

COMPARAÇÃO DAS LESÕES CARDÍACAS NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM ANIMAIS SENSÍVEIS E RESISTENTES À INFECÇÃO TRATADOS COM INIBIDOR DE CICLOOXIGENASE-2

(COMPARISON OF INJURY IN CARDIAC DISEASE IN EXPERIMENTAL ANIMALS CHAGES SENSITIVE AND RESISTANT INFECTION TREATED WITH CYCLOOXIGENASE-2)

Douglas Reis Abdalla^{2,3}; Eduardo Elias Vieira de Carvalho^{1,3}; Ennio da Silveira Scarpellini¹; Dayana Pousa Siqueira Abraão^{1,3}; Mara Rosa³; George Kemil Abdalla³.

1 – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP – Ribeirão Preto – SP.
carvalhoev@usp.br; ennioss@gmail.com

2 – Universidade Federal do Triangulo Mineiro – Uberaba – MG.
abdalladr@hotmail.com

3 – Faculdade de Talentos Humanos – Uberaba – MG.
mrosa@facthus.edu.br; dpsiqueira@facthus.edu.br; gkabdalla@facthus.edu.br

Abstract: *This study aimed to evaluate cardiac lesions in BALB/c and C57BL/6 mice to see which would be sensitive to infection with T. Cruzi. We used a 15 Balb/c and 15 C57BL/6 mice were divided into 3 groups by lineage: GI (no infection/no treatment), GII (infected/untreated) and GIII (infected/treated). Cardiac inflammatory infiltrate and measurements of NO and PGE2 in cultures of spleen was analyzed. Animals Balb/c has higher peak parasitemia, inflammatory infiltrates and measurements of NO and PGE2, but to treat them with etoricoxib in both lineages positive response there. It was concluded that both strains exhibit profiles response to infection with T. cruzi similar, but the lineage C5BL/6 shows basal levels of inflammatory mediators smaller.*

Keywords: *Trypanosoma cruzi, C57BL/6, BALB/c, inflammation, PGE2.*

Resumo: *Objetivou-se avaliar lesões cardíacas de camundongos BALB/c e C57BL/6 para verificar qual linhagem seria sensível à infecção com T. Cruzi. Utilizou-se de 15 Balb/c e 15 C57BL/6, divididos em 3 grupos por linhagem: GI (sem infecção/sem tratamento); GII (com infecção/sem tratamento); e GIII (com infecção/com tratamento). Foi analisado infiltrado inflamatório cardíaco e dosagens de NO e PGE2 nas culturas esplênicas. Animais Balb/c tem maiores picos de parasitemias, infiltrados inflamatórios e dosagens de NO e PGE2, porém ao tratá-los com etoricoxib em ambas linhagens há resposta positiva. Conclui-se que ambas as linhagens apresentam perfis de resposta à infecção com T. Cruzi similares, porém a linhagem C5BL/6 apresenta níveis basais de mediadores inflamatórios menores.*

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi, C57BL/6, BALB/c, inflamação, PGE2.*

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas representa um problema de saúde pública significativa em muitas regiões das Américas. Sendo considerada uma doença endêmica, transmitida pelo inseto *Triatoma infestans* conhecido no Brasil como “barbeiro” (Coura, 2007).

As pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* desenvolvem formas clínicas variadas. Na fase aguda da doença há presença de intensa parasitemia, e inflamação local, já na fase crônica parasitas circulantes não são observados, mas se tem dano de tecido (Prata, 2001).

Para que o *Trypanosoma cruzi* consiga sobreviver no hospedeiro ele precisa de uma variedade de mecanismos de escape, fazendo a supressão da resposta imune (Ouassiss et al., 2001). Apesar destas respostas imunes serem protetoras elas raramente são alcançadas nos indivíduos chagásicos, e a sobrevivência do parasita no hospedeiro estabelece uma infecção crônica de vida longa (Rodrigues, 2009). Na doença de Chagas o NO é sintetizado a partir da iNOS, e ele é liberado durante a fase aguda da infecção com a função de eliminar o *Trypanosoma cruzi*. O NO tem uma função tripanomicida (Noel et al., 2004).

