados com 3×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	34
Figura 7. A e B - Concentrações séricas de TNF- α e IFN- γ nos animais não infectados sem tratamento (NIST) comparado com as concentrações dos animais infectados sem tratamento (IST). $p < 0,0001$ e $p < 0,05$ respectivamente. C – Atividade de CK-MB nos animais não infectados sem tratamento (NIST) comparado à atividade desta enzima nos animais infectados sem tratamento (IST). $p < 0,0001$	35
Figura 8. A - Aumento relativo do peso cardíaco observado 60 e 90 dias pós-infecção (quadrados e triângulos vermelhos, respectivamente) comparados com ratos não infectados (círculos azuis). B - Análise histopatológica (400 x H&E) mostra um ninho de amastigotas e células inflamatórias mononucleares em tecido cardíaco de animais cronicamente infectados (60 dias pós-infecção).....	36
Figura 9. A, B e C - Níveis de IL-12 a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção).....	37
Figura 10. A, B e C - Níveis de TNF- α a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção).....	39
Figura 11. A, B e C. Níveis de INF- γ a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção).....	41
Figura 12. A, B e C. Níveis de IL-10 a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção).....	43

Figura 13. A, B e C. Níveis de TGF- β a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção).....	45
Figura 14. A, B e C. Níveis de TNF- α a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção)	47
Figura 15. A, B e C. Níveis de IFN- γ a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção)	49
Figura 16. A, B e C. Níveis de IL-10 a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção)	51
Figura 17. A, B e C. Níveis de TGF- β a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção)	53
Figura 18. Níveis de NO $_2^-$ a partir do sobrenadante de cultura de 5×10^6 células peritoneais dos grupos experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós infecção)	55
Figura 19. Níveis de NO $_2^-$ a partir de 100 mg de tecido cardíaco dos grupos experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós infecção)	57
Figura 20. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com <i>T. cruzi</i> em 90, 120 e 180 dias pós-infecção	60
Figura 21. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com <i>T. cruzi</i> em 90, 120 e 180 dias pós-infecção	62
Figura 22. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com <i>T. cruzi</i> em 90, 120 e 180 dias pós-infecção	64
Figura 23. A, B e C. Avaliação dos danos de cardíacos por meio da atividade de CK-MB em 90, 120 e 180 dias pós infecção (dpi) no soro de ratos wistar infectados com 3×10^5 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente 60 até 180 dpi com melatonina, meloxicam ou associação de ambos	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas das constantes (k) de reações.....	15
Tabela 2. Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental (Primeira parte).....	31
Tabela 3. Citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos (Segunda parte).....	32
Tabela 4. Parasitismo tecidual, número de focos inflamatórios, peso cardíaco relativo e níveis de CK-MB após os diferentes tratamentos (Terceira Parte).....	33
Tabela 5. Percentual de redução dos níveis de TNF- α nas diferentes comparações.....	40
Tabela 6. Percentual de redução dos níveis de IFN- γ nas diferentes comparações.....	42
Tabela 7. Percentual de redução dos níveis de TNF- α nas diferentes comparações.....	48
Tabela 8. Percentual de redução dos níveis de IFN- γ para a seguinte comparação.	50
Tabela 9. Percentual de aumento dos níveis de TGF- β para a seguinte comparação.	54
Tabela 10. Percentual de redução dos níveis de NO ₂ ⁻ para a seguinte comparação.	56
Tabela 11. Percentual de redução dos níveis de NO ₂ ⁻ para a seguinte comparação.	58
Tabela 12. Diferenças em porcentagens das da atividade de CK-MB em relação ao grupo IST	67
Tabela 13. Parasitismo cardíaco estudado por técnica de coloração de hematoxilina/eosina	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

CCC – Cardiomiopatia Chagásica Crônica

CK-MB – Creatina Fosfoquinase MB

COX 1– Cíclooxygenase 1

COX 2 – Cíclooxygenase 2

DP – Desvio Padrão

e.p.m – Erro padrão da média

IST – Infectados sem Tratamento

IFN γ – Interferon Gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

iNOS – óxido nítrico síntese induzível

I.p. – Intraperitoneal

IT – Infectados tratados

Mel – Melatonina

Mx – Meloxicam

NEED – N-(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine

NF- $\kappa\beta$ – Fator nuclear $\kappa\beta$

NIST – Não Infectados sem Tratamento

NIT – Não Infectados Tratados

NK – Natural Killer

NO – Óxido Nítrico

NO₂⁻ – Nitrito

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEG 400 – Polietileno Glicol 400

PGE₂ – Prostaglandina E₂

SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

TGF- β – Fator de crescimento transformador-*beta*

Th-1 – T Helper 1

Th-2 – T Helper 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas - Epidemiologia.....	1
1.2 Transmissão	2
1.3 Patogenia	3
1.4 Doença de Chagas – principais citocinas envolvidas na infecção	5
1.5 Aspectos Clínicos da Infecção.....	7
1.6 Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)	8
1.7 Tratamentos disponíveis e novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas	10
2 MELATONINA.....	12
3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES) UTILIZADOS COMO TERAPIA EXPERIMENTAL NA MIOCARDITE CHAGÁSICA E OUTRAS INJÚRIAS CARDÍACAS.....	16
4 OBJETIVOS	18
4.1 Objetivos específicos	18
4.1.1 Caracterização dos animais que desenvolveram Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) – animais infectados e não tratados.....	18
4.1.2 Avaliação da resposta inflamatória após os tratamentos experimentais – melatonina, meloxicam ou melatonina/meloxicam	19
5 JUSTIFICATIVA.....	20
6 MATERIAIS E MÉTODOS	22
6.1 Animais utilizados	22

6.2 Infecção.....	22
6.3 Grupos Experimentais.....	22
6.4 Avaliação da parasitemia sanguínea no curso da infecção para obtenção da curva de parasitemia/sobrevivência do modelo experimental	23
6.5 Dosagens séricas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) para correlação com danos cardíacos.....	23
6.6 Detecção de Creatina Fosfoquinase como fator preditivo da indução de danos cardíacos	24
6.7 Drogas e protocolo de tratamento	24
6.8 Morte dos animais e coleta de sangue.....	25
6.9 Quantificação de Nitrito proveniente de células peritoneais	25
6.10 Peso relativo cardíaco.....	26
6.11 Técnica histológica para contagem de ninhos de amastigotas.....	26
6.12 Contagem de focos inflamatórios.....	27
6.13 Ensaios de Citocinas: TNF- α , IFN- γ , IL12, IL-10 e TGF- β	27
6.14 Nitrito proveniente de células totais do miocárdio.....	28
6.15 Detecção de Creatina Fosfoquinase para avaliação de uma possível redução dos danos cardíacos após os tratamentos	29
6.16 Análises Estatísticas	29
6.17 Desenho experimental (resumo).....	30
6.17.1 Desenho experimental	31
6.17.2 Desenho experimental	32
6.17.3 Desenho experimental	33
7 RESULTADOS	34
7.1 Avaliação da parasitemia sanguínea e taxa de sobrevivência no curso da infecção.....	34
7.2 Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental - Biomarcadores correlacionados com a severidade da Cardiopatia Chagásica Crônica 60 dias após a infecção	35
7.3 Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental - Aumento do peso relativo cardíaco e presença de focos inflamatórios.....	36
7.4 Níveis séricos de citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos	37
7.4.1 Níveis séricos de IL-12.....	37
7.4.2 Níveis séricos de TNF- α	39
7.4.3 Níveis séricos de IFN- γ	41
7.4.4 Níveis séricos de IL-10	43

7.4.5 Níveis séricos de TGF- β	45
7.5 Níveis de citocinas analisadas a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas após os diferentes tratamentos	47
7.5.1 Níveis de TNF- α analisados a partir do extrato cardíaco	47
7.5.2 Níveis de IFN- γ analisados a partir do extrato cardíaco	49
7.5.3 Níveis de IL-10 analisados a partir do extrato cardíaco	51
7.5.4 Níveis de TGF- β analisados a partir do extrato cardíaco	53
7.6 Níveis de nitrito analisados a partir do sobrenadante de cultura de células peritoneais.....	55
7.7 Níveis de nitrito analisados a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas	57
7.8 Modulação das Citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos	59
7.9 Número de focos inflamatórios após os diferentes tratamentos	60
7.9.1 Melatonina	60
7.9.2 Meloxicam	62
7.9.3 Melatonina + Meloxicam.....	64
7.10 Níveis séricos de CK-MB e peso relativo cardíaco	66
7.11 Parasitismo cardíaco.....	68
 8 DISCUSSÃO	 69
 9 CONCLUSÕES	 79
 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 80
 ANEXO 1	 97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas - Epidemiologia

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma antroponose que possui como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Rey, 2001). Ocorre em toda a América Latina, mas as manifestações desta doença e suas características epidemiológicas variam de uma área endêmica para outra. Além disso, existe uma gama de variações na biologia do parasita, na patologia clínica, nos vetores e nos hospedeiros. Como qualquer outra doença parasitária, a doença de Chagas está intimamente relacionada ao desenvolvimento social e econômico (WHO, 2002).

Embora a incidência da doença no continente americano tenha-se reduzido em cerca de 70,0% nos últimos 30 anos, estima-se que, nas Américas Central e do Sul, ainda existam cerca de 8 a 9 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões sob risco de infecção (2010; Moncayo, 2003). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), no Brasil, em 2011, a doença de Chagas representou a quarta causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias e estima-se a existência de três milhões de infectados, sendo a faixa etária acima de 45 anos a mais acometida. A endemia apresenta importante impacto econômico devido às complicações que causa à saúde do ser humano (WHO, 2010; Dias, 2001; Vinhaes & Dias, 2000).

De acordo com (Coura & Vinas, 2010; Ribeiro *et al*, 2012) a doença de Chagas pode ser considerada atualmente um grave problema de saúde global, proliferando-se além das fronteiras geográficas tradicionais devido aos crescentes movimentos

migratórios de pessoas infectadas provenientes de áreas endêmicas em direção a países do continente Europeu, América do Norte e Oceania. De acordo com dados da organização mundial de saúde (WHO, 2010), nestes países existe um risco considerável de transmissão não vetorial, como por exemplo, por transfusão sanguínea, transmissão vertical ou transplante de órgãos. Devido a estes fatos, despertou-se nos últimos anos um maior interesse da comunidade científica sobre a doença, antes considerada como uma enfermidade tropical negligenciada (Coura & Vinas, 2010) figura 1.

Figura 1 - Rotas de imigrantes que partem da América latina em direção aos países europeus, Austrália, Japão, Estados Unidos e Canadá e estimativa do número de indivíduos infectados nos países não endêmicos (Coura & Vinas, 2010).

1.2 Transmissão

Na maioria dos casos, a doença é transmitida ao homem pelo vetor, um inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro. Os vetores do *T. cruzi* pertencem à família Reduviidae e a subfamília Triatominae, sendo os gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* os de maior relevância epidemiológica

(Buscaglia & Di Noia, 2003). Os processos de combate aos triatomíneos, principalmente o *Triatoma infestans* vem se estabelecendo nos países do cone Sul como: Brasil, Uruguai, Chile Argentina, Bolívia e Paraguai. Em 2006, o Brasil recebeu um certificado emitido pela OMS que classifica o país como livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (Schofield *et al*, 2006). Apesar desta importante conquista a transmissão vetorial ainda é considerada a via de infecção responsável pela manutenção da endemia. Isso ocorre devido à capacidade de adaptação domiciliar de outros triatomíneos, como por exemplo, as espécies: *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e em algumas áreas, *P. megistus* (Costa *et al*, 2003). As transmissões pelas vias transfusional e por transplante de órgãos têm levado a contaminação pelo *T. cruzi* a regiões urbanas, principalmente onde não há vigilância adequada nos bancos de sangue e de doação de órgãos (Barcan *et al*, 2005; Leiby *et al*, 1999). Além destas formas de transmissão, as contaminações congênitas, por via oral e por acidentes laboratoriais têm sido descritas como importantes (Moncayo, 2003). Especificamente a via oral de infecção vem ganhando destaque epidemiológico, sobretudo na região amazônica, fato este que pode ser explicado pelo modo de processamento do açaí *in natura* onde o vetor contaminado com *T. cruzi* pode acidentalmente contaminar o suco de açaí, promovendo micro-epidemias pontuais (Barbosa *et al*, 2012).

1.3 Patogenia

Está bem estabelecido que após a invasão das células do hospedeiro pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, este se diferencia em formas amastigotas e se multiplica criando pseudocistos que se rompem dando origem a uma reação

inflamatória e posterior cicatrização com formação de tecido fibroso. Por meio da ruptura dos pseudocistos, novas formas tripomastigotas são liberadas e estas por sua vez, passam a circular no organismo e invadir novas células do hospedeiro. O ciclo se repete gerando novas lesões em diferentes sítios do organismo do hospedeiro infectado (Chagas, 1911).

Com relação aos mecanismos que explicam a patogenia da doença, estudos mais recentes têm revelado a ocorrência de uma imunossupressão com redução nas respostas linfoproliferativas para antígenos do parasito durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, (Pinge-Filho *et al*, 1999; Reed *et al*, 1977). A diminuição da produção de IL-2/IL-2r, (Rottenberg *et al*, 1989; Tarleton, 1988), apoptose (Freire-de-Lima *et al*, 2000) e o aumento da produção de óxido nítrico e da síntese de prostaglandinas (Borges *et al*, 1998; Pinge-Filho *et al*, 1999), têm também sido citados como mecanismos supressores envolvidos na fase aguda da doença de Chagas.

A fase crônica da doença é caracterizada por infiltrado inflamatório multifocal, fibrose em graus variados, baixo parasitismo tecidual e baixa ou indetectável parasitemia sanguínea. Atualmente, as refinadas técnicas moleculares e de imunohistoquímica têm demonstrado que a persistência de *T. cruzi* ou de seus antígenos ao longo do curso da infecção seria uma importante característica da fase crônica da doença de Chagas (Fuenmayor *et al*, 2005; Nagajyothi *et al*, 2012).

