



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



I

Monografia

Estudo funcional da Galectina e de seu inibidor na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica

Paulo Chenaud Neto

Salvador (Bahia)
Outubro, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA (Biblioteca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Neto, Paulo Chenaud

Estudo funcional da Galectina e de seu inibidor na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica / Paulo Chenaud Neto – Salvador, Bahia: P, Neto. 2016.

VIII, 24p: Il.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Professor orientador: Simone Garcia Macambira

Palavras-chaves: 1. Galectina; 2. Inibidor de Galectina; 3. Avaliação Cardíaca; 4. Cardiomiopatia Chagásica Crônica. I. Macambira, Simone Garcia. II Universidade Federal da Bahia III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Estudo funcional da Galectina e de seu inibidor na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica

Paulo Chenaud Neto

Professora orientadora: **Simone Garcia Macambira**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2016.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Agosto, 2016

Monografia: *Estudo funcional da Galectina e de seu inibidor na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica*, de **Paulo Chenaud Neto**.

Professor orientador: **Simone Garcia Macambira**

COMISSÃO REVISORA:

- **Simone Garcia Macambira** (Professora orientadora) Professora do Departamento de Bio-função do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Alexandre Ribeiro do Espírito Santo**, Professor do Departamento de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Luciana Lyra Casais Silva**, Professora do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Membro suplente

- **Victor Diógenes Amaral da Silva**, Professor do Departamento de Bio-função do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no X Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ____ de _____ de 2016.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar).

Aos meus amados pais,
Eliana Bloizi e Paulo
Chenaud, e à minha querida
irmã, **Érica Chenaud**

EQUIPE

- Paulo Chenaud Neto, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: p_chenaud@hotmail.com;
- Simone Garcia Macambira, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA;
- Milena Botelho Pereira Soares, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ;
- Bruno Solano, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ;
- Pâmela Santana Daltro, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

- Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)
- Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI)

HOSPITAL SÃO RAFAEL

- Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC)

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
2. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e
3. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

AGRADECIMENTOS

- À minha Professora orientadora, Doutora **Simone Garcia Macambira**, pela constante presença e pelas orientações nesta etapa de formação acadêmica, bem como no âmbito pessoal.
- À Doutoranda **Pâmela Santana Daltro**, pela paciência nas orientações científicas e de convivência.
- Ao Doutorando **Bruno Solano**, pelo acolhimento no laboratório e nos conselhos quando solicitado.
- À Doutora **Milena Botelho**, por fornecer os meios pelos quais o estudo foi feito.
- Aos meus Colegas **Pedro Humberto Félix, Breno Barreto, Dulce Santana e Poliana Mendes**, pela gratificante ajuda em todas as etapas de elaboração desta monografia.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	3
I. RESUMO	4
II. OBJETIVOS	5
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
IV. METODOLOGIA	8
V. RESULTADOS	10
VI. DISCUSSÃO	15
VII. CONCLUSÃO	17
VIII. SUMMARY	18
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
X. ANEXOS	22
Anexo I	23
Anexo II	24

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

FIGURA 1. Teste ergométrico no período pré-tratamento.	10
FIGURA 2. Teste ergométrico no período pós-tratamento.	11
FIGURA 3. Eletrocardiograma no período pré-tratamento de animais não infectados.	11
FIGURA 4. Eletrocardiograma no período pré-tratamento de animais chagásicos.	12
FIGURA 5. Eletrocardiograma no período pós-tratamento com N-LAC.	12
FIGURA 6. Eletrocardiograma no período pós-tratamento com solução salina.	13

TABELAS

TABELA 1. Arritmias no período pré-tratamento.	13
TABELA 2. Arritmias no período pós-tratamento.	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLAS

CCC Cardiomiopatia chagásica crônica

DC Doença de Chagas

GCS-F Fator estimulador de colônia de granulócito

IFN Interferon

N-lac N-acetil-D-lactosamina

CTRL Controle

CEUA-CPqGM Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

DP Desvio padrão

ECG Eletrocardiograma

BAV Bloqueio atrioventricular

BAVT Bloqueio atrioventricular total

TVS Taquicardia ventricular sustentada

DAV Dissociação atrioventricular

DCIA Distúrbio de condução intra-atrial

DCIV Distúrbio de condução intraventricular

ABREVIATURAS

T. Cruzi *Trypanosoma cruzi*

I. RESUMO

Estudo funcional da Galectina e de seu inibidor na progressão da Cardiomiopatia Chagásica Crônica. A doença de Chagas afeta cerca de 18 milhões de pessoas na América Latina e é uma das maiores causas de morte por falência cardíaca. Cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* evolui para cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), doença de curso fatal que tem como única opção terapêutica o transplante cardíaco. Neste cenário, destaca-se a busca por alvos moleculares que possam contribuir para o desenvolvimento de fármacos que não apenas previnam, mas também atuem de forma eficaz para a regeneração estrutural e funcional do miocárdio. Um destes alvos pode ser a Galectina, que atua como um co-receptor, envolvendo diversas vias intracelulares, participando do processo de transdução de sinal. Portanto, baseado no exposto e em trabalhos prévios do nosso laboratório que apontam a relevância do uso de fatores de crescimento no tratamento da CCC, este estudo investigou se a Galectina exerce algum mecanismo sobre a progressão da CCC e se sua inibição promove alteração no curso da doença.