A Cicloxigenase 2 tem importante função pois é ela que media a síntese de prostaglandinas, que são intermediários importantes no desenvolvimento de inflamação e dor. A droga Etoricoxib é um anti-inflamatório não esteróide (NSAIDs), inibidor seletivo da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) (Latimer, 2009). Etoricoxib mostrou potente, dependente da dose de eficácia, semelhante a outros AINES em modelos animais na inflamação aguda (Riendeau et al., 2001). O tratamento com Etoricoxib em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* reduziu a síntese de PGE₂, sugerindo a inibição da COX-2 (Abdalla et al., 2008).

Objetivo desse estudo foi comparar camundongos da linhagem BALB/c com C57BL/6, verificando qual é o grupo mais sensível ou resistente à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais foram mantidos no biotério, à temperatura de 20 a 26°C e umidade entre 45 e 55%. A alimentação foi feita com ração comercial de composição conhecida e água oferecida *ad libitum*. Foram utilizados 30 camundongos, da linhagem BALB/c e C57BL/6 sendo todos machos, jovens, com 12 semanas, pesando entre 20 e 30g, mantidos em grupos. Para produzir a infecção chagásica, foi utilizada a cepa Y com inóculo foi ajustado para a concentração de 3×10^2 tripomastigotas sanguíneos, administrado por via intraperitoneal. Os animais foram divididos em 6 grupos e tratados conforme protocolo descrito abaixo no quadro I.

A parasitemia dos vários grupos experimentais infectados com *Trypanosoma cruzi* foi determinada utilizando-se 5 µl de sangue da veia caudal de cada animal, até 21 dias após infecção. No 21º dia de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, os animais foram sacrificados e os corações retirados. Para o processamento, foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, após terem sido lavados em soro fisiológico.

Para o estudo microscópico, todos os fragmentos fixados do coração foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia obtendo-se cortes seriados com 5µm de espessura em lâminas previamente tratadas com adesivo (poli-L-lisina). Foi realizada a contagem de infiltrado inflamatório em 40 campos com a objetiva de 40 vezes de cada lâmina, sendo utilizado um microscópico óptico, com uma câmera aclopada, esta imagem foi projetada em um quadro onde continham cruces, o critério utilizado foi baseado no software Imagem J.

Quadro I - Protocolo de tratamento dos animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

| GRUPO | BALB/ c | C57BL/ 6 |
|--|---------------------------------|-------------------------|
| GI Controle Negativo | - | - |
| GII Infectado Sem Tratamento | PBS (solução salina) | PBS(solução salina) |
| G III Infectado Com Tratamento | Etoricoxib 0,6 mg/Kg por dia | Etoricoxib 0,6 mg/Kg |

Os animais dos diversos grupos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tiveram os baços removidos e realizado o lavado peritonela. Após a homogeneização e lavagem das células esplênicas e macrófagos, por centrifugação com RPMI 1640, estas foram contadas e suspensas em RPMI completo. A seguir estas células foram distribuídas em placas de 24 orifícios de fundo plano em uma concentração de 1×10^6 células/orifício em um volume de 1,0 ml e estimuladas com Con-A em uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, após 24h de incubação das referidas células com Con-A a 37°C e 5% de CO_2 .

As determinações das concentrações de PGE_2 nas várias amostras armazenadas foram realizadas utilizando a técnica de radioimunoensaio competitivo. A produção de NO foi determinada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Às amostras foram adicionados o mesmo volume de reagentes de Griess, que contém NEED 0,1% e sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 5%. A reação foi lida em leitor de ELISA utilizando filtro de 540 nm. A curva padrão varia de 0,39 a 200 μM de nitrito de sódio.

Os dados para cada variável foram testados quanto à normalidade de distribuição. Para as variáveis em que a distribuição foi considerada normal, testes paramétricos foram realizados. Para comparações de dados distribuídos normalmente, t de Student foram utilizados os testes para dois grupos de comparações e análises de variância (ANOVAs) foram utilizados para comparações entre três ou mais grupos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As proporções foram comparadas pelo teste de χ^2 . As diferenças observadas foram consideradas significativas quando foi menor do que 0,05 (5%).

