

Keila Cardoso Barbosa Fonseca

**Influência da poluição do ar no remodelamento miocárdico
na doença de Chagas em modelo experimental**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Keila Cardoso Barbosa
Influência da poluição do ar no remodelamento
miocárdico na doença de Chagas em modelo
experimental / Keila Cardoso Barbosa Fonseca. --
São Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Felix José Alvarez Ramires.

Descritores: 1.Doença de Chagas 2.Fibrose
3.Remodelação ventricular 4.Poluição do ar
5.Inflamação 6.Estresse oxidativo 7.Apoptose

USP/FM/DBD-242/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo André, por estar e ser presente em minha vida e na educação do nosso filho, mas principalmente, por participar dos cuidados dele em minhas muitas ausências. Seu companheirismo e dedicação tornaram possível a realização deste trabalho. **#amoreterno**

Ao meu filho amado, Joaquim (6 anos), a melhor parte de mim que, algumas vezes, foi privado de momentos de lazer com a mamãe. É por você que eu acordo todas as manhãs em busca de ser sempre melhor. **#amormaispuro**

Aos meus pais, Tadeu e Mariusa, meus exemplos de vida e de persistência que me apoiaram, incentivaram, auxiliaram, e deram suporte físico e emocional para a realização deste sonho. Devo a vocês tudo o que sou e o que construí nesses anos. **#amorincondicional**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Charles Mady – um homem forte, munido de caráter e ética, responsável por ensinar os valores de família, união e liderança ao nosso grupo. Obrigada por me incentivar e por permitir fazer parte da família Miocardiopatias.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires que me capacitou e me ofertou a possibilidade de realizar este trabalho. Um homem honesto, pesquisador exemplar e profissional cheio de virtudes, digno de intermináveis elogios. Sou eternamente grata a você por ter me aceitado como aluna, me conduzido pela mão em toda trajetória desta tese e, com muito carinho e paciência, ter me mostrado o caminho rumo à defesa. Meu respeito e minha admiração serão eternos.

Aos meus grandes amigos, Fernanda Pessoa e Orlando Ribeiro, irmãos postiços que a vida me deu. Vocês tornaram essa caminhada menos árdua e estiveram comigo desde a elaboração do projeto inicial, passando pelo protocolo de 10 meses de procedimento, pelas inúmeras técnicas propostas e elaboradas, pelos congressos e chegaram até aqui comigo. Todo e qualquer louvor a esse trabalho merece ser dividido com vocês. Definitivamente, ele não teria saído sem sua sabedoria e sua amizade, cada um a seu modo. Agradeço imensamente a colaboração e a amizade e como costumamos dizer: juntos somos mais fortes. **#TrioCoração** amo vocês.

Às amigas Paula Buck e Roseli Chaves, agradeço pelo carinho e pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis. Vocês foram de fundamental importância para meu equilíbrio emocional.

À família Miocardiopatias e Doenças da Aorta: Profa. Dra. Bárbara Maria Ianni, Prof. Dr. Edmundo Arteaga-Fernandez, Prof. Dr. Fábio Fernandes, Dr. Ricardo Ribeiro Dias, Dr. Luciano Nastari e Dr. Juliano Cardoso Novaes pelo apoio e incentivos constantes.

À Dra. Viviane Tieme Hotta pela realização e análise dos exames ecocardiográficos.

À amiga Lúcia Maria de Oliveira pela formatação desde a qualificação, até o trabalho final desta tese. Seu empenho e disposição em ajudar foram essenciais na elaboração deste trabalho.

Aos queridos amigos Marilda Savoia Nascimento e Rogério Silva do Nascimento pela fundamental ajuda na manutenção e inoculação das cepas y de *T. cruzi*.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva – Professor Titular do Departamento de Patologia – FMUSP e a Dra. Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero – pesquisadora científica do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – FMUSP, minha gratidão por permitir a utilização de toda estrutura do concentrador a diesel e, acima de tudo, por nortear meus experimentos com seu conhecimento e muita simpatia.

Ao Laboratório de Lípidos gerido pelo Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão e todas as suas colaboradoras: Debora Deus, Andreia Fernandes, Fátima Rodrigues, Aleksandra Tiemi, Elaine Tavares, Priscila Carvalho, Bruna Miranda e todos os alunos. Obrigada por compartilhar experiências e multiplicar amizade. Sou grata por ter vocês no meu caminho.

Ao Laboratório de Patologia Cardíaca do Incor-HC-FMUSP gerido pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi e suas colaboradoras: Joyce Kawakami, Renata Ikegami, Marcia Martins, e Sueli Palomino, além das alunas Jaqueline Pereira, Camila Moreno e Julliana Carvalho - obrigada a todas por dividir momentos e partilhar conhecimento. O apoio, o carinho e a amizade fazem toda a diferença.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica do Incor-HC-FMUSP gerido pela Profa. Dra. Vera Demarchi Aiello e seus colaboradores: Francisco Denis Veiga, Julia Maria Silvestre e Antônio José Guedes. Um agradecimento especial à querida amiga Solange Consorti que com muito carinho e dedicação ajudou no emblocamento do tecido cardíaco, corte e coloração das lâminas utilizadas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Vasculiar do Incor-HC-FMUSP gerido pelo Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo: Victor Debbas, Ana Moretti, Maria Aparecida Bertoline e todos os colaboradores, pelo auxílio na realização das técnicas de estresse oxidativo, meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Hiro Goto e funcionários do Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e cuidado com os nossos hamsters.