Palavras chave: 1. Galectina. 2. Inibidor de Galectina. 3. Avaliação Cardíaca. 4. cardiomiopatia chagásica crônica.

II. OBJETIVOS

PRIMÁRIO

Investigar o papel da Galectina na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica e os efeitos terapêuticos da inibição da molécula de Galectina na cardiomiopatia chagásica crônica em modelo experimental desenvolvido em camundongos.

SECUNDÁRIO

Avaliar a função cardíaca de camundongos chagásicos crônicos tratados e não tratados com inibidor de Galectina por eletrocardiografia e ergometria na progressão da cardiomiopatia.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A doença de Chagas (DC), descoberta por Carlos Chagas em 1909, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. Cruzi*), é um dos principais problemas socioeconômicos e de saúde pública no Brasil, e em outros países latino-americanos. A DC tem sido encontrada em países não endêmicos devido ao contexto mundial de encurtamento das fronteiras espaciais e do grande fluxo migratório, chegando a afetar cerca de 18 milhões de pessoas somente no sul dos Estados Unidos da América até a Patagônia, causando aproximadamente 50.000 mortes por ano e cerca de 100 milhões de pessoas ainda vivem em áreas de risco de contaminação (6). Estes dados epidemiológicos explicitam a importância de investigação e busca por mecanismos que beneficiem os indivíduos portadores da doença e que previnam novas infecções.

Décadas após a infecção primária, cerca de 30% destes indivíduos evoluem para forma mais grave da doença, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC).

A CCC é a manifestação mais grave da doença, de elevada prevalência, causa freqüente de internação hospitalar e indicação de transplante cardíaco (2, 8). Em geral, os indivíduos que evoluem para CCC estão na faixa etária economicamente ativa, refletindo não apenas como um importante problema de saúde pública, mas representando um ônus para o Estado com os custos com internação e aposentadorias precoces. O custo de cada 100 mil pessoas infectadas, incluindo tratamento médico e as ausências no trabalho, ultrapassa cerca de 50 milhões de dólares por ano (33).

A CCC é caracterizada por diversas arritmias, tais como bradicardia e bloqueio na condução átrio-ventricular e, nos casos mais avançados, por insuficiência cardíaca e eventos tromboembólicos, que podem levar à morte súbita (8). As alterações estruturais incluem mionecrose e miocitólise, intensa fibrose intersticial e aneurisma ventricular apical. As manifestações clínicas do paciente portador da CCC incluem fadiga aos esforços físicos, dor precordial, palpitações, edema de membros inferiores, congestão hepática, síncope, aparecimento de tromboembolismo pulmonar e/ou acidentes vasculares cerebrais decorrentes de êmbolos e morte precoce (7).

A grande maioria dos indivíduos acometidos pela CCC está na faixa etária economicamente ativa, representando um grande ônus para o Estado (33). Além disto, a única opção terapêutica para estes pacientes é o transplante cardíaco que representa um procedimento de alto risco de morte, dispendioso, a oferta de órgãos não atende a demanda e, como agravante, implica no uso de imunossupressores após o transplante que pode reativar a parasitemia latente (32). Diante deste cenário, são urgentes investimentos em pesquisas que busquem uma opção terapêutica eficaz para os pacientes portadores da CCC.

A Galectina surge, então, neste cenário de investimentos em intervenções terapêuticas que possam servir de alternativa para melhorar a situação desta doença crônica. Trata-se de uma molécula envolvida no processo de deposição de colágeno e falência cardíaca, sendo secretada por macrófagos ativados do miocárdio durante o processo de remodelamento e é estimulada pelo IFN-gama, o que indica a sua expressão aumentada em processos inflamatórios. Além disso, é responsável pela proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e disfunção ventricular no coração de camundongos (22).

A suprarregulação de genes na CCC envolvidos na modulação miocárdica e no processo de fibrose foi investigada (25), mas ainda sem a citação sobre o gene da Galectina. Com o decorrer de estudos, apontou-se a maior expressão da Galectina na insuficiência cardíaca crônica (29). Em 2011, demonstraram a superexpressão da Galectina em coração de camundongos chagásicos em comparação aos controles (26). Em 2013, evidenciaram a diminuição da expressão de Galectina nos animais tratados com o fator estimulador de colônia de granulócito (GCS-F) (32). Portanto, a utilização do inibidor direto de Galectina (N-lac) baseia-se em dados da literatura que sugerem a participação desta molécula no comprometimento estrutural e funcional cardíaco em cardiopatias de diferentes etiologias. Portanto, o racional teórico deste estudo em modelo experimental é sustentado no fato de que a inibição da Galectina poderia alterar o processo de remodelamento cardíaco que ocorre na CCC, intervindo na progressão da doença com a recuperação funcional e regeneração estrutural cardíaca. Uma opção terapêutica para os pacientes chagásicos a fim de controlar a evolução da CCC, prevenindo a insuficiência cardíaca, pode surgir neste cenário.