De acordo com a hipótese de (Koberle, 1961) distúrbios de condução cardíaca, do megaesôfago e do megacólon na doença de Chagas são consequências da desnervação do sistema autônomo parassimpático. (Prata, 2001), (Teixeira *et al*, 2006) e outros consideram que a destruição neuronal no coração, esôfago cólon e outros órgãos pode ser explicada pela reação inflamatória local e

por mecanismos imunológicos que resultariam na cardiomiopatia, megaesôfago, megacólon e outros megas característicos da doença de Chagas. Além disso, alguns autores propõem um mecanismo que envolveria autoimunidade do hospedeiro, sendo este mecanismo mais complexo e controverso (Cunha-Neto *et al*, 1996; Girones *et al*, 2007; Santos-Buch & Teixeira, 1974).

1.4 Doença de Chagas – principais citocinas envolvidas na infecção

O controle da replicação parasitária durante a infecção por *T. cruzi* tem sido bem esclarecido por meio de vários estudos que enfatizam as defesas imunológicas do hospedeiro. Tipicamente, macrófagos secretam IL-12 em resposta a infecção por *T. cruzi* ativando células natural killer (NK) e linfócitos. A ativação destas células resulta na produção de IFN- γ que atua diretamente sobre macrófagos, capacitando-os para atividade microbida mediada por NO (Gazzinelli *et al*, 1992). A citocina pró-inflamatória TNF- α , produzida também durante a infecção por *T. cruzi* participa dessa interação de forma sinérgica tanto como IL-12 e IFN- γ (Oswald *et al*, 1992).

É bem conhecido que o Óxido Nítrico (NO) gerado a partir da atividade enzimática de óxido nítrico síntese induzível (iNOS), pode ser considerado como o mediador chave nos processos inflamatórios, sendo reconhecido como a principal molécula efetora capaz de controlar a replicação intracelular de *T. cruzi* (Gazzinelli *et al*, 1992; Silva *et al*, 2003). Estudos têm mostrado que, de maneira análoga a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *T. cruzi*, cardiomiócitos também são capazes de produzir NO que participa da atividade tripanosomicida no tecido cardíaco (Machado *et al*, 2000).

Por outro lado, níveis aumentados de NO também podem ser responsáveis por danos cardíacos na doença de Chagas e outras doenças inflamatórias (Sittipunt *et al*, 2001). O aumento exacerbado desta molécula pode estar associado com sérias disfunções cardíacas (Joe *et al*, 1998) e importantes danos no tecido miocárdico (Pinsky *et al*, 1999).

Na infecção crônica humana, o perfil de citocinas permanece alterado, com altos níveis de TNF- α , podendo esta citocina estar relacionada a uma progressão da (CCC) (Ferreira *et al*, 2003). Em um estudo recente, (Roman-Campos *et al*, 2009) demonstraram que TNF- α e IFN- γ poderiam interferir nas mudanças de contratilidade celular cardíaca em modelos murinos cronicamente infectados por *T. cruzi*. Outros autores demonstraram efeitos benéficos após bloqueio da síntese de TNF- α , com considerável redução dos danos cardíacos (Kroll-Palhares *et al*, 2008).

Sabe-se que as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 medeiam à suscetibilidade a infecção por *T. cruzi*. Por outro lado, IL-10 pode exercer um papel preventivo em relação à hiperatividade da resposta imune e imunopatologia dos órgãos associadas à infecção chagásica (Holscher *et al*, 2000; Hunter *et al*, 1997). De maneira semelhante a IL-10, o fator transformador de crescimento - β (TGF- β) pode ser considerado como um importante regulador da inflamação, mantendo o balanço entre o controle de organismos infecciosos, bem como, prevenindo patologias mediadas por uma resposta imune exacerbada (Omer *et al*, 2000). TGF- β tem sido associado à supressão das atividades tripanosomicidas por macrófagos ativados por IFN- γ em estudos *in vitro* (Gazzinelli *et al*, 1992; Silva *et al*, 1991), porém, outros autores enfatizam a importância de TGF- β como regulador da função contrátil do coração (Roberts *et al*, 1992a), sendo parte desta regulação, demonstrada através de efeitos antagonistas na produção de NO (Roberts *et al*, 1992b).

1.5 Aspectos Clínicos da Infecção

A doença de Chagas ocorre em duas fases clínicas distintas, sendo a fase aguda caracterizada por inflamação focal ou difusa que pode ser localizada em órgãos distintos, com maior gravidade no coração. A fase crônica é marcada por uma reação inflamatória com posterior processo de fibrose no músculo cardíaco, podendo acometer também, órgãos como esôfago e intestino (Lescure *et al*, 2010).

Na fase aguda da infecção, em alguns casos, o indivíduo infectado pode apresentar, após 8 a 10 dias da penetração do parasito, manifestações clínicas como sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e Chagoma de inoculação), adenopatia generalizada, edema e uma doença febril inespecífica com hepatoesplenomegalia.

Casos mais graves geralmente estão associados a crianças menores de dois anos que podem apresentar severa miocardite e meningoencefalites, podendo até provocar a morte em 5-10% dos casos não tratados. Na maioria dos pacientes a fase aguda é assintomática (90% dos casos) e os indivíduos que sobrevivem a esta fase evoluem para a fase crônica da doença. Boa parte dos indivíduos cronicamente infectados (50-70%) permanece por longos períodos sem apresentar manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas, de acometimento cardíaco e ou digestivo. Esta condição pode ser denominada de forma indeterminada da doença de Chagas. (Prata, 2001; Rassi *et al*, 2010)

Na fase crônica os pacientes podem progredir para formas sintomáticas que são caracterizadas pelo comprometimento funcional do coração, esôfago e colón ou a combinação de alterações nesses órgãos, resultando em três principais formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (Marin-Neto *et al*, 2007; Prata, 2001).

1.6 Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) pode ser considerada como a principal causa de morte e incapacidade nos indivíduos acometidos pela doença de Chagas. Em torno de 30-40% dos pacientes chagásicos desenvolvem miocardite crônica com proeminente fibrose e disfunção cardíaca (Higuchi *et al*, 2003; Marin-Neto *et al*, 2008).

As alterações fisiológicas da CCC englobam: disfunção sinusal, bloqueios atrioventriculares e intraventriculares variados, arritmias ventriculares por reentrada, e aneurismas ventriculares que predispõem a complicações tromboembólicas. Com o progressivo dano miocárdico pode ocorrer insuficiência cardíaca de padrão cardiomiopático dilatado e caracteristicamente biventricular (Andrade *et al*, 2011). Além disso, a fisiopatologia da CCC se expressa por alterações inflamatórias, degenerativas e fibróticas que predispõem infarto do miocárdio (Carod-Artal & Gascon, 2010; Mancuso *et al*, 2011).

A participação da resposta imunológica e da presença do parasito na determinação da CCC foi demonstrada em 2003 por (Higuchi *et al*, 2003). Estes autores sugeriram que a interação parasito/hospedeiro durante a fase aguda seria essencial para determinar o curso evolutivo da CCC e outras condições patológicas da fase crônica da doença. Os pacientes que evoluem para a forma indeterminada da doença seriam considerados capazes de desenvolver uma resposta imune adequada ao parasito. Por outro lado, uma resposta imune ineficaz e/ou uma alta parasitemia inicial conduziria uma resposta inflamatória permanente e progressão para as formas cardíacas crônicas graves da doença.

Em um estudo recente, (Gutierrez *et al*, 2009) revisaram a participação do parasito e caracterizaram alguns dos principais componentes do sistema imune envolvidos no processo inflamatório durante as miocardites chagásicas aguda e crônica figura 2.

Figura 2 – Imunopatogênese da forma cardíaca da doença de Chagas. O dano tecidual cardíaco começa com a multiplicação de *Trypanosoma cruzi*, que conduz a destruição dos cardiomiócitos (I). Inicia-se uma resposta imune específica contra o parasita e contra os componentes celulares resultantes do rompimento dos cardiomiócitos (I). Ocorre uma mimetização molecular entre antígenos do parasito e do hospedeiro, acarretando a formação de auto-anticorpos (II e III) além de células T autoreativas (IV). Os auto-anticorpos podem gerar lesões mediadas pela atividade do complemento (II) e opsonizar o tecido para ativação de macrófagos (III). Células T CD8+ autoreativas reconhecem antígenos *self* e destroem o tecido cardíaco (IV). Linfócitos T citolíticos não apenas destroem as células infectadas, mas também contribuem para a destruição de células adjacentes (VI). A injúria tecidual dispara a produção de TNF- α resultante da produção de óxido nítrico. A infecção por *T. cruzi* também induz a produção de óxido nítrico diretamente, o qual é responsável pela geração de extensos danos cardíacos derivados do estresse oxidativo (V). O processo imunológico continua durante a fase crônica da infecção. Apesar dos baixos níveis de parasitas neste estágio, pequenos e progressivos focos inflamatórios intrafasciculares continuam se desenvolvendo por anos. O processo finaliza-se com a formação de tecido fibrótico e com o desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada (Gutierrez *et al*, 2009).

Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que determinam os danos cardíacos pode ser considerada como pré-requisito para o desenvolvimento de novas terapias para o controle da inflamação e para restaurar as funções

cardíacas sem prejudicar o controle da replicação parasitária (Lannes-Vieira *et al*, 2009; Medeiros *et al*, 2009).

1.7 Tratamentos disponíveis e novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas

São apenas duas as drogas tripanosomicidas disponíveis no mercado, o nitrofurano (Nifurtimox®) e o nitroimidazol (Benzonidazol®). Ambas as substâncias são efetivas na infecção aguda (particularmente na doença de Chagas congênita), na infecção reativada (no caso de imunossupressão) e na fase crônica precoce da infecção (Carlier *et al*, 2011; Urbina, 2010). A eficácia destas drogas diminui na fase crônica tardia da doença, embora tenha sido relatado que benzonidazol pode prevenir a progressão das lesões cardíacas quando administrado em pacientes cronicamente infectados (Viotti *et al*, 2006).

A discussão sobre novas terapias anti-*T. cruzi* vem alcançando as principais revistas científicas (Bern, 2011; Clayton, 2010) ao mesmo tempo em que novos estudos vêm reportando a necessidade de tratamento e monitoramento da parasitemia em pacientes cardiopatas crônicos (Marin-Neto *et al*, 2008; Moreira *et al*, 2013). Estratégias terapêuticas baseadas na combinação de drogas anti-parasitárias tem sido adotadas em doenças como Leishmaniose (van Griensven *et al*, 2010), Malária (Kurth *et al*, 2011) e doença de Chagas (Cencig *et al*, 2012). Além disso, o uso de drogas anti-parasitárias combinadas com drogas imunomoduladoras têm despertado a atenção dos pesquisadores, sendo este tipo de estratégia utilizada recentemente no tratamento da Malária (Muniz-Junqueira, 2007) e doença de Chagas (Santos *et al*, 2010; Wen *et al*, 2010b).

O desafio no tratamento da doença de Chagas crônica é devido a limitações das drogas disponíveis no mercado (Benzonidazol® e Nifurtimox®) e também devido à falta de marcadores biológicos específicos para uma avaliação da eficácia das drogas anti-*T cruzi*, bem como da resposta clínica dos pacientes chagásicos (Pinazo *et al*, 2010). Com auxílio de técnicas imunológicas, alguns autores têm proposto biomarcadores que poderiam suprir esta falta, sendo citadas citocinas pró-inflamatórias plasmáticas como TNF- α e INF- γ que correlatam com a severidade da doença cardíaca (Cunha-Neto *et al*, 2009; Talvani *et al*, 2004). Os níveis plasmáticos de outros biomarcadores, tais como troponina T cardíaca (Saravia *et al*, 2011) e CK-MB (de Souza *et al*, 2000) também têm sido utilizados com o mesmo propósito.

2 MELATONINA

Classificada como um neurohormônio, N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) é um derivado do aminoácido essencial triptofano, sendo isolada pela primeira vez, a partir da glândula pineal de bovinos (Lerner *et al*, 1960).

A produção de melatonina pela glândula pineal é caracterizada por um ritmo circadiano, com baixos níveis durante o dia e níveis altos durante a noite (Claustrat *et al*, 2005). De acordo com (Bagnaresi *et al*, 2012) a biossíntese de melatonina na glândula pineal ocorre quando o aminoácido triptofano é convertido nos pinealócitos a 5-hidroxitriptofano. Este produto é então descarboxilado para serotonina, ou 5-hidroxitriptamina. Serotonina é então N-acetilada para N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Esta enzima é especialmente ativa na glândula pineal à noite ou durante períodos de escuridão. Em períodos escuros, NAS é metilada por hidroxi-indol-O-metiltransferase, gerando N-acetil metoxitriptamina, comumente conhecida como melatonina, a qual entra na corrente sanguínea. Figura 3

Figura 3 - Biossíntese de melatonina na glândula pineal (Bagnaresi *et al*, 2012).

Correlações diretas entre a produção de melatonina e variações circadianas e sazonais no sistema imune têm sido observadas (Nelson & Drazen, 2000). Dados *in vivo* e *in vitro* confirmam as relações entre a melatonina e o sistema imune, evidenciadas por: 1 - Efeito da pinealectomia em modelos experimentais, 2 - Alterações de parâmetros imunológicos decorrentes da administração *in vivo* de melatonina, 3 - Presença de receptores específicos em células do sistema imune e 4 - Regulação da atividade celular imune pela melatonina em estudos *in vitro* (Guerrero & Reiter, 2002).

Estudos demonstram que a pinealectomia promove desorganização tímica (Jankovic *et al*, 1970), depressão na resposta imune humoral e celular (Maestroni *et al*, 1986), além de inibição da síntese de IL-2 e da atividade das células natural killer em roedores (del Gobbo *et al*, 1989). A administração *in vivo* de melatonina causa importantes alterações nos parâmetros imunológicos de mamíferos, incluindo humanos, demonstrando um efeito imunoestimulatório do neuro-hormônio (Carrillo-Vico *et al*, 2013). De acordo com (Raghavendra *et al*, 2001; Shaji *et al*, 1998) melatonina pode aumentar a atividade de células natural killer, bem como as respostas imunológicas mediadas por linfócitos Th2. Além disso, melatonina pode regular a secreção de citocinas importantes na fase crônica da infecção por *T. cruzi*, tais como: IL-2/IL10 regulando também a proliferação das subpopulações celulares (CD3+CD4+/CD3+CD8+) (Brazao *et al*, 2011).