RESULTADOS

Na parasitemia de camundongos da linhagem BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, foi analisadas a quantidade de tripomastigotas presente do 5 ao 19 dias, tanto o grupo PBS quanto o grupo Etoricoxib teve um maior pico observado no 9º dia, mas houve aumento significativo de tripomastigotas no grupo PBS do que no Etoricoxib. A parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com *Trypanosoma cruzi*, observou-se significativamente maiores níveis de tripomastigotas no grupo PBS do que no grupo Etoricoxib, também visto que ambos os grupos apresentaram pico no 9º dia após a infecção (Figura 1).

Na quantificação de leucócitos no tecidos cardíacos de camundongos da linhagem BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi* foi verificado que no grupo controle, a quantificação de infiltrados inflamatórios estavam diminuídas, enquanto que no grupo PBS, esta é maior apresentando uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$), comparando ao grupo Etoricoxib, as concentrações estão menores que as do grupo PBS, mas maiores que o grupo controle. Quanto à quantificação de leucócitos no tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *Trypanosoma cruzi*, foi observado que o grupo PBS tinha os maiores níveis enquanto que Etoricoxib tinha níveis menores apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), e que o grupo controle tinha níveis menores que o grupo PBS e

Etoricoxib, mas quando comparado grupo controle e PBS observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) (Figura 2).

Na quantificação de leucócitos no tecidos cardíacos de camundongos da linhagem BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi* foi verificado que no grupo controle, a quantificação de infiltrados inflamatórios estavam diminuídas, enquanto que no grupo PBS, esta é maior apresentando uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$), comparando ao grupo Etoricoxib, as concentrações estão menores que as do grupo PBS, mas maiores que o grupo controle.

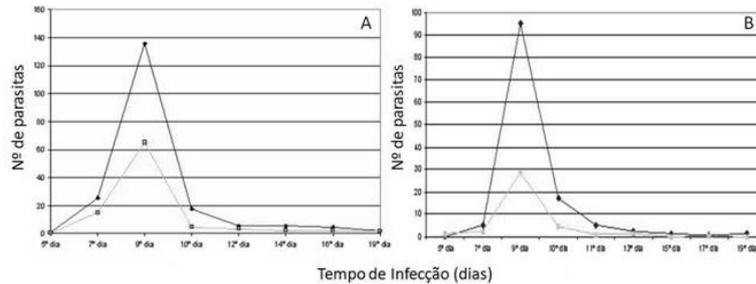


Figura 1 – Pico de Parasitemia de camundongos (A) linhagem BALB/c e (B) C57BL/6, no intervalo de 5 a 19 dias após a infecção. (—◆—) Camundongos do GII e (—■—) Camundongos do GIII.

Quanto à quantificação de leucócitos no tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *Trypanosoma cruzi*, foi observado que o grupo PBS tinha os maiores níveis enquanto que Etoricoxib tinha níveis menores apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), e que o grupo controle tinha níveis menores que o grupo PBS e Etoricoxib, mas quando comparado grupo controle e PBS observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) (Figura 2).

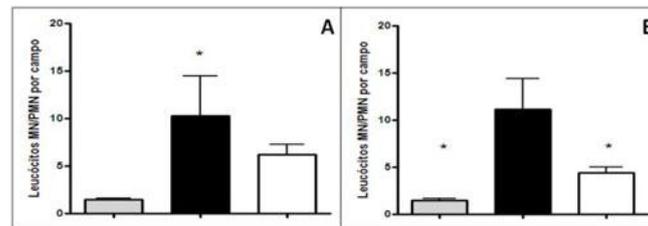


Figura 2 - Quantificação de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco (A) linhagem BALB/c e (B) C57BL/6. (■) GI, (■) GII, (□) GIII. Em (A) * $p < 0,01$ vs. GI e (B) * $p < 0,01$ vs. GII

A produção de óxido nítrico obtido de camundongos da linhagem BALB/c infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, se mostrou maiores no grupo Etoricoxib, visto que comparado ao grupo PBS não teve variações significativas, e no grupo controle teve menores concentrações. Em camundongos C57BL/6, os níveis de Óxido nítrico se encontram em seus níveis basais no grupo controle, sendo que nos grupos PBS e Etoricoxib estes níveis se encontraram diminuídos quando comparados ao controle, mas que entre o grupo PBS e Etoricoxib não houve variações tão consideráveis (Figura 3).