IV. METODOLOGIA

Infecção de camundongos por *T. cruzi*: camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 com 8 semanas de idade foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, obtidos do sobrenadante de cultura de células da linhagem LCC-MK2 infectadas. A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica.

Parasitemia: a parasitemia foi avaliada em diferentes momentos após infecção, através da contagem do número de tripomastigotas nas alíquotas de sangue periférico colocadas entre a lâmina de vidro e a lamínula, utilizadas para análise ao microscópio óptico (3).

Tratamento dos animais chagásicos: Camundongos C57Bl/6 (n=10) na fase crônica da infecção por *T. cruzi* (6 meses pós-infecção) foram tratados por 2 meses com 0,5% N-lac (EcoNugenics, Santa Rosa, CA), inibidor de Galectina, por injeção intraperitoneal 3 vezes por semana. Um grupo controle positivo composto por animais chagásicos (n=9) foi tratado com solução salina 0,9%. Outro grupo controle negativo, que não foi infectado, recebeu apenas água (n=7).

Todos os camundongos foram sacrificados para remoção de coração dois meses após o tratamento, para posterior correlação entre a análise funcional e a avaliação histopatológico do tecido cardíaco.

Avaliação da função cardíaca: a análise funcional foi realizada através de estudo eletrocardiográficos, após a indução de anestesia geral por inalação de isoflurano administrado por circuito anestésico Vevo Compact Anesthesia System (Visual Sonics, Toronto, Canadá), e de ergometria nos camundongos. Os registros eletrocardiográficos foram obtidos pelo equipamento Bio Amp PowerLab que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador para análise no programa Chart 5 para Windows. Os parâmetros adquiridos, através dos ECGs analisados, são a frequência cardíaca, o intervalo PR, o intervalo QT, o QTC, a amplitude de onda P e do complexo QRS e a

presença de arritmias. Para os estudos de ergometria, usou-se o equipamento LE 8700 – CO (Panlab, Barcelona, Espanha). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System. O animal foi colocado na esteira 05 minutos antes de iniciar o exercício. A velocidade inicial foi de 06 cm/s com incrementos na velocidade de 06 cm/s a cada 5 minutos. O teste foi realizado até o animal entrar em exaustão, isto é, permanecer por 10 segundos ou mais na área de choque. Os parâmetros avaliados foram o tempo de exercício e a distância percorrida.

A análise funcional foi feita em dois momentos através de ECG e ergometria: primeiramente, antes do tratamento, para comparação entre animais infectados e não infectados e, posteriormente, antes do sacrifício, para comparação de resultados entre controle negativo (não infectados), controle positivo (infectados e tratados com solução salina) e infectados tratados com o inibidor de Galectina. Após o segundo momento da análise funcional, todos os camundongos foram submetidos à eutanásia.

Considerações éticas: o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CEUA-CPqGM). A pesquisa foi aprovada em 23 de dezembro de 2013 sob parecer 016/2013.

V. RESULTADOS

ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA

1) Ergometria

Infecção por *T. cruzi* compromete a capacidade de realizar atividade física em esteira ergométrica:

Os animais do grupo controle não infectados (n=7) percorreram uma distância média no teste ergométrico de 586.1 ± 224.4 m, enquanto os animais chagásicos (n=19) tiveram um desempenho médio de 288.9 ± 185.8 m.

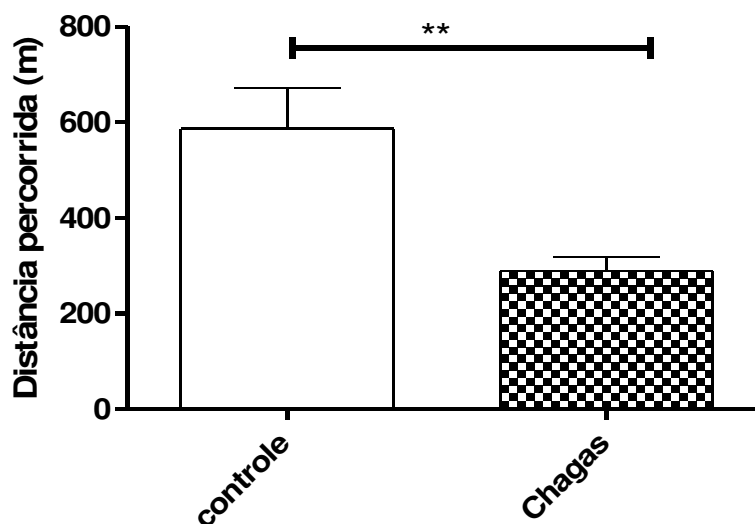


Figura 1. A infecção por *T. cruzi* compromete o desempenho físico dos camundongos em esteira ergométrica avaliado pela mensuração da distância percorrida. Os dados são expressos como média±DP de animais controles e chagásicos. $p < 0,001$.