Estudos pioneiros dos efeitos de melatonina na fase aguda da doença de Chagas mostraram diminuição da parasitemia sanguínea, modulação de citocinas importantes na proteção do hospedeiro e diminuição da produção de óxido nítrico durante infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi* (Oliveira *et al*, 2010; Santello *et al*, 2007). Em um recente *review*, (Bagnaresi *et al*, 2012) relataram o papel da

melatonina no sistema imune de hospedeiros parasitados, e na biologia de protozoários como: *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

Além de efeitos imunomodulatórios demonstrados por (Carrillo-Vico *et al*, 2013; Cernysiov *et al*, 2010; Guerrero & Reiter, 2002), melatonina apresenta atividades anti-inflamatórias (Chahbouni *et al*, 2010; Jung *et al*, 2010; Szczepanik, 2007). Um dos possíveis mecanismos desta atividade pode ser explicado pela capacidade deste neuro-hormônio de impedir a translocação de NF- κ B para o núcleo celular. Melatonina pode reduzir a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e outros mediadores da inflamação, incluindo as enzimas COX, iNOS e moléculas de adesão (Chuang *et al*, 1996; Szczepanik, 2007) figura 4.

Figura 4 - Efeitos antiinflamatórios de melatonina

Melatonina inibe a ligação de NF κ B, prevenindo sua translocação para o núcleo. Tal mecanismo reduziria a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, melatonina inibe a expressão de moléculas de adesão e suprime a síntese de enzimas que geram prostaglandinas e espécies reativas do oxigênio (ex: COX e iNOS) (Szczepanik, 2007).

Estudos recentes utilizando vários modelos experimentais têm demonstrado que melatonina poderia prevenir danos cardíacos de diversas etiologias (Dominguez-Rodriguez *et al*, 2010; Lavi & Lavi, 2011; Nduhirabandi *et al*, 2011; Zaslavskaja *et al*, 2010). Outros autores demonstraram que melatonina reduziu o

peso cardíaco relativo em um modelo de hipertrofia cardíaca via inibição de danos oxidativos (Ghosh *et al*, 2007).

Os efeitos antioxidantes de melatonina têm sido relatados (Beni *et al*, 2003; Galano *et al*, 2011; Storr *et al*, 2002), sendo demonstrado por (Uz & Manev, 1998; Zhang *et al*, 1999) que o neuro-hormônio pode atuar indiretamente na regulação de enzimas pró-oxidativas, em particular 5 e 12 lipoxigenases e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Gilad *et al*, 1998; Pozo *et al*, 1994; Storr *et al*, 2002). Além disso, (Galano *et al*, 2011) relatam um grande número de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) que podem estar suscetíveis às ações antioxidantes de melatonina. Figura 5 e tabela 1.

Tabela 1. Taxas das constantes (k) de Reações de melatonina com diferentes radicais (Galano *et al*, 2011)

Radical	k (per M/s)	Approach	Main solvent	Ref.
*OH	2.7×10^{10}	Experimental	Water	[149]
*OH	6×10^{10}	Experimental	Water	[267]
*OH	4×10^{10}	Experimental	Water	[268]
*OH	1.3×10^{10}	Experimental	Water	[150]
*OH	1.2×10^{10}	Experimental	Water	[255]
*OH	1.85×10^{10}	Theoretical	Water	[105]
*OH	1.25×10^{10}	Experimental	Mix	[175]
*OH	2.23×10^{10}	Theoretical	Benzene	[105]
*OCCl ₃	6×10^8	Experimental	Mix	[175]
*OCCl ₃	2.7×10^8	Experimental	Mix	[272]
*OCCl ₃	1.40×10^9	Theoretical	Water	[105]
*OCCl ₃	4.40×10^8	Theoretical	Benzene	[105]
*OOL	$\sim 10^{-2}$	Theoretical	Water	[105]
*OOL	$\sim 2-5$	Theoretical	Benzene	[105]
t-ButO*	3.4×10^7	Experimental	Acetonitrile	[152]
t-ButO*	2.8×10^9	Experimental	Mix	[175]
di-t-CumO*	6.7×10^7	Experimental	Acetonitrile	[152]
O ₂ ^{•-}	$< 1.0 \times 10^4$	Experimental	Water	[150]
*N ₃	7.5×10^9	Experimental	Mix	[175]
*N ₃	9.8×10^9	Experimental	Water	[150]
*NO	3×10^7	Experimental	Mix	[175]
*NO ₂	3.7×10^6	Experimental	Mix	[175]

Figura 5. Comparação da eficiência de melatonina na captação de radicais livres de diferentes naturezas. *k – constante da reação de melatonina com diferentes radicais (GALANO ET AL, 2011)

3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS (AINES) UTILIZADOS COMO TERAPIA EXPERIMENTAL NA MIOCARDITE CHAGÁSICA E OUTRAS INJÚRIAS CARDÍACAS

Meloxicam, um inibidor seletivo de ciclooxigenase 2 (COX-2) (Engelhardt *et al*, 1996) e salicilato de sódio, um inibidor inespecífico das ciclooxigenases 1 e 2 (Mitchell *et al*, 1997) têm sido utilizados em terapias experimentais nas fases aguda (Abdalla *et al*, 2008; Michelin *et al*, 2005; Oliveira *et al*, 2010) e crônica da doença de Chagas (Molina-Berrios *et al*, 2013; Mukherjee *et al*, 2011).

De acordo com (Abdalla *et al*, 2008) o tratamento com meloxicam e outros inibidores de COX-2 pode resultar numa diminuição dos danos cardíacos observados durante a fase aguda da infecção chagásica experimental. Corroborando com estes resultados, um estudo publicado na revista especializada em cardiologia *circulation*, aponta a redução de eventos cardiovasculares, principalmente aterosclerose, após tratamento com inibidores de COX-2 (Pitt *et al*, 2002). Outros autores demonstram uma proteção no tecido miocárdico após tratamento com inibidores seletivos de COX-2 em modelo experimental de isquemia aguda (Carnieto *et al*, 2009). Além disso, tem sido reportado que a secreção de fibrinogênio, um fator de risco para doenças cardiovasculares, é mediada pela biossíntese de prostaglandinas. De acordo com (Moya *et al*, 2002) meloxicam foi capaz de normalizar a hiperfibrinogenemia em ratos submetidos a injúrias cardíacas por meio da redução da formação de prostaglandinas via inibição seletiva da enzima COX-2.

O principal mecanismo de ação dos AINES é evidenciado pela inibição das isoformas de COX, por outro lado, conforme revisado por (Tegeder *et al*, 2001),

estudos têm mostrado que estes anti-inflamatórios podem atuar também na modulação da expressão de citocinas através da inibição de fatores de transcrição, tais como AP-1 e Erk. Reforçando estes resultados, (Kopp & Ghosh, 1994) sugeriram que salicilato de sódio poderia atuar inibindo o fator de transcrição NF- κ B que está envolvido na síntese de TNF- α e IFN- γ .

Conforme demonstrado por (Cho, 2007), diferentes AINES são capazes de produzir distintos efeitos imunoestimulatórios *in vitro*, sendo evidenciadas alterações na resposta imune mediada por células T e por macrófagos, tais como produção de TNF- α , óxido nítrico (NO), adesão celular, fagocitose e linfoproliferação. Corroborando com estes dados, nosso grupo de pesquisa observou mudanças no perfil de citocinas importantes na proteção do hospedeiro após infecção experimental por *T. cruzi* durante a fase aguda da doença de Chagas (Oliveira *et al*, 2010).

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos anti-inflamatórios de melatonina, meloxicam e associação de ambos e seus potenciais benefícios em relação ao dano tecidual cardíaco associado à infecção crônica da doença de Chagas.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Caracterização dos animais que desenvolveram Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC) – animais infectados e não tratados

- Como fatores preditivos da indução dos danos cardíacos foram adotados os seguintes procedimentos:

1 – Infecção com alta carga de parasitos - 3×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (Martinelli *et al*, 2006; Novaes *et al*, 2013).

2 – Obtenção da curva de parasitemia/sobrevivência.

3 – Após 60 dias de infecção foram investigados no soro dos animais, os biomarcadores pró-inflamatórios TNF- α , INF- γ (Ribeiro *et al*, 2012) e níveis séricos de Creatina Fosfoquinase MB (CK-MB) constantemente correlacionados com danos cardíacos (de Souza *et al*, 2000).

4 – Análise das diferenças dos pesos cardíacos dos animais infectados comparados com os controles.

5 – Avaliação da presença ou não de focos inflamatórios e ninhos de amastigotas por técnica histológica no tecido cardíaco dos animais infectados.

4.1.2 Avaliação da resposta inflamatória após os tratamentos experimentais – melatonina, meloxicam ou melatonina/meloxicam

- Avaliação da resposta inflamatória sistêmica curso da infecção crônica por meio dos seguintes parâmetros:

1 – Análise da produção de citocinas pró- inflamatórias (TNF- α , INF- γ e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) no soro dos animais tratados, bem como dos controles.

2 – Análise das concentrações de Nitrito (NO₂⁻), a partir do sobrenadante de macrófagos peritoneais dos animais tratados e seus controles.

- Avaliação da resposta inflamatória no tecido cardíaco dos animais cronicamente infectados por meio dos seguintes parâmetros:

1 – Análise da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais tratados, bem como dos controles.

2 – Análise das concentrações de Nitrito (NO₂⁻) a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas nos animais tratados e controles.

3 – Estimativa do número de focos inflamatórios, peso cardíaco relativo e parasitismo no tecido cardíaco dos animais experimentais.

4 – Detecção de Creatina Fosfoquinase MB (CK-MB) [#].

[#] Quantificado a partir do soro dos animais para estimativa da redução do processo inflamatório cardíaco após os diferentes tratamentos.

5 JUSTIFICATIVA

Apesar da alta taxa de morbidade e mortalidade da doença de Chagas, o desenvolvimento de novos quimioterápicos continua não sendo atrativo do ponto de vista econômico para maioria das companhias farmacêuticas (Villalta *et al*, 2013). No meio científico, dúvidas a respeito da etiologia da doença crônica, considerada por alguns autores como autoimune e por outros, infecciosa, foram um dos obstáculos para o desenvolvimento de fármacos específicos anti-*T. cruzi* (Urbina, 2009). Além disso, as drogas disponíveis para o tratamento da doença, Nifurtimox® e Benzonidazol® possuem eficácia variável, devem ser administradas em longos períodos e podem causar sérios efeitos colaterais como anorexia, náuseas, vômitos, mialgia, insônia, dermatite alérgica e parestesia (Bern, 2011).

A discussão sobre novas terapias anti-*T. cruzi* vem alcançando as principais revistas científicas (Bern, 2011; Clayton, 2010), ao mesmo tempo em que novos estudos vêm reportando a necessidade de tratamento e monitoramento da parasitemia em doentes cardiopatas crônicos (Marin-Neto *et al*, 2008; Moreira *et al*, 2013). Estes fatos podem ser comprovados pela crescente mobilização de recursos financeiros para as pesquisas relacionadas ao diagnóstico, novos tratamentos e triagens randomizadas dos pacientes chagásicos. Neste sentido, estabeleceram-se prioridades no meio científico com objetivo de criar novas perspectivas para a cura definitiva da doença de Chagas (Lescure *et al*, 2010).

Na linha de investigação de novas estratégias de tratamento para esta doença, nosso grupo de pesquisa demonstrou resultados promissores relacionados ao controle da parasitemia que corroboram com uma modulação de citocinas

importantes para a proteção do hospedeiro infectado por *Trypanosoma cruzi* (Brazao *et al*, 2011; Kuehn *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010).

Após os diferentes tratamentos realizados neste estudo, foi possível definir um perfil detalhado dos níveis de citocinas e outros mediadores inflamatórios envolvidos na resposta imune sistêmica e localizada no músculo cardíaco. Verificamos efeitos anti-inflamatórios de melatonina e meloxicam e sugerimos também, mecanismos que explicariam a ação imunomoduladora de ambas as substâncias, contribuindo com dados que poderão incrementar a literatura científica atual no contexto das terapias baseadas na associação de substâncias contra a doença de Chagas, especificamente na Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos wistar machos pesando entre 90-100g, provenientes de uma colônia mantida nos biotérios da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração e divididos em oito grupos com ($n = 5$) que foram eutanasiados em três dias diferentes após o inóculo infectante (n total = 180).

6.2 Infecção

Os ratos foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com 3.0×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1953), de acordo com trabalhos prévios (Martinelli *et al*, 2006; Novaes *et al*, 2013).

6.3 Grupos Experimentais

Grupo Infectado pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>		Grupos controle	
Infectados Controle - (IST) $n = 5$		Não Infectados Controle - (NIST) $n = 5$	
Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel) $n = 5$		Não Infectados Tratados com Melatonina - NIT (Mel) $n = 5$	
Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx) $n = 5$		Não Infectados Tratados com Meloxicam - NIT (Mx) $n = 5$	
Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam – IT (Mel + Mx) $n = 5$		Não Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam – NIT (Mel + Mx) $n = 5$	
Dias de experimento	90 dias após o inóculo infectante	120 dias após o inóculo infectante	180 dias após o inóculo infectante

6.4 Avaliação da parasitemia sanguínea no curso da infecção para obtenção da curva de parasitemia/sobrevivência do modelo experimental

A parasitemia foi avaliada pela presença de tripomastigotas no sangue periférico coletado da calda dos animais como descrito por (Brener, 1962).

6.5 Dosagens séricas de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) para correlação com danos cardíacos (Ferreira *et al*, 2003; Ribeiro *et al*, 2012; Roman-Campos *et al*, 2009)

Os níveis de citocinas do soro dos animais foram obtidos 60 dias pós infecção, sendo estes, detectados por técnica de imunoensaio enzimático quantitativo (ELISA) R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Foram construídas curvas padrão para cada ensaio utilizando-se quantidades conhecidas das respectivas citocinas recombinantes de acordo com as instruções do kit utilizado. Todas as amostras foram processadas individualmente e analisadas em duplicata, sendo a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. As absorbâncias detectadas referentes a cada citocina foram correlacionadas aos valores de absorbância obtidos na curva padrão e as concentrações das mesmas; calculadas por interpolação através do software estatístico Prisma. Utilizou-se regressão não linear, sendo as concentrações calculadas a partir de uma equação polinomial de quarta ordem, de acordo com o fabricante. O limite de detecção de ambas as citocinas, nas condições de nossos ensaios está indicado nos parênteses: INF- γ e TNF- α (12,5 pg/mL).