A concentração de PGE_2 de camundongos da raça BALB/c, infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, foi expressa em ng/ml, e observou-se que no grupo PBS teve maiores níveis quando comparado com o grupo Etoricoxib, e grupo controle. Os níveis de PGE_2 de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, tiveram maiores níveis no grupo PBS, seguido do grupo controle, e que o grupo Etoricoxib tiveram os menores níveis (Figura 4).

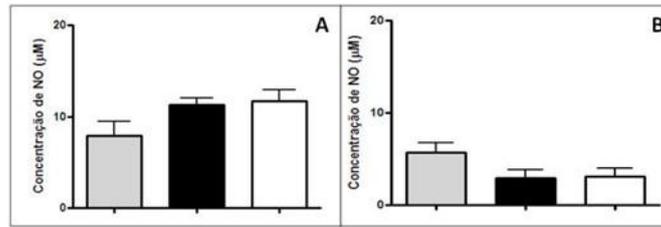


Figura 3 - Quantificação de NO (A) linhagem BALB/c e (B) C57BL/6. (■) GI, (■) GII, (□) GIII.

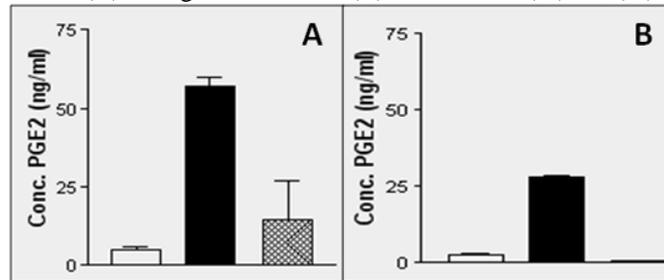


Figura 4 - Quantificação de PGE2 (A) linhagem BALB/c e (B) C57BL/6. (■) GI, (■) GII, (□) GIII.

DISCUSSÃO

A diferença na suscetibilidade para infecção pelo *Trypanosoma cruzi* pode ser devida ao comportamento específico de cada linhagem, BALB/c e C57BL/6, apresentados padrões de resposta imune particulares quantitativamente e/ou qualitativamente. O comprometimento miocárdico é devido a uma intensa reação inflamatória que pode ser observado na correlação entre a presença de *Trypanosoma cruzi* e a intensidade da inflamação que foi gerada. Neste trabalho é mostrado que camundongos de diferentes linhagens seriam mais sensíveis ou não à infecção da doença de Chagas.

Neste experimento foi realizada a parasitemia para o controle da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. O grupo BALB/c foi observado que, o pico de parasitemia ocorreu no 9º, o mesmo ocorre na linhagem de camundongos C57BL/6. E comparando as duas linhagens nota-se que as parasitemias dos camundongos BALB/c são mais elevadas quando comparadas com C57BL/6. Nos experimentos de Roggero (2002), os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados com a cepa Tulahuén, a parasitemia de ambas as linhagens tanto no 7, 14 e 21 dias após a infecção não demonstraram diferenças significantes.

A quantificação de infiltrado inflamatório tanto no grupo PBS quanto Etoricoxib estão aumentados quando comparado com o grupo controle. E comparando os grupos infectados, o PBS está maior do que o grupo Etoricoxib, assim sugere-se que este anti-inflamatório inibe a enzima cCOX-2 e posteriormente a síntese de PGE₂, que é uma molécula imunoreguladora da resposta imune, aumentam-se o padrão de resposta Th₁ mais Óxido nítrico é sintetizado, e esta molécula tem função efetora tripanomicida. Estes resultados vão de encontro aos de Cuervo *et al.*, (2008), evidenciando que na quantificação de DNA de *Trypanosoma cruzi* em tecido cardíaco de camundongos de diferentes linhagens, observou-se que camundongos BALB/c eram estatisticamente maior, reforçando que a linhagem C57BL/6 seria mais resistente à infecção e acarretando menor formação de infiltrado inflamatório.