O tratamento com inibidor de Galectina, N-LAC, não recuperou a capacidade de realizar exercício físico em esteira ergométrica:

Dois meses após o tratamento com N-LAC, inibidor de Galectina, o desempenho ergométrico dos animais chagásicos crônicos (175.1 ± 105.7 m) não melhorou quando comparados com o grupo chagásico tratado com salina (174.5 ± 136.2 m) e com o grupo controle não infectado (784.3 ± 281.3 m).

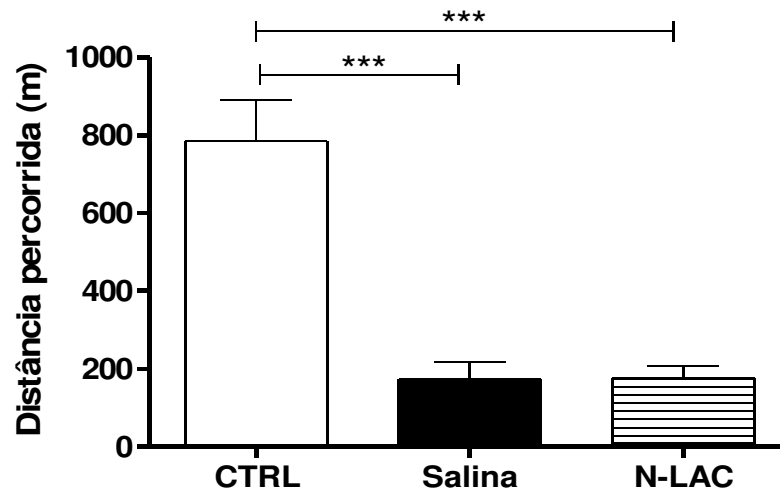


Figura 2. O tratamento dos camundongos chagásicos crônicos com N-LAC não reverteu o comprometimento do desempenho físico em esteira ergométrica avaliado pela mensuração da distância percorrida. Os dados são expressos como média±DP de animais controles, chagásicos e chagásicos tratados com N-LAC . $p < 0,001$.

A infecção por *T. cruzi* induziu alterações cardíacas detectadas pelo eletrocardiograma:

O registro da atividade elétrica cardíaca não detectou alterações nos traçados dos camundongos não infectados (Figura 3). Contudo, 6 meses após a infecção, os camundongos chagásicos crônicos apresentaram diferentes arritmias (Figura 4), incluindo bloqueio atrioventricular de 1° Grau (BAV 1° GRAU), o bloqueio atrioventricular total (BAVT), a taquicardia ventricular sustentada (TVS), o bigeminismo ventricular e a dissociação atrioventricular isorrítmica (Tabela 1).

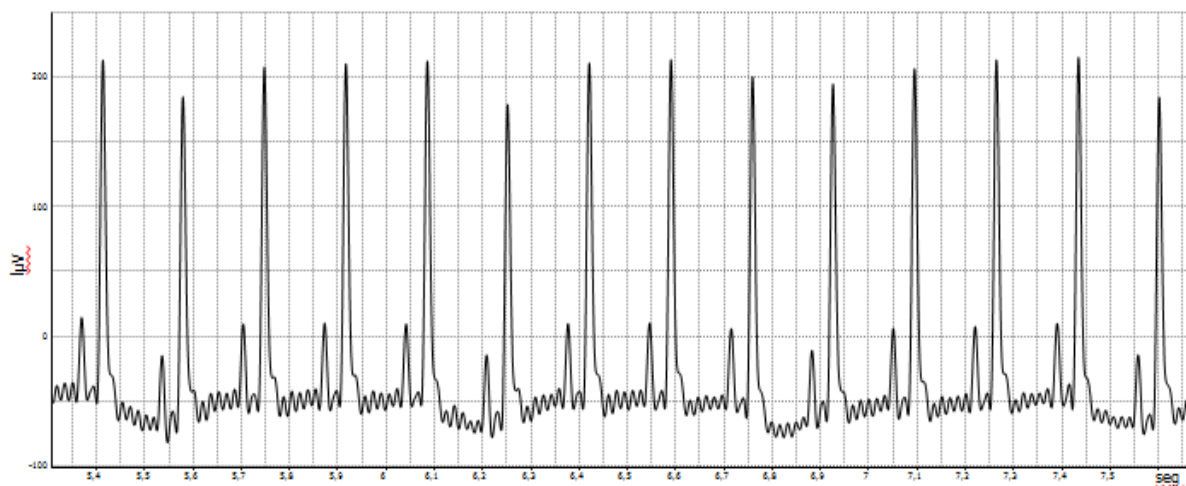


Figura3. ECG de camundongo controle-negativo, sem infecção. Ritmo sinusal normal, com intervalo PR=37ms e intervalo QT=42ms.