6.6 Detecção de Creatina Fosfoquinase como fator preditivo da indução de danos cardíacos

A atividade de CK-MB foi mensurada 60 dias após a infecção com uso do kit comercial Granutest (Merk, Darmstadt, Alemanha). A incubação das amostras de plasma com o substrato causou um aumento a concentração de NADPH, sendo diretamente este proporcional à atividade da enzima na amostra. O volume de plasma escolhido foi de 5 µl. Para manter a proporção recomendada pelo fabricante, 125 µl do reagente (substrato) foi utilizado. Os experimentos foram feitos em triplicata em microplacas de 96 poços de fundo em U. Após 5 minutos de reação, a absorbância foi lida a cada minuto utilizando-se um filtro de 340 nm. Os resultados foram expressos em $\Delta DO/\text{min}$. Uma média das primeiras seis leituras foi usada para determinação de CK-MB (de Souza *et al*, 2000).

6.7 Drogas e protocolo de tratamento

Após diversos testes de solubilidade com diferentes solventes, optamos por utilizar Polietileno glicol 400 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). PEG 400 tem sido utilizado para aumentar as características de dissolução de compostos com baixa solubilidade aquosa (Miralles *et al*, 1982). Além disso, a escolha do veículo ideal de dissolução para os experimentos foi baseada na boa solubilidade simultânea dos dois compostos utilizados no estudo (melatonina e meloxicam), características não tóxicas e não irritantes dos polietileno glicóis (Smyth *et al*, 1950) e solubilidade destes em água.

Melatonina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi dissolvida em PEG-400 e uma quantidade igual de volume de água destilada foi adicionada para diminuir a viscosidade do veículo. A mistura 1:1 de PEG 400 e H₂O foi administrada a uma dose de 50 mg/kg/peso, via oral nos grupos de animais estudados. A dose foi baseada em estudos prévios (Cuzzocrea *et al*, 1999).

Meloxicam (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi dissolvido no mesmo veículo e também administrado após mistura de água destilada - 1:1 PEG 400 e H₂O por via oral a uma dose de 0,5 mg/kg/peso. A dose foi baseada em estudos anteriores, sendo considerada a ausência de lesões gástricas (Agha *et al*, 1999) e ótima tolerância em humanos, não alterando por si só, as concentrações séricas de CK-MB (Narjes *et al*, 1996).

O tratamento foi realizado pela manhã, durante o período que compreende o intervalo de 60 - 180 dias pós-infecção. Cada animal recebeu 250 µL das soluções contendo melatonina ou meloxicam.

6.8 Morte dos animais e coleta de sangue

Os animais foram mortos, após anestesia com Tribomoetanol 2,5%, por decapitação. A eutanásia foi realizada por decapitação para evitar que outras manipulações aumentem o efeito do estresse e possam interferir nos parâmetros analisados. Após a morte dos animais, foram coletados cerca de 2,0 ml de sangue em tubo Falcon contendo 200µl de heparina sódica, para obtenção de plasma e posterior dosagem de CK-MB. O mesmo procedimento foi adotado para dosagem das citocinas séricas, porém sem heparina sódica. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo comitê de ética local, número nº 09.1.1299.53.0

6.9 Quantificação de Nitrito proveniente de células peritoneais

Células peritoneais foram obtidas após a injeção de 10 mL de meio RPMI 1640 (Cultlab, Campinas, Brasil) na cavidade peritoneal dos animais utilizados no

estudo. Estas células foram centrifugadas por 15 minutos e o pellet foi resuspendido em meio RPMI 1640 completo e, posteriormente, diluído em solução de Turkey. O número de células foi acertado para uma concentração de 5×10^6 células/mL utilizando-se câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. A quantidade de nitrito acumulada nos sobrenadantes das culturas de células peritoneais foi determinada por método espectrofotométrico, utilizando-se o reagente de Griess. As absorbâncias foram lidas a 540 nm e a concentração de nitrito foi obtida por comparação com uma curva padrão construída por diluições seriadas de nitrito de sódio que variavam de 100 a 1,56 µM (Ding *et al*, 1988). O reagente de Griess foi preparado pela mistura de volumes iguais de 1% de sulfanilamida em 5% de H₂PO₄ e 0,1% de N-(1-Naphthyl)ethyl-enedinamine – NEED. Os dados foram expressos em µM, sendo a concentração mínima detectável de 1,56 µM.

6.10 Peso relativo cardíaco

Os corações dos animais foram pesados logo após a eutanásia destes em cada dia de experimento e o peso relativo de cada órgão foi calculado pela fórmula: peso do órgão (mg) / peso corporal (g) (Lannes-Vieira *et al*, 2009).

6.11 Técnica histológica para contagem de ninhos de amastigotas

Em cada dia do experimento, foram coletados fragmentos dos corações dos animais utilizados no estudo. Os fragmentos dos órgãos foram lavados em solução fisiológica 0,9%, fixados em Formol 10% tamponado e incluídos em parafina. Foram

confeccionados cortes histológicos de 6 μm corados por Hematoxilina-Eosina. A montagem em laminais foi realizada com intervalo de 70 μm , para evitar a análise de um mesmo ninho com formas amastigotas de *T. cruzi*. O grau de parasitismo foi estimado através da quantificação do número de ninhos observados em 50 campos microscópicos (400x), sendo considerados todos os ninhos encontrados em cada campo (Castro & Brener, 1985). Os dados de cada grupo foram apresentados como médias e desvios padrão para cinco animais.

6.12 Contagem de focos inflamatórios

O mesmo procedimento acima foi adotado para obtenção das lâminas histopatológicas. Os infiltrados inflamatórios foram considerados presentes quando foram detectados 20 leucócitos ou mais em cada foco inflamatório. O total de focos inflamatórios foi contado em 50 campos microscópicos com aumento de 400x por cada secção do tecido cardíaco. Três secções foram contadas para cada animal e os dados individuais foram determinados pelo resultado da média dos três cortes. Os dados de cada grupo foram apresentados como médias e desvios padrão para cinco animais (Talvani *et al*, 2000).

6.13 Ensaios de Citocinas: TNF- α , IFN- γ , IL12, IL-10 e TGF- β

Os níveis de citocinas do soro e do extrato de coração (cada fragmento – 100 mg de tecido) dos animais foram obtidos 90, 120 e 180 dias após a infecção, sendo estes, detectados por técnica de imunoensaio enzimático quantitativo (ELISA) R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Foram construídas curvas padrão para cada

ensaio utilizando-se quantidades conhecidas das respectivas citocinas recombinantes de acordo com as instruções do kit utilizado. Todas as amostras foram processadas individualmente e analisadas em duplicata, sendo a leitura feita em leitor de ELISA a 450 nm. As absorbâncias detectadas referentes a cada citocina foram correlacionadas aos valores de absorbância obtidos na curva padrão e as concentrações das mesmas; calculadas por interpolação através do software estatístico Prisma. Utilizou-se regressão não linear, sendo as concentrações calculadas a partir de uma equação polinomial de quarta ordem, de acordo com o fabricante. O limite de detecção das citocinas nas condições de nossos ensaios está indicado respectivamente nos parênteses: TNF- α (12,5 pg/mL), IFN- γ (31.2pg/mL), IL-10 (31.2 pg/mL), TGF- β (31,25 pg/mL) e IL-12 (15.6 pg/mL).

6.14 Nitrito proveniente de células totais do miocárdio

Fragmentos de 100 mg de tecido cardíaco dos animais foram utilizados nos experimentos. Estes foram macerados e incubados por 5 minutos a 37° em uma solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} contendo tripsina 0,05% (GIBCO-BRL) e collagenase tipo II 0,01% (Worthington Biochemical Corp). A atividade da tripsina foi interrompida pela adição de soro fetal bovino 10%. Após tripsinização, a suspensão foi centrifugada e o pellet de células foi suspenso em meio DEMEM suplementado com soro de cavalo 15%, soro fetal bovino 5%, extrato embrionário de frango 2%, glutamina 1mmol/L, penicilina 1000 U/mL e 50 mg/mL de streptomicina (Sigma Chemical Co). A suspensão de células foi acertada para uma concentração de 5×10^6 células/mL e distribuídas em placas de 24 poços, sendo incubadas overnight. O sobrenadante foi recuperado e a concentração de nitrito mensurada pela reação de

Griess (Ding *et al*, 1988). Os dados foram expressos em μM , sendo a concentração mínima detectável de $1,56 \mu\text{M}$.

6.15 Detecção de Creatina Fosfoquinase para avaliação de uma possível redução dos danos cardíacos após os tratamentos

A detecção da enzima CK-MB 90, 120 e 180 dias após a infecção foi feita de maneira idêntica ao item 6.6.

6.16 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão da media (D.P), sendo o teste estatístico One-way ANOVA, utilizado para análise dos dados. A significância estatística entre os grupos infectados sem tratamento (IST) e os grupos infectados e tratados pelas substâncias foi determinada pelos testes de Bonferroni, Student's t test ou Dunnet test. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas com auxílio do software Graph Pad Prism versão 5.0.

* Não houve diferença estatística referente aos níveis de citocinas analisados entre os animais não infectados tratados - NIT (Mel e/ou Mx) e animais não infectados sem tratamento - NIST, indicando que os compostos não interferem de maneira significativa nos níveis destes mediadores inflamatórios produzidos pelo tecido cardíaco e soro dos animais não infectados.

6.17 Desenho experimental (resumo)

6.17.1 Desenho experimental

Tabela 2. Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental (Primeira parte).

A			B	
Cronificação	Animais n = 10	Parâmetros analisados <i>In vivo</i>	Parâmetros analisados <i>Post Mortem</i>	
		TNF- α e IFN- γ * CK-MB *	Peso relativo do coração	Histologia do coração – focos inflamatórios
60 dias após a infecção	(IST)	↑↑↑↑ ↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑
	(NIST)	— —	—	—

*Citocinas pró-inflamatórias TNF- α / IFN- γ e CK-MB dosadas a partir do soro dos animais.

6.17.2 Desenho experimental

Tabela 3. Citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos (Segunda parte).

		A - Perfil Sistêmico de Citocinas e Nitrito						B - Perfil de Citocinas no coração e Nitrito					
Infecção	Animais	Citocinas Analisadas						Citocinas Analisadas					
		TNF- α	IFN- γ	IL-12	TGF- β	IL-10	NO2-	TNF- α	IFN- γ	TGF- β	IL-10	NO2-	
90 dias	(IST)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mel)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT (Mel + Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
120 dias	(IST)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mel)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT (Mel + Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
180 dias	(IST)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mel)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT(Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	IT (Mel + Mx)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

* Animais: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados tratados com Meloxicam IT (Mx), Infectados tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx).

6.17.3 Desenho experimental

Tabela 4. Parasitismo tecidual, número de focos inflamatórios, peso cardíaco relativo e níveis de CK-MB após os diferentes tratamentos (Terceira Parte).

Infecção	Animais	Parâmetros Analisados			
		Parasitismo Cardíaco (Histopatologia)	Níveis séricos de CK-MB	Número de Focos Inflamatórios	Peso Relativo Cardíaco
90, 120 e 180 dias	(IST)	✓	✓	✓	✓
	IT(Mel)	✓	✓	✓	✓
	IT(Mx)	✓	✓	✓	✓
	IT(Mel + Mx)	✓	✓	✓	✓

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação da parasitemia sanguínea e taxa de sobrevivência no curso da infecção

Figura. 6. Curso da infecção durante as fases aguda e crônica no modelo experimental de ratos wistar infectados com 3×10^5 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. - Parasitemia (círculos vermelhos) e porcentagem de sobrevivência (quadrados pretos). Para parasitemia os resultados são expressos em médias $\pm$ o desvio padrão, $n = 10$ animais.

Foi observada uma mortalidade de 20% dos animais durante o pico da parasitemia (14 dias após a infecção). Uma queda no número de tripomastigotas sanguíneas pode ser observada no intervalo entre o 14º e 21º dia após a infecção (5.7 vezes menor). A parasitemia diminui progressivamente do 21º dia para o 28º (5.3 vezes menor) e do 28º dia para o 35º dia, quando não foram encontradas as formas tripomastigotas nos exames microscópicos do sangue a fresco.

7.2 Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental - Biomarcadores correlacionados com a severidade da Cardiopatia Chagásica Crônica 60 dias após a infecção

Figura 7. A e B - Concentrações séricas de TNF- α e IFN- γ nos animais não infectados sem tratamento (NIST) comparado com as concentrações dos animais infectados sem tratamento (IST). $p < 0,0001$ e $p < 0,05$ respectivamente. **C** – Atividade de CK-MB nos animais não infectados sem tratamento (NIST) comparado à atividade desta enzima nos animais infectados sem tratamento (IST). $p < 0,0001$. Os valores são expressos em médias $\pm$ desvio padrão. Student's t test foi adotado para analisar a significância nas diferenças observadas. $n = 7$ animais em cada um dos dois grupos observados.

Após 60 dias de infecção, os níveis séricos de TNF- α foram 130% mais altos nos animais infectados sem tratamento (IST) em relação aos animais não infectados sem tratamento (NIST) – figura 7 A. Os níveis séricos de IFN- γ foram 84,6% mais altos nos mesmos grupos de animais comparados com os controles sem infecção IST vs. NIST – figura 7 B. A atividade enzimática de CK-MB foi 5,6 vezes maior nos animais IST vs. NIST – figura 7C.

7.3 Fatores preditivos de danos cardíacos no modelo experimental - Aumento do peso relativo cardíaco e presença de focos inflamatórios

Figura 8. A - Aumento relativo do peso cardíaco observado 60 e 90 dias pós-infecção (quadrados e triângulos vermelhos, respectivamente) comparados com ratos não infectados (círculos azuis). **B** - Análise histopatológica (400 x H&E) mostra um ninho de amastigotas e células inflamatórias mononucleares em tecido cardíaco de animais cronicamente infectados (60 dias pós-infecção). Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ DP, valores para 7 ratos/ grupo/ dia de experimento. # $p < 0,05$ – Student's t test. Setas amarelas (focos inflamatórios), seta azul (ninho de amastigota).