Na dosagem da concentração de óxido nítrico comparando o grupo PBS com o Etoricoxib da linhagem BALB/c, estes níveis estavam no mesmo patamar, porém quando comparado ao grupo controle estes níveis estavam mais altos. Na linhagem C57BL/6 ocorreu o contrário, os níveis de óxido nítrico nos grupos PBS e Etoricoxib foram menores quando comparado ao grupo controle, propõe-se que este fato esteja relacionado a uma resposta à infecção em um período mais breve a 21 dias, sugerindo que a linhagem C57BL/6 apresenta de modo natural, sem auxílio terapêutico, efetividade de resposta ao *Trypanosoma cruzi*.

Estes resultados são divergentes de Costa *et al.* (2008), em relação a concentração de NO no período de 21 dias, que relata uma resistência de camundongos C57BL/6 em virtude de alta produção de NO. Em estudos de Cardoni e Antúnez (2004), comparando camundongos C3H e BALB/c, a linhagem resistente C3H teve uma produção mais alta de NO e de forma antecipada quando comparado com camundongos BALB/c, estando indo de encontro aos nossos resultados.

Como a prostaglandina tem um efeito imunomodulador na resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, foi realizada a sua dosagem. Na linhagem de camundongos BALB/c a concentração basal de PGE₂ no grupo controle esta próxima a zero, já no grupo PBS os níveis estão aumentados enquanto que Etoricoxib está diminuídos, visto que o anti-inflamatório inibe a sua síntese. Comportamento este visto na linhagem C57BL/6, mas estes camundongos apresentaram níveis menores. Em estudos de Cuervo *et al.*, (2008), verificou-se que os níveis de citocinas de padrão Th₂ e PGE₂ eram mais altas em camundongos BALB/c do que em C57BL/6. Desta forma, Conclui-se que a linhagem BALB/c seria mais sensível em relação à linhagem C57BL/6 a resistente na infecção experimental da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- Coura JR. Chagas Disease: what is known and what is needed – A background article. Mem. Inst Oswaldo Cruz, v.102 (Supl. I), p.113-122, nov. 2007.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Disease, v.1, n.2, p.92-100, set. 2001.
- Ouaisi ASAC, Guevara AG, Borges M, Guilvard E. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.1. n.1, p.11–17, jan. 2001.
- Rodrigues MM et al. Swimming against the current: genetic vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.104 (Supl1), p.281-287, Jul. 2009.
- Noël W et al. Alternatively activated macrophages during parasite infections. Trends parasitol, v.20, n.3, p.126-133, Mar. 2004.
- Latimer N, et al. Cost effectiveness of COX 2 selective inhibitors and traditional NSAIDs alone or in combination with a proton pump inhibitor for people with osteoarthritis. BMJ 2009; 339:b2538. doi: 10.1136/bmj.b2538
- Riendeau D et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. J. Pharmacol, v.296, n.2, p.558-566, Fev. 2001.
- Abdalla GK et al. *Trypanosoma cruzi*: The role of PGE₂ in immune response during the acute phase of experimental infection. Experimental Parasitology, v.118, n.4, p.514-21, Abr. 2008.
- Roggero E et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. Clin Exp Immunol, v.128, n.3, p. 421–428, Jun. 2002.
- Cuervo H et al. Inducible Nitric Oxide Synthase and Arginase Expression in Heart Tissue during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice: Arginase I Is Expressed in Infiltrating CD68+ Macrophages. Journal of Infectious Diseases, v.197, n.12, p.1772– 1782, Jun. 2008.
- Costa V MA et al. Type I IFNs Stimulate Nitric Oxide Production and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. The Journal of Immunology, v.177, n.5, p.3193–3200, Set. 2006.
- Cardoni RL, Antúnez MI. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Mediators of Inflammation, 13, n.4, p.235-240, Ago. 2004.