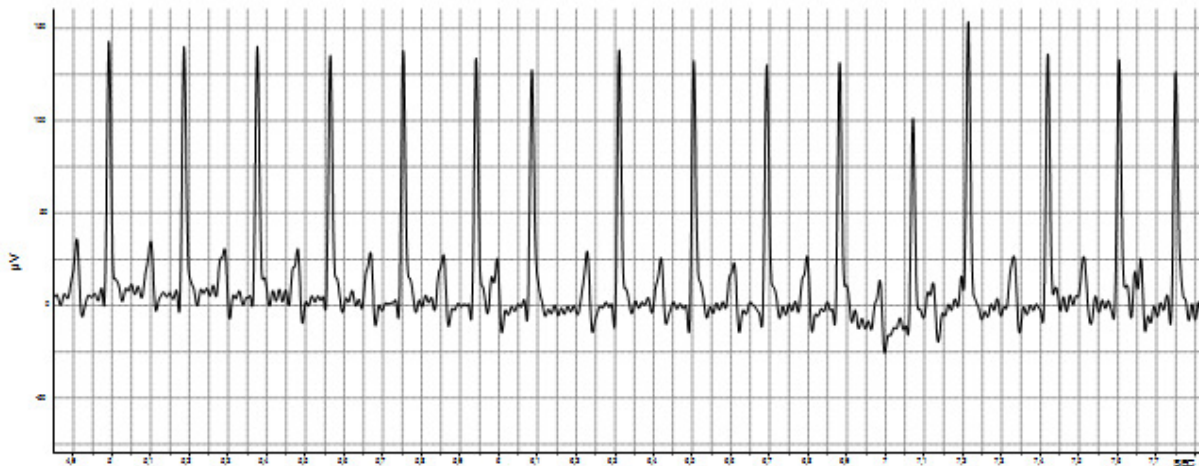


Figura 4. O registro pertence a um animal chagásico antes do tratamento. Observa-se um bloqueio atrioventricular de 1º grau devido ao intervalo P-R ser de 80ms, enquanto o padrão mensurado em camundongos não infectados é de 40ms. Ainda evidencia-se extrassístole atrial pela presença de onda P que sobrepõe o QRS anterior.

O tratamento com inibidor de Galectina, N-LAC, não reverteu as arritmias cardíacas induzidas pela infecção com *T. cruzi*:

Dois meses após o tratamento com N-LAC, não foi observada reversão ou melhora nos distúrbios de condução cardíaca (Figura 5). O mesmo sendo observado no grupo chagásico tratado com salina (Figura 6).

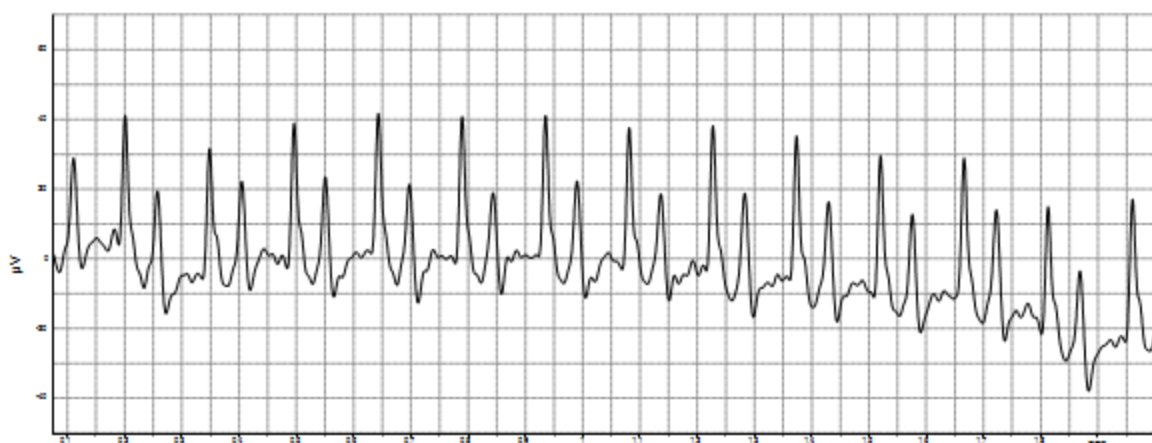


Figura 5. Não houve melhora dos distúrbios de condução após o tratamento com N-LAC. Evidencia-se um bigeminismo ventricular, devido a extrassístoles ventriculares que se inscrevem de maneira regular e repetidamente após cada complexo QRS.