Verificamos um aumento de 28.63 % do peso relativo cardíaco nos animais infectados sem tratamento 90 dpi em relação aos animais infectados sem tratamento 60 dpi – figura 8 A. O estudo histopatológico destes animais revelou grande número de focos inflamatórios além de ninhos de amastigotas como indicado pela seta azul – figura 8 B.

7.4 Níveis séricos de citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos

7.4.1 Níveis séricos de IL-12

Figura 9. A, B e C - Níveis de IL-12 a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** – Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** - Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Após os diferentes tratamentos não foram observadas reduções significativas nas concentrações séricas de IL-12 nos animais infectados e tratados em comparação com os animais infectados não tratados. Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos associados em comparação com os tratamentos simples. Figura 9.

7.4.2 Níveis séricos de TNF- α

Figura 10. A, B e C - Níveis de TNF- α a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mel). **B** - Grupos: - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** - Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Os níveis séricos de TNF- α foram significativamente mais baixos nos animais infectados que receberam os tratamentos: melatonina ou meloxicam (A - IT Mel) e (B - IT Mx) em comparação com os animais infectados e não tratados (IST). Os níveis séricos de TNF- α também foram significativamente mais baixos na comparação entre os animais infectados que receberam os tratamentos simples em relação aos animais infectados que receberam o tratamento com a associação das substâncias - figura 10 C e tabela 5.

Tabela 5. Percentual de redução dos níveis de TNF- α nas diferentes comparações.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Citocina	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT(Mel)	TNF- α	33,5 – 90 dpi	36,5 – 120 dpi	31,6 - 180 dpi
B	IST		IT(Mx)	TNF- α	25,0 – 90 dpi	27,8 – 120 dpi	11,6 - 180 dpi
C	IT(Mel + Mx)		IT(Mel)	TNF- α	35,5 – 90 dpi	17,9 – 120 dpi	21,7- 180 dpi
C	IT(Mel + Mx)		IT (Mx)	TNF- α	33, 3 – 90 dpi	20,8 – 120 dpi	34,1- 180 dpi

7.4.3 Níveis séricos de IFN- γ

Figura 11- A, B e C. Níveis de IFN- γ a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção), para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** - Grupos: - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Os níveis séricos de IFN- γ foram significativamente mais baixos nos animais que receberam os tratamentos: melatonina ou meloxicam (A - IT Mel) e (B - IT Mx), em comparação com os animais infectados e não tratados (IST) – figura 11 e tabela 6. O percentual de redução dos níveis séricos de IFN- γ nos animais infectados que receberam os tratamentos associados - IT (Mel + Mx) em relação aos animais infectados que receberam o tratamento com melatonina - IT (Mel) está indicado na tabela 6.

Tabela 6. Percentual de redução dos níveis de IFN- γ nas diferentes comparações.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Citocina	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT (Mel)	INF- γ	18,5 – 90 dpi	17,1 – 120 dpi	14,4 -180 dpi
B	IST		IT (Mx)	INF- γ	23,3 – 90 dpi	30,5 – 120 dpi	24,1 -180 dpi
C	IT(Mel + Mx)		IT (Mel)	INF- γ	35,7 – 90 dpi	28,6 – 120 dpi	21,4 -180 dpi

7.4.4 Níveis séricos de IL-10

Figura 12 – A, B e C. Níveis de IL-10 a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção), para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** – Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx). Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento. (Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias).

Nos três dias analisados não foi observado aumento significativo nas concentrações de IL-10 nos animais infectados e tratados com melatonina, meloxicam ou associação de ambos em comparação com os animais infectados e não tratados. Figura 12 (A, B e C).

7.4.5 Níveis séricos de TGF- β

Figura 13 – A, B e C. Níveis de TGF- β a partir do soro dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção), para os seguintes grupos: **A** – Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** - Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Não houve alteração significativa nos níveis séricos de TGF- β nos animais infectados e tratados com as diferentes substâncias em comparação com os animais infectados que não receberam tratamento. Figura 13 (A, B e C).

7.5 Níveis de citocinas analisadas a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas após os diferentes tratamentos

7.5.1 Níveis de TNF- α analisados a partir do extrato cardíaco

Figura 14. A, B e C- Níveis de TNF- α a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** – Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** – Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Durante o curso da infecção, foi observada uma redução significativa dos níveis de TNF- α a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas nos animais infectados e tratados com melatonina ou meloxicam quando comparados com os animais infectados e não tratados. Figura 14 (A e B) e tabela 7.

Tabela 7. Percentual de redução dos níveis de TNF- α nas diferentes comparações.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Citocina	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT (Mel)	TNF- α	15,4 – 90 dpi	11,5 – 120 dpi	14,7 - 180 dpi
B	IST		IT(Mx)	TNF- α	9,6 – 90 dpi	16,7 – 120 dpi	15,2 - 180 dpi

7.5.2 Níveis de IFN- γ analisados a partir do extrato cardíaco

Figura 15. A, B e C - Níveis de IFN- γ a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** – Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** – Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Durante o curso da infecção, foi observada uma redução significativa dos níveis de TNF- α a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas nos animais infectados e tratados com melatonina quando comparados com os animais infectados sem tratamento. Figura 15 A e tabela 8.

Com exceção de 120 dpi, os níveis de IFN- γ foram mais baixos nos animais infectados e tratados com meloxicam quando comparados com os animais infectados sem tratamento - IT (Mel) vs. IST. Figura 15 B.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis de IFN- γ nas comparações entre os tratamentos simples ou associados. Figura 15 C.

Tabela 8. Percentual de redução dos níveis de IFN- γ para a seguinte comparação.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Citocina	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT (Mel)	INF- γ	26,0 – 90 dpi	22,1 – 120 dpi	21,3 -180 dpi

7.5.3 Níveis de IL-10 analisados a partir do extrato cardíaco

Figura 16. A, B e C - Níveis de IL-10 a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** - Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** - Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Não houve alteração significativa nos níveis de IL-10 analisados a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas nos animais infectados e tratados com as diferentes substâncias em comparação com os animais infectados que não receberam tratamento. Figura 16 (A, B e C).

7.5.4 Níveis de TGF- β analisados a partir do extrato cardíaco

Figura 17. A, B e C – Níveis de TGF- β a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas dos animais experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós-infecção) para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** – Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** – Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, n = 5/ grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Foram observados níveis de TGF- β significativamente mais altos nos extratos cardíacos dos animais infectados tratados com melatonina - IT (Mel) em relação aos animais infectados sem tratamento – IST nos três dias analisados. Figura 17 A e tabela 9.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis de TGF- β nas comparações entre os animais infectados tratados com meloxicam IT (Mx) em relação aos animais infectados sem tratamento – IST e nas comparações entre os tratamentos simples ou associados Figura 17 B e C, respectivamente.

Tabela 9. Percentual de aumento dos níveis de TGF- β para a seguinte comparação.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Citocina	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT(Mel)	TGF- β	23,9 – 90 dpi	33,7 – 120 dpi	15,1 - 180 dpi

7.6 Níveis de nitrito analisados a partir do sobrenadante de cultura de células peritoneais

Figura 18. Níveis de NO_2^- a partir do sobrenadante de cultura de 5×10^6 células peritoneais dos grupos experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós infecção), para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** - Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** - Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx), Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Foram observados níveis de Nitrito significativamente mais baixos no sobrenadante de cultura de células peritoneais dos animais infectados tratados com melatonina - IT (Mel) em relação aos animais infectados sem tratamento – IST nos três dias analisados. Figura 18 A e tabela 10.

Tabela 10. Percentual de redução dos níveis de NO_2^- para a seguinte comparação.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Nitrito	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT(Mel)	NO_2^-	37,03 – 90 dpi	33,3 – 120 dpi	29,4 - 180 dpi

7.7 Níveis de nitrito analisados a partir do sobrenadante de cultura das células totais cardíacas

Figura 19. Níveis de NO_2^- a partir de 100 mg de tecido cardíaco dos grupos experimentais durante a fase crônica da doença (90, 120 e 180 dias pós infecção), para os seguintes grupos: **A** - Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Melatonina NIT (Mel). **B** - Grupos: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Meloxicam IT (Mx), Não Infectados sem Tratamento (NIST), Não Infectados Tratados com Meloxicam NIT (Mx). **C** - Grupos: Infectados Tratados com Melatonina - IT (Mel), Infectados Tratados com Meloxicam - IT (Mx), Infectados Tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx). Infectados sem Tratamento (IST), Não Infectados sem Tratamento (NIST). Número de formas infectantes - 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas. Os resultados do gráfico são expressos em médias $\pm$ D.P, $n = 5$ / grupo/ dia de experimento. Correção de Bonferroni para pares selecionados de médias (A e B) e Tukey test (C).

Os níveis de Nitrito foram significativamente mais baixo nas células totais cardíacas dos animais infectados tratados com melatonina - IT (Mel) em relação aos animais infectados sem tratamento – IST nos três dias analisados. Figura 19 A e tabela 11.

Tabela 11. Percentual de redução dos níveis de NO_2^- para a seguinte comparação.

	Grupo 1	V.S	Grupo 2	Nitrito	Diferenças dos níveis de citocinas em %		
A	IST		IT(Mel)	NO_2^-	41,9 – 90 dpi	15,6 – 120 dpi	9,1 - 180 dpi

7.8 Modulação das Citocinas analisadas no estudo após os diferentes tratamentos

A - Perfil Sistêmico de Citocinas e Nitrito

B - Perfil de Citocinas no coração e Nitrito

Infecção		*Animais	**Citocinas Analisadas					
			TNF- α	IFN- γ	IL-12	TGF- β	IL-10	NO2-
90 dias	(IST)		↑↑↑	↑↑↑	↑	—	↑	↑↑↑
	IT(Mel)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
	IT(Mx)		↓↓↓	↓↓↓	—	—	↑	↓↓↓
	IT (Mel + Mx)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
120 dias	(IST)		↑↑↑	↑↑↑	↑	—	↑	↑↑↑
	IT(Mel)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
	IT(Mx)		↓↓↓	↓↓↓	—	—	↑	↓↓↓
	IT (Mel + Mx)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
180 dias	(IST)		↑↑↑	↑↑↑	↑	—	↑	↑↑↑
	IT(Mel)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓
	IT(Mx)		↓↓↓	↓↓↓	—	—	↑	↓↓↓
	IT (Mel + Mx)		↓↓↓	↓↓↓	↓	—	—	↓↓↓

* Animais: Infectados sem Tratamento (IST), Infectados Tratados com Melatonina IT (Mel), Infectados tratados com Meloxicam IT (Mx), Infentados tratados com Melatonina + Meloxicam IT (Mel + Mx).

**As setas indicam alta, média ou baixa redução ou aumento dos parâmetros analisados.

7.9 Número de focos inflamatórios após os diferentes tratamentos

7.9.1 Melatonina

Figura 20. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com *T. cruzi* em 90, 120 e 180 dias pós-infecção. Cada barra representa as médias $\pm$ Desvio Padrão da Média DP em grupos compostos por 7 ratos, em 3 dias de experimentos independentes. *P < 0.05 - IT (Mel) vs. IST (90 e 120) dias após a infecção. (Student's t test). A, C e E: focos inflamatórios dos animais infectados sem tratamento (IST) e B, D e F: focos inflamatórios dos animais infectados e tratados com melatonina IT (Mel). Os focos são indicados por setas. Coloração – hematoxilina/eosina (400 x).

Após 90 dias de infecção, o número de focos inflamatórios diminuiu cerca de 44,4% nos animais infectados e tratados com melatonina em relação aos animais infectados e não tratados IST vs. IT (Mel). Após 120 dias de infecção, a redução do número de focos inflamatórios foi de aproximadamente 38,5% - IST vs. IT (Mel). Após 180 dias de infecção o número de focos inflamatórios reduziu cerca de 20% - IST vs. IT (Mel) figura 20.

7.9.2 Meloxicam

Figura 21. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com *T. cruzi* em 90, 120 e 180 dias pós-infecção. Cada barra representa as médias $\pm$ Desvio Padrão da Média DP em grupos compostos por 7 ratos, em 3 dias de experimentos independentes. * $P < 0.0001$ - IT (Mx) vs. IST 90, dias após a infecção e # $p < 0,05$ – IT (Mx) vs. IST 120 e 180 dias após a infecção. (Student's t test). **A, C e E:** focos inflamatórios dos animais infectados sem tratamento (IST) e **B, D e F:** focos inflamatórios dos animais infectados e tratados com meloxicam IT (Mx). Os focos são indicados por setas. Coloração – hematoxilina/eosina (400 x).

Após 90 dias de infecção, o número de focos inflamatórios diminuiu cerca de 60,5% nos animais infectados e tratados com meloxicam em relação aos animais infectados e não tratados IST vs. IT (Mx). Após 120 dias de infecção, a redução do número de focos inflamatórios foi de aproximadamente 63,6% - IST vs. IT (Mx). Após 180 dias de infecção o número de focos inflamatórios reduziu cerca de 53,2% - IST vs. IT (Mx) figura 21.

7.9.3 Melatonina + Meloxicam

Figura 22. Número de focos inflamatórios presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com *T. cruzi* em 90, 120 e 180 dias pós-infecção. Cada barra representa as médias $\pm$ Desvio Padrão da Média DP em grupos compostos por 7 ratos, em 3 dias de experimentos independentes. * $p < 0.0001$ - IT (Mel + Mx) vs. IST 90 dias após a infecção e # $p < 0.001$ - IT (Mel + Mx) vs. IST 120 dias após a infecção. (Student's t test). **A, C e E:** focos inflamatórios dos animais infectados sem tratamento (IST) e **B, D e F:** focos inflamatórios dos animais infectados e tratados com melatonina + meloxicam IT (Mel + Mx). Os focos são indicados por setas. Coloração – hematoxilina/eosina (400 x).

Após 90 dias de infecção, o número de focos inflamatórios diminuiu cerca de 66,7% nos animais infectados e tratados com melatonina + meloxicam em relação aos animais infectados e não tratados IST vs. IT (Mel + Mx). Após 120 dias de infecção, a redução do número de focos inflamatórios foi de aproximadamente 53,8% - IST vs. IT (Mel + Mx). Após 180 dias de infecção o número de focos inflamatórios reduziu cerca de 34,4% - IST vs. IT (Mel + Mx) figura 22.

7.10 Níveis séricos de CK-MB e peso relativo cardíaco

Figura 23. A, B e C – Avaliação dos danos de cardíacos por meio da atividade de CK-MB em 90, 120 e 180 dias pós infecção (dpi) no soro de ratos wistar infectados com 3×10^5 tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente 60 até 180 dpi com melatonina, meloxicam ou associação de ambos. Grupos tratados vs. IST - #P < 0.01 (90 e 120 dpi), grupos tratados vs. IST - **P < 0,05 (180 dpi). Dunnet post test. **D, E e F** – Diferenças entre os pesos relativos cardíacos de ratos wistar - 90, 120 e 180 dias pós infecção tratados ou não pelas diferentes substâncias ou associação de ambas. (**F**) - *p < 0,05 – Infectados tratados com as diferentes substâncias em relação aos animais infectados sem tratamento (IST) – 180 dias pós-infecção. Dunnet post test. ^aMédia ± erro padrão da média - ^bPeso relativo cardíaco significa a razão entre os pesos dos órgãos em miligramas / peso corporal do animal em gramas. Cada grupo foi considerado de 7 ratos.

As reduções da atividade de CK-MB em relação ao grupo infectado sem tratamento estão indicadas em % na tabela 12 abaixo nos três dias analisados.

Tabela 12. Diferenças em porcentagens das da atividade de CK-MB em relação ao grupo IST

Grupo VS. Grupos		A 90 dpi	B 120 dpi	C 180 dpi
IST	IT(MeI)	36,07	34,7	22,11
	IT(Mx)	32,14	29,85	18,59
	IT(MeI + Mx)	33,21	35,45	19,60

As tabelas D, E e F mostram as os valores dos pesos relativos cardíacos dos diferentes grupos infectados ou não e tratados ou não pelas diferentes substâncias. Na tabela F (180 dpi) observamos diferenças estatísticas entre os animais infectados e tratados em relação aos animais infectados sem tratamento *p < 0,05.

7.11 Parasitismo cardíaco

Tabela 13. Parasitismo cardíaco estudado por técnica de coloração de hematoxilina/eosina

Dias de Infecção	Animais	Intensidade do Parasitismo Cardíaco	Ninhos de amastigota
90	(IST)	++
	IT(Mel)	++	
	IT(Mx)	++	
	IT(Mel+Mx)	+	
120	(IST)	+
	IT(Mel)	+	
	IT(Mx)	-	
	IT(Mel+Mx)	-	
180	(IST)	-
	IT(Mel)	-	
	IT(Mx)	-	
	IT(Mel+Mx)	-	

Número de ninhos de amastigotas presentes em 50 campos obtidos do tecido cardíaco de ratos wistar infectados com *T. cruzi* em 90, 120 e 180 dias pós-infecção. Grupos compostos por 7 ratos, em 3 dias de experimentos independentes. (++) ≈ 20% de ninhos de amastigotas em 50 campos analisados, (+) ≈ 10% de ninhos de amastigotas em 50 campos analisados, (-) Ausência de ninhos de amastigotas em 50 campos analisados. Os ninhos são indicados por setas. Coloração – hematoxilina/eosina (400 x).

Os ninhos de amastigotas foram observados 90 dpi em todos os grupos infectados (tratados ou não), sendo observada uma redução nos animais infectados e tratados pelas duas substâncias em associação. 120 dpi os ninhos estavam presentes nos animais infectados sem tratamento IST e infectados tratados com melatonina IT (Mel). Nos grupos restantes (120 e 180 dpi), não foram encontrados ninhos de amastigotas – tabela 13.

8 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram testados três inóculos intraperitoneais: 1×10^5 , 2×10^5 e 3×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Verificamos que os animais infectados com 3×10^5 formas apresentavam danos cardíacos fidedignos a estudos anteriores que utilizaram o mesmo inóculo em ratos (Chapadeiro *et al*, 1991; Machado & Ribeiro, 1989; Martinelli *et al*, 2006; Novaes *et al*, 2013). Com base nos trabalhos citados, justificamos a escolha da cepa Y em nossos experimentos, sendo a cardiomiopatia considerada a forma mais frequente da doença neste modelo experimental (Alcantara, 1964).

Nosso modelo foi capaz de reproduzir algumas das principais constatações de Carlos Chagas em estudos de pacientes que apresentavam cardiomiopatia chagásica crônica (Chagas, 1916; Chagas & Villela, 1922), incluindo (i) controle da parasitemia e sobrevivência na fase aguda, (ii) aumento crônico no peso relativo do coração, (iii) lesão de cardiomiócitos e (iv) miocardite crônica figuras: 6, 7(A, B e C) e 8(A e B). Enfatizamos que ratos wistar normalmente apresentam-se resistentes para a maioria das cepas de *T. cruzi*, sendo necessária uma carga relativamente alta de parasitas para mimetizar os danos cardíacos da infecção.

O aumento das concentrações séricas de TNF- α / IFN- γ e da atividade de CK-MB nos animais infectados - figura 7 A, B e C sugerem danos cardíacos gerados pela infecção. Adicionalmente, o aumento do peso relativo do coração - figura 8 A. e a presença de focos inflamatórios e ninhos de amastigota, figura 8 B sugerem que boa parte dos animais experimentais tende a evoluir para a forma cardíaca crônica da doença.

Conforme a figura 6, nosso grupo tem demonstrado que a infecção aguda gerada pela cepa Y de *T. cruzi* causa picos precoces em ratos wistar durante o 14º dia de infecção (Kuehn *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010). Esta característica também foi observada por outros autores em ratos Holtzman infectados pela cepa Y de *T. cruzi* (Rachid *et al*, 2006). Nosso estudo também confirma a alta taxa de sobrevivência pós-infecção neste modelo experimental (80% dos animais).

Sabe-se que a resposta inflamatória gerada pela infecção por *T. cruzi* desempenha importante papel para o hospedeiro, sendo envolvida tanto na resistência à infecção, quanto nos mecanismos relacionados à evolução da fase crônica da doença de Chagas (Teixeira *et al*, 2002). O controle dos mecanismos moleculares envolvidos na injúria inflamatória, aliado a eliminação do parasita poderia resultar numa estratégia terapêutica mais efetiva com possível melhora das áreas cardíacas fibrosadas e recuperação da disfunção cardíaca gerada pela infecção (Marino *et al*, 2004).

Estudos do perfil de produção de citocinas em modelos animais e pacientes chagásicos têm elucidado quais destes mediadores poderiam se tornar alvo de uma terapia baseada em imunomodulação. Neste sentido, tem sido relatado o importante papel de citocinas como: TNF- α (Ferreira *et al*, 2003; Starobinas *et al*, 1991), IFN- γ (Gazzinelli *et al*, 1992; Reed, 1988) e IL-10 (Abrahamsohn & Coffman, 1996; Silva *et al*, 1992). Além disso, intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) têm sido descritos como moléculas fundamentais na resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da doença (Hölscher *et al*, 1998; Martins *et al*, 1998; Vespa *et al*, 1994). Por outro lado, altos níveis plasmáticos de NO foram observados em pacientes chagásicos que apresentavam as formas cardíacas mais

graves, quando comparados com aqueles que desenvolveram cardiopatia branda, sugerindo um papel sistêmico de NO relacionado a danos das funções cardíacas na fase crônica da infecção (Pérez-Fuentes *et al*, 2007).

A transcrição de uma série de genes alvo que codificam mediadores pró-inflamatórios ou citocinas, tais como iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β e TNF- α é dependente do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Portanto, este fator possui importante papel na regulação da resposta inflamatória estimulada por mitógenos, citocinas e lipopolissacarídeos (LPS) (Guo *et al*, 2007). Uma superprodução ou uma produção contínua de mediadores e/ou citocinas inflamatórias pode culminar com o desenvolvimento de doenças crônicas (Hseu *et al*, 2005), sendo esta também uma das características da fase crônica da doença de Chagas.

No contexto das reações inflamatórias-oxidativas características da doença de Chagas, (Ba *et al*, 2010; Gupta *et al*, 2011) demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) podem sinalizar a expressão de citocinas pró-inflamatórias produzidas por cardiomiócitos, sendo esta, uma das explicações da manutenção do processo inflamatório na (CCC) (Wen *et al*, 2010a). Além disso, TNF- α pode também estimular a produção de (ROS), criando-se assim um feedback positivo no qual o aumento de destes intermediários reativos poderia causar a ativação de NF- $\kappa\beta$, bem como ter os seus próprios efeitos deletérios sobre o tecido muscular (Reid & Li, 2001).

Com relação à pesquisa de citocinas pró-inflamatórias séricas, os tratamentos experimentais mostraram-se eficazes em reduzir as concentrações de TNF- α , sendo observada uma diminuição média de 33,9% nos três dias analisados para os animais infectados e tratados com melatonina IT (Mel) em comparação com infectados sem tratamento (IST). Os animais tratados com meloxicam mostraram uma

redução média dos três dias analisados de 21,5% em comparação com os infectados sem tratamento (figura 10 e tabela 5). O bloqueio da produção de IFN- γ também foi observado nas análises das concentrações séricas desta citocina, sendo em média, 16,7% menor nos três dias analisados nos animais infectados e tratados com melatonina comparados com os animais infectados e não tratados. Nos animais infectados e tratados com meloxicam a redução média das concentrações séricas de IFN- γ foi de 25,9% em comparação com os animais infectados não tratados (figura 11 e tabela 6).

A administração de melatonina inibe a expressão de alguns dos genes dependentes de NF- κ B incluindo iNOS e COX (Escames *et al*, 2006; Li *et al*, 2009), reduzindo-se assim, a resposta inflamatória. Os efeitos anti-inflamatórios desta substância são seguidos por uma redução de citocinas pró-inflamatórias tais como IL1 β , IL6, TNF α e IFN- γ (Rodriguez *et al*, 2007). Em um estudo recente, (Chahbouni *et al*, 2010) mostram a ação anti-inflamatória de melatonina na distrofia muscular, sendo reduzidas as concentrações séricas de Nitrito, TNF- α , IFN- γ , IL1 β , IL-2 e IL-6.

A capacidade de alterar o balanço de citocinas Th1/Th2 atribuída aos inibidores de ciclooxigenase 2, e mais especificamente de meloxicam, tem sido estudada em modelos murinos na fase aguda da doença de Chagas (Michelin *et al*, 2005; Oliveira *et al*, 2010). Os efeitos desta substância também foram estudados em ratos da linhagem Lewis por (Suzuki *et al*, 2006), sendo demonstrada por estes autores, uma reversão da miocardite aguda autoimune nos grupos tratados com o anti-inflamatório. Além disso, (Abdalla *et al*, 2008) demonstraram efeito protetor de meloxicam no tecido cardíaco de camundongos infectados por *T. cruzi* durante a fase aguda da doença.

Nossos resultados referentes às concentrações de IL12, IL-10 e TGF- β mostram que estas citocinas não foram reguladas juntamente com as concentrações de NO₂⁻, TNF- α e IFN- γ (figuras 9, 12 e 13). Pode-se sugerir que as substâncias (melatonina/meloxicam) bloqueiam a produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (com exceção de IL-12), além de reduzir as concentrações de nitrito produzido por macrófagos peritoneais, exercendo pouco efeito na síntese de TGF- β e IL-10 nos animais infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.

Na literatura científica atual, podem ser encontrados resultados controversos com relação à modulação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β após administração de melatonina. Na infecção chagásica aguda, (Santello *et al*, 2008b) ou na resposta inflamatória crônica dependente da idade em camundongos senis (Rodriguez *et al*, 2007) foi demonstrado um efeito supressivo na produção destas citocinas. Por outro lado, (Brazao *et al*, 2011) demonstraram um aumento da concentração de IL-10 acompanhada da proliferação de subpopulações celulares CD4⁺ e CD8⁺ na infecção chagásica crônica.

De acordo com as figuras 14 e 15, os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ mantiveram-se mais altos nos extratos cardíacos dos animais infectados sem tratamento (IST) durante o curso da infecção crônica. Os três pontos analisados (90, 120 e 180 dias pós-infecção) mostram uma diminuição lenta e progressiva desta citocina, indicando uma manutenção do processo inflamatório como descrito em trabalhos anteriores (Medina *et al*, 2007; Skyschally *et al*, 2007; Thielmann *et al*, 2002).

Neste estudo, uma regulação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) parece ocorrer no tecido cardíaco dos grupos submetidos aos diferentes esquemas terapêuticos. Com relação à TNF- α , foi observada uma redução média de 13, 86 %

nos três dias analisados - IT (Mel) em comparação com (IST) e uma redução média de 13, 83 % nos três dias analisados para IT (Mx) em comparação com (IST). Os níveis de IFN- γ foram em média 23,1% menores nos animais infectados tratados com melatonina em relação aos infectados não tratados (figuras 14, 15 e tabela 8).

O bloqueio da produção dos mediadores inflamatórios nos animais tratados com melatonina, meloxicam ou ambos pode ser explicado tanto pela inibição de NF- κ B, quanto pela ação da citocina anti-inflamatória IL-10, podendo esta citocina, exercer um papel preventivo em relação à hiperatividade da resposta imune durante a infecção chagásica (Holscher *et al*, 2000; Hunter *et al*, 1997). De acordo com (Abel *et al*, 2001; Gomes *et al*, 2003), células mononucleares do sangue periférico CD4⁺ de pacientes chagásicos crônicos produzem mais IFN- γ e TNF- α e menos IL10, quando comparadas com células de pacientes chagásicos nas fases assintomática/indetermina.

Com atividade semelhante a IL-10, TGF- β também apresenta um importante papel de prevenção na hiperatividade da resposta imune característica da doença de Chagas, além de apresentar efeitos antagonistas sob a liberação exacerbada de óxido nítrico produzido por cardiomiócitos (Roberts *et al*, 1992b). Nossos resultados mostram um aumento médio de 24,2% das concentrações de TGF- β provenientes de células totais cardíacas nos animais tratados com melatonina em comparação com os animais sem tratamento durante o curso da infecção (figura 17 e tabela 9). O aumento de TGF- β corrobora com uma diminuição de nitrito produzido pelas células cardíacas dos animais tratados com melatonina, conforme demonstrado na figura 19.