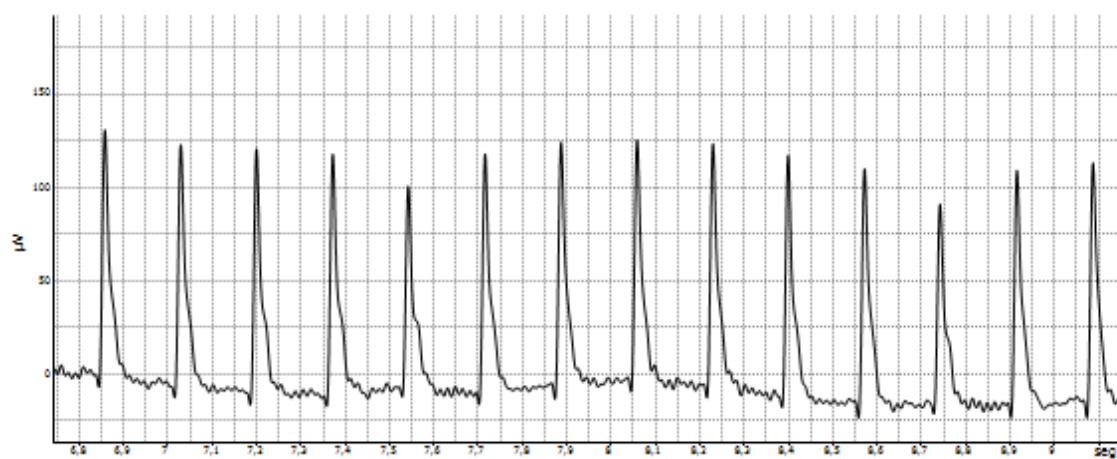


Figura 6. Não houve melhora dos distúrbios de condução após o tratamento com salina. Evidencia-se ritmo juncional com prolongamento de QT=52ms.

Tabela 1 - Arritmias detectadas durante o registro eletrocardiográfico dos camundongos não-infectados (controle negativo) e infectados no período pré-tratamento.

Arritmia / Animais	Controle negativo (n=7)	Chagásicos (n=19)
Sem alterações	-	+
Sobrecarga atrial	-	+
BAV 1º Grau	-	++++++
Ritmo juncional	-	+
BAVT	-	+++++
TVS	-	++
Bigeminismo Ventricular	-	-
DAV isorrítmica	-	++
DCIV	-	+

BAV – bloqueio átrio-ventricular. BAVT - bloqueio átrio-ventricular total. TVS –taquicardia ventricular sustentada. DAV – dissociação átrio-ventricular. As cruzes expressam a quantidade de animais com a arritmia.

As arritmias mais frequentes nos animais chagásicos ainda sem o tratamento foram o bloqueio átrio-ventricular de 1º grau e o bloqueio átrio-ventricular total. Nos animais do grupo controle negativo, não infectados, não foram registradas arritmias durante a realização do eletrocardiograma.

Tabela 2 - Arritmias detectadas durante o registro eletrocardiográfico dos camundongos não-infectados (controle negativo), infectados tratados com salina (controle positivo) e infectados tratados com N-LAC.

Arritmia / Animais	Controle Negativo (n=7)	Salina (n=9)	N-LAC(n=10)
Sem alterações	-	-	-
Sobrecarga atrial	-	+	-
DCIA	-	++	-
Ritmo juncional	-	+	-
BAV 1º Grau	-	+++	++
BAVT	-	++	+++
TVS	-	+	-
Bigeminismo Ventricular	-	-	+++
DAV isorrítmica	-	+	-
DAV	-	+	-
DCIV	-	+	-
Arritmia complexa	-	-	++

BAV – bloqueio átrio-ventricular. BAVT - bloqueio átrio-ventricular total. TVS – taquicardia ventricular sustentada. DAV – dissociação átrio-ventricular. DCIA – distúrbio de condução intra-atrial. DCIV – distúrbio de condução intraventricular. As cruces expressam a quantidade de animais com a arritmia.

As arritmias mais frequentes entre os camundongos chagásicos independente do tratamento com salina ou N-LAC são bloqueio átrio-ventricular de 1º grau e bloqueio átrio-ventricular total. O distúrbio de condução intra-atrial foi observado apenas no grupo tratado com salina e o bigeminismo ventricular foi observado apenas no grupo tratado com N-LAC. Nos animais do grupo controle negativo, não infectados, não foram registradas arritmias durante a realização do eletrocardiograma.

VI. DISCUSSÃO

Uma característica importante do modelo camundongo é a heterogeneidade do curso e intensidade da infecção, bem como das lesões em diferentes populações (linhagens, cepas), que se expressa na distinção entre modelos resistentes e susceptíveis a condições similares de infecção. Essa característica é apontada desde a década de 40 (10, 20). Em relação à cepa do *T. cruzi* sabe-se que há uma grande diversidade genética intraespecífica, demonstrada por diferentes técnicas bioquímicas e moleculares, se tratando na realidade de um complexo heterogêneo de subpopulações (12). Neste estudo, utilizou-se a cepa Colombiana de por conta de seu tropismo muscular e pela capacidade de induzir cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos C57Bl/6 (4, 19). Assim, os padrões de resistência e susceptibilidade à infecção, medidos através de taxas de mortalidade, tempo de sobrevivência e níveis de parasitemia, bem como o dano tecidual, dependem da conjunção da linhagem do camundongo e cepa do parasita (1).