Com relação aos efeitos de meloxicam sobre o stress oxidativo/nitrosativo (Agha *et al*, 1999) demonstraram que este anti-inflamatório poderia evitar danos

gerados por espécies reativas do oxigênio e nitrogênio envolvidas na arritmia induzida em ratos, atuando particularmente na peroxidação de lipídios e tióis. Os efeitos antioxidantes de melatonina, bem como de sua capacidade de reduzir espécies reativas do nitrogênio podem ser comprovados por vários trabalhos (Chahbouni *et al*, 2010; Escames *et al*, 2006; Galano *et al*, 2011; Li *et al*, 2009; Rodriguez *et al*, 2007). O mesmo efeito de redução das concentrações de nitrito foi verificado na infecção chagásica aguda (Oliveira *et al*, 2010; Santello *et al*, 2008a).

De acordo com (Perez-Fuentes *et al*, 2003), o grau de severidade da doença de Chagas em indivíduos cronicamente infectados pode ser associado com um desequilíbrio no balanço de mecanismos oxidativos e de produção de citocinas. Neste contexto, a diminuição da formação de NO limita o aumento dos níveis de metabólitos pró-oxidativos, radicais livres derivados destes componentes e peroxinitrito, o que ajuda a reduzir a resposta inflamatória (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005).

Nossos resultados mostraram uma diminuição dos níveis de nitrito nos animais infectados e tratados com melatonina em relação aos animais infectados sem tratamento (figuras 18 e 19 e tabelas 10 e 11). A redução média de nitrito produzido por macrófagos peritoneais foi de 33, 2% e a redução média de nitrito produzido a partir de células totais cardíacas foi de 22, 2 % nos três dias analisados.

O efeito anti-inflamatório das substâncias também pôde ser observado por meio da diminuição dos infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco durante o curso da fase crônica da doença (figuras 20, 21 e 22).

Nossos dados são consistentes com os trabalhos citados em relação às ações anti-inflamatórias de melatonina e meloxicam. De acordo com (Engelhardt, 1996; Engelhardt *et al*, 1995) meloxicam, pode inibir a migração de leucócitos para

sítios inflamatórios, interferindo na ativação de receptores de adesão mediados por citocinas destas células (Garcia-Vicuna *et al*, 1997). Além disso, (Suzuki *et al*, 2006), relataram que a inibição de COX-2 por meloxicam suprime a infiltração de células inflamatórias no miocárdio, expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão no coração de ratos Lewis durante a miocardite autoimune experimental.

De maneira semelhante à meloxicam, tem sido demonstrado que melatonina pode reduzir a adesão de leucócitos no endotélio, bem como, a migração trans-endotelial destas células. Tal mecanismo também pode ser explicado pela capacidade desta substância de inibir o fator de transcrição NF- κ B e consequentemente, suprimir a expressão de moléculas de adesão (Bertuglia *et al*, 1996). Outros autores demonstraram que melatonina reduz o recrutamento de neutrófilos nos sítios de inflamação (Reiter *et al*, 2000; Sewerynek *et al*, 1996).

Em todos os grupos experimentais que receberam os tratamentos houve redução da inflamação, porém, foi verificada uma manutenção de pequenas quantidades de focos inflamatórios revelados por técnica histológica - figuras 20, 21, 22 – E e F. A redução média do número de focos inflamatórios nos animais infectados e tratados com melatonina foi de 34,3% para os três dias investigados, para os animais tratados com meloxicam, a redução média foi de 59,1% e para os animais tratados pela combinação das substâncias a redução média foi de 51,6% em comparação com os animais infectados sem tratamento.

Para confirmar os efeitos protetores das substâncias testadas neste estudo, nós investigamos a presença de CK-MB no plasma dos animais tratados e não tratados com melatonina, meloxicam ou ambos. CK-MB tem sido usado como um importante marcador da ocorrência de miocardite chagásica experimental, onde o aumento dos níveis desta enzima pode ser normalmente correlacionado com a

presença de infiltrados inflamatórios durante a fase crônica da infecção (de Souza *et al*, 2000; Medeiros *et al*, 2009).

Nossos resultados demonstraram que a redução média dos níveis séricos de CK-MB nos animais infectados e tratados com melatonina foi de 30,96 % nos três dias analisados. O tratamento com meloxicam reduziu em média 26,9% e o tratamento com as duas substâncias em associação reduziu em média 29,4% das concentrações séricas desta enzima (figura 23 A, B e C) e tabela 12.

Em um estudo recente (Veneroso *et al*, 2009) demonstraram que melatonina seria capaz de reduzir os níveis séricos de CK-MB, além de bloquear a superexpressão de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL6, induzidos no coração de ratos wistar durante a prática intensa de exercícios físicos. Em relação ao possível efeito protetor de meloxicam reportado neste trabalho, nossos resultados corroboram com (Carnieto Jr *et al*, 2009), sendo demonstrado que o tratamento com inibidores de COX-2 reduz os níveis séricos de CK-MB e outros marcadores bioquímicos relacionados ao dano cardíaco. O potencial papel protetor de meloxicam em doenças cardiovasculares foi demonstrado também em pacientes com doença coronária cardíaca (Altman *et al*, 2002).

Mediante os diferentes esquemas terapêuticos observamos uma discreta redução do peso relativo cardíaco dos animais submetidos aos tratamentos com melatonina/meloxicam após 180 dias de infecção. Com relação à quantificação de ninhos de amastigota, observamos ausência destes 120 dpi nos tecidos cardíacos dos animais infectados e tratados com meloxicam ou melatonina/meloxicam analisados por técnica histológica. A ausência de ninhos de amastigotas observada 180 dpi nos animais infectados sem tratamento (IST) inviabiliza a comparação entre os animais tratados e não tratados, não sendo possível concluir se o controle do

parasitismo está associado a um possível efeito imunoestimulatório das substâncias testadas. (tabela 13). Estudos complementares de investigação e quantificação do parasitismo cardíaco por técnicas de PCR ou coloração por imunohistoquímica devem ser realizados para concluir a ausência de material genético ou antígenos específicos do parasita no tecido cardíaco durante os períodos mais tardios da fase crônica da infecção.

9 CONCLUSÕES

Após os diferentes tratamentos realizados neste estudo, foi possível definir um perfil detalhado dos níveis de citocinas e outros mediadores inflamatórios envolvidos na resposta imune sistêmica e localizada no músculo cardíaco.

Verificamos efeitos anti-inflamatórios de melatonina e meloxicam e sugerimos também, mecanismos que explicariam a ação imunomoduladora de ambas as substâncias.

Concluimos que ambas as substâncias poderiam complementar a terapia anti-*T. cruzi* e sugerimos como principal mecanismo de ação anti-inflamatória, a inibição do fator nuclear $\kappa\beta$, bloqueando-se assim, a síntese de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias, iNOS, COX-2 e moléculas de adesão.

Observamos uma redução do influxo de células inflamatórias no coração dos animais tratados por estas substâncias, bem como sugerimos uma redução dos danos cardíacos por meio das análises das concentrações séricas de CK-MB.

O estudo contribui com dados que poderão incrementar a literatura científica atual no contexto das terapias baseadas na associação de substâncias contra a doença de Chagas, especificamente na Cardiomiopatia Chagásica Crônica.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2002) Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser* **905**: i-vi, 1-109, back cover

(2010) Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Wkly Epidemiol Rec* **85**: 334-336

Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA, Michelin MA (2008) *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol* **118**: 514-521

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E (2001) Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* **17**: 99-107

Abrahamsohn IA, Coffman RL (1996) *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. *Experimental parasitology* **84**: 231-244

Agha AM, El-Khatib AS, Al-Zuhair H (1999) Modulation of oxidant status by meloxicam in experimentally induced arthritis. *Pharmacol Res* **40**: 385-392

Alcantara FG (1964) [EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE. (VISCERAL MANIFESTATIONS)]. *Hospital (Rio J)* **66**: 625-633

Altman R, Luciardi HL, Muntaner J, Del Rio F, Berman SG, Lopez R, Gonzalez C (2002) Efficacy assessment of meloxicam, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, in acute coronary syndromes without ST-segment elevation: the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Unstable Angina Treatment-2 (NUT-2) pilot study. *Circulation* **106**: 191-195

Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira Mda C, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JC (2011) [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* **97**: 1-48

Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ (2010) *Trypanosoma cruzi* Induces the Reactive Oxygen Species-PARP-1-RelA Pathway for Up-regulation of Cytokine Expression in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 11596-11606

Bagnaresi P, Nakabashi M, Thomas AP, Reiter RJ, Garcia CRS (2012) The role of melatonin in parasite biology. *Molecular and Biochemical Parasitology* **181**: 1-6

Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RM, Guaraldo AM, Alves DP, Passos LA (2012) Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp in experimental acute Chagas disease. *J Food Prot* **75**: 601-606

Barcan L, Luna C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, De Rissio AM, Gadano A, Garcia MM, de Santibanes E, Riarte A (2005) Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transpl* **11**: 1112-1116

Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, Tan DX, Shohami E (2003) Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappa B and AP-1. *Faseb Journal* **17**: 149-+

Bern C (2011) Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine* **364**: 2527-2534

Bertuglia S, Marchiafava PL, Colantuoni A (1996) Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc Res* **31**: 947-952

Borges MM, Kloetzel JK, Andrade HF, Jr., Tadokoro CE, Pinge-Filho P, Abrahamsohn I (1998) Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett* **63**: 1-8

Brazao V, Del Vecchio Filipin M, Santello FH, Caetano LC, Abrahao AA, Toldo MP, do Prado JC, Jr. (2011) Melatonin and zinc treatment: distinctive modulation of cytokine production in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. In *Cytokine* Vol. 56, pp 627-632. United States: 2011 Elsevier Ltd

Brener Z (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **4**: 389-396

Buscaglia CA, Di Noia JM (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* **5**: 419-427

Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P (2011) Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1250

Carnieto A, Jr., Dourado PM, Luz PL, Chagas AC (2009) Selective cyclooxygenase-2 inhibition protects against myocardial damage in experimental acute ischemia. *Clinics (Sao Paulo)* **64**: 245-252

Carnieto Jr A, Dourado PMM, Luz PLd, Chagas ACP (2009) Selective cyclooxygenase-2 inhibition protects against myocardial damage in experimental acute ischemia. *Clinics* **64**: 245-252

Carod-Artal FJ, Gascon J (2010) Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol* **9**: 533-542

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A, Guerrero JM (2013) Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* **14**: 8638-8683

Castro MAPd, Brener Z (1985) Estudo parasitológico e anátomo-patológico da fase aguda da doença de Chagas em cães inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **18**: 223-229

Cencig S, Coltel N, Tuyens C, Carlier Y (2012) Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome (R) in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* **40**: 527-532

Cernysiov V, Gerasimcik N, Mauricas M, Girkontaite I (2010) Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. In *Int Immunol* Vol. 22, pp 25-34. England

Chagas C (1911) Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **3**: 219-275

Chagas C (1916) Processos patojenicos da tripanozomiasse americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **8**: 5-36

Chagas C, Villela E (1922) Cardiac form of American trypanosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **14**: 5-61

Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, Antonio Garcia J, Lopez LC, Munoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Acuna-Castroviejo D (2010) Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Pineal Research* **48**: 282-289

Chapadeiro E, Florencio RF, Afonso PC, Beraldo PS, de Jesus PC, Junqueira Junior LF (1991) Neuronal counting and parasympathetic dysfunction in the hearts of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **33**: 337-341

Cho JY (2007) Immunomodulatory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the clinically available doses. *Archives of Pharmacol Research* **30**: 64-74

Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ (1996) Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen. In *Cell Biol Int* Vol. 20, pp 687-692. England

Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* **9**: 11-24

Clayton J (2010) Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* **465**: S12-S15

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, Beard CB (2003) The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**: 443-449

Coura JR, Vinas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**: S6-S7

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* **98**: 1709-1712

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J (2009) Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**: 252-258

Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP (1999) Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy by melatonin. *Journal of Pineal Research* **27**: 9-14

de Souza AP, Olivieri BP, de Castro SL, Araujo-Jorge TC (2000) Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitology Research* **86**: 800-808

del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G (1989) Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol* **11**: 567-573

Dias JC (2001) [Chagas disease, environment, participation, and the state]. *Cad Saude Publica* **17 Suppl**: 165-169

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal-macrophages - comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* **141**: 2407-2412

Dominguez-Rodriguez A, Arroyo-Ucar E, Abreu-Gonzalez P (2010) Role of Melatonin in Preventing Mitochondrial Dysfunction in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *American Journal of Cardiology* **106**: 1521-1522

Engelhardt G (1996) Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *Br J Rheumatol* **35 Suppl 1**: 4-12

Engelhardt G, Bogel R, Schnitzer C, Utzmann R (1996) Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. In vitro findings. *Biochem Pharmacol* **51**: 21-28

Engelhardt G, Homma D, Schlegel K, Utzmann R, Schnitzler C (1995) Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflamm Res* **44**: 423-433

Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D (2006) Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* **41**: 1165-1173

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E (2003) Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **98**: 407-411

Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**: 199-203

Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S (2005) Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol* **60**: 33-37

Galano A, Tan DX, Reiter RJ (2011) Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of Pineal Research* **51**: 1-16

Garcia-Vicuna R, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, del Pozo MA, Mollinedo F, Cabanas C, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F (1997) Prevention of cytokine-induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from the oxicam family. *Arthritis Rheum* **40**: 143-153

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A (1992) The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology* **22**: 2501-2506

Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, Bandyopadhyay A (2007) Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. In *J Pineal Res* Vol. 42, pp 71-82. Denmark

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF kappa B activation. *Faseb Journal* **12**: 685-693

Girones N, Carrasco-Marin E, Cuervo H, Guerrero NA, Sanoja C, John S, Flores-Herraez R, Fernandez-Prieto L, Chico-Calero I, Salgado H, Carrion J, Fresno M (2007) Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Ann N Y Acad Sci* **1107**: 434-444

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* **71**: 1185-1193

Guerrero JM, Reiter RJ (2002) Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* **2**: 167-179

Guo Z, Shao L, Du Q, Park KS, Geller DA (2007) Identification of a classic cytokine-induced enhancer upstream in the human iNOS promoter. *The FASEB Journal* **21**: 535-542

Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ (2011) ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. In *Adv Parasitol* Vol. 76, pp 153-170. England: 2011 Elsevier Ltd

Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS (2009) The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology* **31**: 673-685

Hardeland R, Pandi-Perumal SR (2005) Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. In *Nutr Metab (Lond)* Vol. 2, p 22. England

Higuchi MD, Benvenuti LA, Reis MM, Metzger M (2003) Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research* **60**: 96-107

Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F (2000) Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infection and Immunity* **68**: 4075-4083

Hseu YC, Wu FY, Wu JJ, Chen JY, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Yang HL (2005) Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol* **5**: 1914-1925

Hunter CA, EllisNeyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* **158**: 3311-3316

Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity* **66**: 1208-1215

Jankovic BD, Isakovic K, Petrovic S (1970) Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. *Immunology* **18**: 1-6

Joe EL, Schussheim AE, Longrois D, Maki T, Kelly RA, Smith TW, Balligand JL (1998) Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): Mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **30**: 303-315

Jung KH, Hong S-W, Zheng H-M, Lee H-S, Lee H, Lee D-H, Lee SY, Hong S-S (2010) Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *Journal of Pineal Research* **48**: 239-250

Koberle F (1961) [Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease]. *Bol Oficina Sanit Panam* **51**: 404-428

Kopp E, Ghosh S (1994) Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* **265**: 956-959

Kroll-Palhares K, Silverio JC, da Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, Espinola Carvalho CM, de Oliveira Pinto LM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J (2008) TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8(+) T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **103**: 375-U313

Kuehn CC, Rodrigues Oliveira LG, Santos CD, Ferreira DS, Alonso Toldo MP, de Albuquerque S, do Prado JC, Jr. (2009) Melatonin and dehydroepiandrosterone combination: does this treatment exert a synergistic effect during experimental *Trypanosoma cruzi* infection? In *J Pineal Res* Vol. 47, pp 253-259. Denmark

Kurth F, Belard S, Basra A, Ramharter M (2011) Pyronaridine-artesunate combination therapy for the treatment of malaria. *Curr Opin Infect Dis* **24**: 564-569

Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Espinola Carvalho CM, Paiva CN, da Silva AA (2009) Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **104**: 226-235

Lavi R, Lavi S (2011) Melatonin and myocardial protection. In *Int J Cardiol* Vol. 150, p 207. Netherlands

Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, Tames-Olmedo MT (1999) Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* **341**: 1237-1239

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y (1960) ISOLATION OF MELATONIN AND 5-METHOXYINDOLE-3-ACETIC ACID FROM BOVINE PINEAL GLANDS. *Journal of Biological Chemistry* **235**: 1992-1997

Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G (2010) Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infectious Diseases* **10**: 556-570

Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, Mohr E, Zorn M, Buchler MW, Schemmer P (2009) Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF- κ B and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res* **46**: 365-372

Machado CR, Ribeiro AL (1989) Experimental American trypanomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **84**: 549-556

Machado FS, Martins GA, Aliberti JCS, Mestriner F, Cunha FQ, Silva JS (2000) *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* **102**: 3003-3008

Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W (1986) Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* **13**: 19-30

Mancuso FJ, Almeida DR, Moises VA, Oliveira WA, Mello ES, Poyares D, Tufik S, Carvalho AC, Campos O (2011) Left atrial dysfunction in chagas cardiomyopathy is more severe than in idiopathic dilated cardiomyopathy: a study with real-time three-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* **24**: 526-532

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **115**: 1109-1123

Marin-Neto JA, Rassi A, Jr., Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S, Investigators B (2008) Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *American Heart Journal* **156**: 37-43

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J (2004) Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* **110**: 1443-1449

Martinelli PM, da Silva Camargos ER, Azevedo AA, Chiari E, Morel G, da Silva Machado CR (2006) Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* **130**: 32-40

Martins GA, Cardoso MAG, Aliberti J, Silva JS (1998) Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology letters* **63**: 113-120

Medeiros GA, Silverio JC, Marino AP, Roffe E, Vieira V, Kroll-Palhães K, Carvalho CE, Silva AA, Teixeira MM, Lannes-Vieira J (2009) Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes Infect* **11**: 264-273

Medina FA, Cohen AW, de Almeida CJ, Nagajyothi F, Braunstein VL, Teixeira MM, Tanowitz HB, Lisanti MP (2007) Immune dysfunction in caveolin-1 null mice following infection with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Microbes Infect* **9**: 325-333

Michelin MA, Silva JS, Cunha FQ (2005) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* **111**: 71-79

Miralles MJ, McGinty JW, Martin A (1982) Combined water-soluble carriers for coprecipitates of tolbutamide. *J Pharm Sci* **71**: 302-304

Mitchell JA, Saunders M, Barnes PJ, Newton R, Belvisi MG (1997) Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappaB) activation: role of arachidonic acid. *Mol Pharmacol* **51**: 907-912

Molina-Berrios A, Campos-Estrada C, Lapier M, Duaso J, Kemmerling U, Galanti N, Ferreira J, Morello A, Lopez-Munoz R, Maya JD (2013) Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. *Parasitol Res* **112**: 2731-2739

Moncayo A (2003) Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**: 577-591

Moreira OC, Ramirez JD, Velazquez E, Melo M, Lima-Ferreira C, Guhl F, Sosa-Estani S, Marin-Neto JA, Morillo CA, Britto C (2013) Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica* **125**: 23-31

Moya M, Campana V, Gavotto A, Spitale L, Simes J, Palma J (2002) Hyperfibrinogenemia in rats treated with meloxicam. *Jpn Heart J* **43**: 559-566

Mukherjee S, Machado FS, Huang H, Oz HS, Jelicks LA, Prado CM, Koba W, Fine EJ, Zhao D, Factor SM, Collado JE, Weiss LM, Tanowitz HB, Ashton AW (2011) Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One* **6**: e16959

Muniz-Junqueira MI (2007) Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. *Curr Clin Pharmacol* **2**: 59-73

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB (2012) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* **14**: 634-643

Narjes H, Türck D, Busch U, Heinzel G, Nehmiz G (1996) Pharmacokinetics and tolerability of meloxicam after im administration. *British journal of clinical pharmacology* **41**: 135-139

Nduhirabandi F, Du Toit EF, Blackhurst D, Marais D, Lochner A (2011) Chronic melatonin consumption prevents obesity-related metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. *J Pineal Res* **50**: 171-182

Nelson RJ, Drazen DL (2000) Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann N Y Acad Sci* **917**: 404-415

Novaes RD, Penitente AR, Goncalves RV, Talvani A, Peluzio MC, Neves CA, Natali AJ, Maldonado IR (2013) *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the. *Cardiovasc Pathol*

Oliveira LG, Kuehn CC, Santos CD, Toldo MP, do Prado JC, Jr. (2010) Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. In *Parasite Immunol* Vol. 32, pp 245-251. England

Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM (2000) Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF-beta? *Parasitology Today* **16**: 18-23

Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL (1992) Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8676-8680

Perez-Fuentes R, Guegan JF, Barnabe C, Lopez-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Diaz M, Ramos-Jimenez J, Sanchez-Guillen MD (2003) Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *International Journal for Parasitology* **33**: 293-299

Pinazo M-J, Espinosa G, Gallego M, Luis Lopez-Chejade P, Urbina JA, Gascon J (2010) Case Report: Successful Treatment with Posaconazole of a Patient with Chronic Chagas Disease and Systemic Lupus Erythematosus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **82**: 583-587

Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA (1999) Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* **193**: 90-98

Pinsky DJ, Aji W, Szabolcs M, Athan ES, Liu YP, Yang YM, Kline RP, Olson KE, Cannon PJ (1999) Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **277**: H1189-H1199

Pitt B, Pepine C, Willerson JT (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition and cardiovascular events. *Circulation* **106**: 167-169

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sciences* **55**: PL455-PL460

Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* **1**: 92-100

Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC (2007) Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Annals of tropical medicine and parasitology* **101**: 123-132

Rachid MA, Camargos ER, Barcellos L, Marques CA, Chiari E, Huang H, Tanowitz HB, Teixeira MM, Machado CR (2006) Blockade of endothelin ET(A)/ET(B) receptors favors a role for endothelin during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect* **8**: 2113-2119

Raghavendra V, Singh V, Kulkarni SK, Agrewala JN (2001) Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: Lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Molecular and Cellular Biochemistry* **221**: 57-62

Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**: 1388-1402

Reed SG (1988) In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *The Journal of Immunology* **140**: 4342-4347

Reed SG, Larson CL, Speer CA (1977) Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z Parasitenkd* **52**: 11-17

Reid MB, Li YP (2001) Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* **2**: 269-272

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX (2000) Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **917**: 376-386

Rey L (2001) Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África; Parasitology: parasites and men parasitology diseases in America and Africa.

Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC (2012) Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology* **9**: 576-589

Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, Burmester JK, Sporn MB (1992a) Role of transforming growth-factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes – autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1: *Journal of Clinical Investigation* **90**: 2056-2062

Roberts AB, Vodovotz Y, Roche NS, Sporn MB, Nathan CF (1992b) . Role of nitric-oxide in Antagonistic effects of transforming growth-factor-beta and interleukin-1-beta on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Molecular Endocrinology* **6**: 1921-1930

Rodriguez MI, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Garcia JA, Ortiz F, Acuna-Castroviejo D (2007) Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* **42**: 272-279

Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Jr., Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS (2009) Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol* **104**: 238-246

Rottenberg M, Lindqvist C, Koman A, Segura EL, Orn A (1989) Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol* **30**: 65-72

Santello FH, Frare EO, Caetano LC, AlonsoToldo MP, do Prado JC, Jr. (2008a) Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. *J Pineal Res* **45**: 79-85

Santello FH, Frare EO, dos Santos CD, Alonso Toldo MP, Kawasse LM, Zucoloto S, do Prado JC, Jr. (2007) Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Pineal Research* **42**: 359-363

Santello FH, Frare EO, dos Santos CD, Caetano LC, Alonso Toldo MP, do Prado JC, Jr. (2008b) Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* **45**: 291-296

Santos CD, Loria RM, Oliveira LG, Kuehn CC, Toldo MP, Albuquerque S, do Prado JC, Jr. (2010) Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) and benznidazole treatments during acute infection of two different *Trypanosoma cruzi* strains. In *Immunobiology* Vol. 215, pp 980-986. Netherlands: 2009 Elsevier GmbH

Santos-Buch CA, Teixeira AR (1974) The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J Exp Med* **140**: 38-53

Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Reynaga DD, Ramirez ID, Borges AC, Wallukat G, Schimke I (2011) Cardiac troponin T measured with a highly sensitive assay for diagnosis and monitoring of heart injury in chronic Chagas disease. *Arch Pathol Lab Med* **135**: 243-248

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* **22**: 583-588

Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A (1996) Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology* **43**: 898-905

Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN (1998) Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. *Clinical and Experimental Immunology* **111**: 181-185

Silva JS, Machado FS, Martins GA (2003) The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Frontiers in Bioscience* **8**: S314-S325

Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG (1992) Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of experimental medicine* **175**: 169-174

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG (1991) Regulation of *trypanosoma-cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth-factor-beta (TGF-BETA). *Journal of Experimental Medicine* **174**: 539-545

Silva LHPd, Nussenzweig V (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia clin biol* **20**: 29

Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR (2001) Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **163**: 503-510

Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G (2007) Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* **100**: 140-146

Smyth HF, Jr., Carpenter CP, Weil CS (1950) The toxicology of the polyethylene glycols. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* **39**: 349-354

Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M (1991) Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol* **142**: 117-122

Storr M, Koppitz P, Sibaev A, Saur D, Kurjak M, Franck H, Schusdziarra V, Allescher HD (2002) Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. *Journal of Pineal Research* **33**: 101-108

Suzuki J, Ogawa M, Futamatsu H, Kosuge H, Tanaka H, Isobe M (2006) A cyclooxygenase-2 inhibitor alters Th1/Th2 cytokine balance and suppresses autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* **40**: 688-695

Szczepanik A (2007) Melatonin and its influence on immune system. *Journal of Physiology and Pharmacology* **58**: 115-124

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Michailowsky V, Santos PVA, Murta SMF, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection* **2**: 851-866

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

Tarleton RL (1988) *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol* **140**: 2769-2773

Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb j* **15**: 2057-2072

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR (2006) Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**: 463-491

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS (2002) Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* **18**: 262-265

Thielmann M, Dorge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, van De Sand A, Konietzka I, Buchert A, Kruger A, Schulz R, Heusch G (2002) Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine. *Circ Res* **90**: 807-813

Urbina JA (2009) Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **104**: 311-318

Urbina JA (2010) Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* **115**: 55-68

Uz T, Manev H (1998) Circadian expression of pineal 5-lipoxygenase mRNA. *Neuroreport* **9**: 783-786

van Griensven J, Balaseqaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **10**: 184-194

Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS (2009) Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* **47**: 184-191

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity* **62**: 5177-5182

Villalta F, Dobish MC, Nde PN, Kleshchenko YY, Hargrove TY, Johnson CA, Waterman MR, Johnston JN, Lepesheva GI (2013) VNI Cures Acute and Chronic Experimental Chagas Disease. In *J Infect Dis*.

Vinhaes MC, Dias JC (2000) [Chagas disease in Brazil]. *Cad Saude Publica* **16 Suppl 2**: 7-12

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* **144**: 724-734

Wen J-J, Gupta S, Guan Z, Dhiman M, Condon D, Lui C, Garg NJ (2010a) Phenyl-alpha-tert-butyl-nitrone and Benzonidazole Treatment Controlled the Mitochondrial Oxidative Stress and Evolution of Cardiomyopathy in Chronic Chagasic Rats. *Journal of the American College of Cardiology* **55**: 2499-2508

Wen JJ, Gupta S, Guan Z, Dhiman M, Condon D, Lui C, Garg NJ (2010b) Phenyl-alpha-tert-butyl-nitrone and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic Rats. *J Am Coll Cardiol* **55**: 2499-2508

Zaslavskaia RM, Shcherban EA, Lilitsa GV, Logvinenko SI (2010) [Melatonin in the combined treatment of cardiovascular diseases]. *Klin Med (Mosk)* **88**: 26-30

Zhang HJ, Akbar M, Kim HY (1999) Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *Biochemical Journal* **344**: 487-493

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1299.53.0) intitulado: "Potenciais Ações Terapêuticas da Associação Melatonina-Meloxicam sobre a Cardiomiopatia Chagásica Crônica em Ratos Wistar Infectados pela Cepa Y de *T. cruzi*", de autoria de **Luiz Gustavo Rodrigues Oliveira** e de **José Clóvis do Prado Junior**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado *ad-referendum* da reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais..

Ribeirão Preto, 26 de novembro de 2009

Presidente da CEUA
 Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
 Maria Angélica S. Depiro