A linhagem C57Bl/6 vem sendo utilizada ante diferentes cepas e clones do *T. cruzi*, por muitos grupos (21, 24, 30). Em diversos trabalhos do Laboratório esta linhagem de camundongo tem sido utilizada como modelo de cardiomiopatia chagásica crônica, visto que este camundongo desenvolve alterações cardíacas estruturais e funcionais características da doença em humanos (27, 18, 17, 32). Baseado nestes estudos que demonstraram a cronificação da doença de Chagas nesta linhagem de camundongos e nos demais que apontam a linhagem C57Bl/6 como susceptível à infecção pelo *T. cruzi* (31, 28), utilizamos esta linhagem e a cepa Colombiana de *T. cruzi* para avaliar o efeito da inibição da Galectina na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica.

No que concerne a patogênese da CCC, muito há ainda para ser investigado como, por exemplo, o papel de biomarcadores nesta cardiomiopatia durante o processo de remodelamento cardíaco. A possível participação da Galectina na progressão da lesão tecidual em diferentes órgãos como rim, pulmão e coração foi demonstrada anteriormente (11, 13, 23, 15). Em relação a CCC, detectou-se uma elevada expressão de Galectina em camundongos chagásicos crônicos quando comparados aos animais não infectados (26). A possível participação da Galectina na progressão da CCC foi

demonstrada (32), quando detectaram que o tratamento de camundongos chagásicos crônicos com GCS-F induz a diminuição da expressão da Galectina, concomitante com a recuperação estrutural do miocárdio. Assim, a inibição desta molécula, com o intuito de diminuir efeitos danosos provocados por sua ação, poderia fomentar uma nova etapa na busca de estratégias terapêuticas para a doença de Chagas. Neste intuito, utilizou-se o N-LAC que apresenta alta afinidade pela Galectina, inibindo-a.

Seis meses pós-infecção, foi observado que os camundongos apresentaram arritmias cardíacas graves características da progressão do comprometimento cardíaco (2, 22, 9). Estas alterações podem ter sido um fator agravante para a redução da capacidade de realizar atividade física dos animais infectados, como demonstrado durante o teste ergométrico.

O tratamento com N-LAC não reverteu os distúrbios cardíacos elétricos dos camundongos chagásicos crônicos. A partir destes resultados, sugere-se que a Galectina talvez não seja o melhor alvo molecular para intervenção terapêutica como um agente cardioprotetor. Contudo, já foi demonstrado que camundongos knockout para o gene da Galectina ou a inibição farmacológica da Galectina em camundongos selvagens, ambos submetidos a sobrecarga de pressão por injeção de angiotensina II, apresentam melhora na disfunção cardíaca (5). Esta controvérsia dos resultados pode ser atribuída à diferença dos modelos experimentais utilizados nos dois estudos e, também, o grau de comprometimento cardíaco devido ao remodelamento.

O desempenho ergométrico dos animais infectados também não melhorou após a administração de N-LAC. O baixo rendimento dos animais chagásicos, tanto dos tratados com N-LAC como os tratados com salina, em comparação com o grupo de controle-negativo pode ser decorrente de comprometimento cardíaco consequente da cardiomiopatia chagásica crônica (16), bem como de um possível infiltrado inflamatório que comprometeu o tecido muscular esquelético (14).

VII. CONCLUSÃO

A administração do inibidor de Galectina, N-LAC, não foi capaz de reverter o comprometimento cardíaco e físico dos camundongos chagásicos crônicos, sugerindo que a Galectina não é o alvo farmacológico mais adequado para prevenção e tratamento da cardiomiopatia chagásica crônica.

VIII. SUMMARY

Functional study of Galectin and its inhibitor in progression of chronic chagasic cardiomyopathy. Chagas disease affects about 18 million people in Latin America and it is one of the main causes of death due to heart failure. About 30% of the infected individuals with *T. cruzi* evolves to chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), that is a fatal course disease whose only therapeutic option is cardiac transplantation. In this scenario, it stands to search for molecular targets that can contribute to development of drugs that not just prevent, but also act effectively for the structural and functional regeneration of the myocardium. One of these targets can be the Galectin, that acts as a co-receptor, involving several intracellular pathways, participating in the signal transduction process. Therefore, based on the exposed and previous of our laboratory jobs, that point to the relevance of growth factors use in CCC treatment, this study investigated if the Galectin exerts some influence on CCC progression and if its inhibition promotes change in the course of this disease.

Keywords: 1. Galectin. 2. Galectin Inhibitors. 3. Cardiac Evaluation. 4. chronic chagasic cardiomyopathy.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade ZA. A patologia da doença de Chagas no homem. *Annales de la Societe Beige de Medecine Tropicale*. 1985. 65 (Suppl.): 15-30.
2. Bocchi EA, Bellotti G, Mocelin A, Uip D, Bacal F, Higuchi ML. Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. *Ann. Thorac. Surg.* 1996; 61:1727–1733.
3. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1973; 27:347–382.
4. Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 1ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1979; 89-151.
5. De Boer MD, Yu LMD, Willem PT, Ruifrok MD, Meissner M, Elke MB et al. Genetic and pharmacological inhibitor of Galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *American Heart Association*. 2013, 6: 107-117.
6. Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann O, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Química Nova*. 2009; 32:2444-2457.
7. Federici EE, Abelmann WH, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964; 13: 272–280.
8. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira L. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *American Society of Microbiology*. 2003; 71(3):1185-1193.
9. Gomes J de AS, Fares RCG, Garzoni LR, Waghbi MC, Saraiva RM, Medeiros NI de, et al. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Differentially Expressed in Patients with Indeterminate and Cardiac Clinical Forms of Chagas Disease. *Infect Immun*. 2013.
10. Hauschka TS. Persistence of Strain-Specific Behavior in Two Strains of *Trypanosoma cruzi* after Prolonged Transfer through Inbred Mice. *The Journal of Parasitology*. 1947; 35(6): 593-599.
11. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2008;172:288–298.

12. Jorge TCA, Castro SL. Doença de chagas: manual para experimentação animal. Antropologia e Saúde collection. 2000; 368: 1-3255.
13. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. PLoS ONE. 2011;6:e18683.
14. Knebel F, Baldenhofer G, Spethmann S, Laule M, Eilers B et al. Galectin-3 predicts short- and long-term outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI). International Journal Cardiology. 2014, 3: 912-917.
15. Liu YH, D'Ambrosio M, Liao TD, Peng H, Rhaleb NE, Sharma U, André S, Gabius HJ, Carretero OA. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296:H404–H412.
16. Louzada RA, Oliveira PF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cunha-Carvalho L, Baldanza MR et al. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of chronic myocardial infarction. Cardiovascular Drugs and Therapy. 2010, 2:121-130
17. Macambira SG, Vasconcelos JF, Costa CR, Klein W, Lima RS, Guimarães P. Et al. Granulocyte colonystimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. FASEB J. 2009; 23:3843–3850.
18. Macambira SG, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC. et al. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49:1521–1528.
19. Miles MA, Cibulski RE. Zymodeme characterization of Trypanosoma Cruzi. Parasitology Today. 1986. 4:94-97.
20. Pizzi T, Agosín M, Christen R, Hoecker G, Neghme A. Influencia de la constitucion genética em la resistència de la laucha a la infeccion experimental por Trypanosoma Cruzi. Biológica. 1948. 8-11: 43-53.
21. Rees SG, Inverso JA, Roters SB. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic Trypanosoma Cruzi infections are restaured with interleukin 2. Journal of immunology. 1984. 133: 3333-3337.
22. Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, et al. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. Eur J Heart Fail. 2010; 12:826-32.
23. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B,

André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3121–3128.

24. Silva AA, Marino APMP, Cabral FA, Silva SH, Santos TFQ, Savino W, Lannes-Vieira J. Acute and chronic experimental chagasic infection: Genesis of immunopathological alterations in central nervous system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995. 90(Supply. I): 168.

25. Soares MBP, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR. Et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J. Infect*. 2010; 202:416–426.

26. Soares MB, Lima RS, Souza BSF, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR. Et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle*. 2011; 10:1448–1455.

27. Soares MBP, Lima RS, Rocha LL et al.: Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Pathol*. 164(2), 441–447 (2004).

28. Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Honteberey-Joskowicz M. Is TNF- α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice?. *Research on Immunology*. 1991. 142:117-122.

29. Takahashi, i R, Negishi K, Watanabe A, Arai M, Naganuma F, Ohyama Y, Kurabayashi M. Serum syndecan-4 is a novel biomarker for patients with chronic heart failure. *Journal of Cardiology* (2011) 57, 325-332.

30. Tarleton RL. The role of T cells in *Trypanosoma Cruzi* infection. *Parasitology Today*. 1995. 1:7-9.

31. Trischmann TM, Tanowitz H, Wittner M, Bloom B. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*. 1978. 45:160-168.

32. Vasconcelos JF, Souza BSF, Lins TSF, Macambira SG, Soares MBP, Ribeiro-dos-Santos, R. Et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *The FASEB Journal*. 2013; 27:4691-4702.

33. World Health Report: Making a difference. World Health Organization. 1999: 1-136.

X. ANEXOS

ANEXO I

Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 016/2013

PROJETO: "Identificação de alvos moleculares e avaliação das propriedades farmacológicas de moléculas para o tratamento da doença de chagas, da leishmaniose e da malária"

COORDENADORA: Dra. Milena Soares Botelho

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo BALB/c	768 animais (394 animais/ano)
Camundongos CBA	256 animais (128 animais/ano)
Camundongos Swiss	256 animais (128 animais/ano)

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 23/12/2013, e tem validade até 23/12/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 12/23/2013, being valid until 12/23/2015.

Salvador, 23 de dezembro de 2013.


MARIA DA CONCEIÇÃO CHAGAS DE ALMEIDA
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Maria da Conceição C. Almeida
 Pesquisadora Associada
 Matr. 130668
 CPqGM - FIOCRUZ

ANEXO II

Desenho Experimental