À Neusa Rodrigues Dini e a todo o grupo da pós-graduação, pelo apoio e dedicação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro deste projeto.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho, pessoas que de perto ou de longe foram determinantes na orientação/discussão de um protocolo. Foram muitas mãos, muitos incentivos, muitas palavras acolhedoras, assim como foram também momentos de indecisão, angústia e superação. A construção de um trabalho longo, como este, necessita de uma estratégia bem elaborada, para que nada saia do trilho e, mesmo assim, imprevistos acontecem. Muitas e muitas pessoas se dedicaram e se dispuseram a ajudar de forma imediata, contribuíram didaticamente e trouxeram informações, aprendizado e carinho. Obrigada a cada uma dessas pessoas que estiveram ao meu lado e propiciaram essa vitória que não é só minha.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”

Charles Darwin

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Histórico.....	2
1.2.	Epidemiologia e transmissão.....	3
1.3.	Dados clínicos e histológicos.....	5
1.4.	Fisiopatologia da doença de Chagas.....	7
1.5.	Poluição do ar.....	9
1.6.	Mecanismo de lesão pela poluição.....	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1.	Modelo experimental	17
3.1.1.	Obtenção dos parasitas e infecção dos hamster	17
3.1.2.	Período de infecção e eutanásia	18
3.1.3.	Exposição à poluição – gerador de partículas a diesel.....	18
3.2.	Material coletado	20
3.3.	Análise morfológica	20
3.4.	Ecocardiograma	21
3.5.	Análise da expressão gênica.....	22
3.6.	Análise da expressão proteica.....	25
3.7.	Análise da glutatona	26
3.8.	Análise da apoptose (TUNEL)	27
3.9.	Análise da peroxidação lipídica (MDA).....	28
3.10.	Análise das espécies reativas de oxigênio (DHE)	29
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5.	RESULTADOS	33
5.1.	Análise morfológica	34
5.1.1.	Colágeno intersticial do ventrículo esquerdo e direito	34
5.2.	Ecocardiograma	36
5.2.1.	Diâmetro diastólico do VE	36
5.2.2.	Diâmetro sistólico do VE	37
5.2.3.	Fração de ejeção.....	38
5.2.4.	Fração de encurtamento.....	39
5.2.5.	Relação E/A.....	40
5.2.6.	Tempo de desaceleração	41
5.2.7.	Tempo de relaxamento isovolumétrico	42

5.2.8.	Índice de performance miocárdica.....	43
5.3.	Expressão gênica	44
5.3.1.	Avaliação das citocinas inflamatórias	44
5.3.1.1.	IL10	44
5.3.1.2.	IFN- γ	45
5.3.1.3.	TNF	46
5.3.2.	Avaliação do estresse oxidativo	47
5.3.2.1.	NOX1.....	47
5.3.2.2.	NOX4.....	48
5.3.2.3.	MnSOD.....	49
5.3.2.4.	iNOS.....	50
5.3.3.	Avaliação da apoptose	51
5.3.3.1.	BCL2	51
5.3.3.2.	CASP3.....	52
5.4.	Expressão proteica.....	53
5.4.1.	Avaliação das citocinas inflamatórias	53
5.4.1.1.	IL10	53
5.4.1.2.	IFN- γ	54
5.4.1.3.	TNF	55
5.5.	Análise da glutaciona	56
5.6.	Análise da apoptose (TUNEL).....	57
5.7.	Análise da peroxidação lipídica (MDA).....	59
5.8.	Análise das espécies reativas de oxigênio (DHE)	60
5.9.	Sobrevida (Kaplan Meier)	62
6.	DISCUSSÃO	63
7.	CONCLUSÕES	75
8.	REFERÊNCIAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema de exposição ao ar filtrado	19
Figura 2 – Concentrador de diesel	19
Figura 3 – Placa de ELISA (inflamação)	26
Figura 4 – Fotomicrografia do miocárdio (colágeno)	34
Figura 5 – Colágeno intersticial	35
Figura 6 – Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo	36
Figura 7 – Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo.....	37
Figura 8 – Fração de ejeção	38
Figura 9 – Fração de encurtamento	39
Figura 10 – Relação E/A	40
Figura 11 – Tempo de desaceleração.....	41
Figura 12 – Tempo de relaxamento isovolumétrico.....	42
Figura 13 – Índice de performance miocárdica	43
Figura 14 – Real time IL10	44
Figura 15 – Real time IFN- γ	45
Figura 16 – Real time TNF	46
Figura 17 – Real time NOX1	47
Figura 18 – Real time NOX4	48
Figura 19 – Real time MnSOD	49
Figura 20 – Real time iNOS	50
Figura 21 – Real time BCL2	51
Figura 22 – Real time CASP3	52
Figura 23 – ELISA IL10	53
Figura 24 – ELISA IFN- γ	54
Figura 25 – ELISA TNF	55
Figura 26 – Glutathiona.....	56
Figura 27 – Fotomicrografia do miocárdio (apoptose).....	57
Figura 28 – Apoptose (TUNEL).....	58
Figura 29 – Peroxidação lipídica (MDA).....	59
Figura 30 – Fotomicrografia do miocárdio (ROS).....	60
Figura 31 – Espécies reativas de oxigênio.....	61
Figura 32 – Sobrevida (Kaplan Meier).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers e probes	24
Tabela 2 – Kits de avaliação das citocinas inflamatórias	25
Tabela 3 – Kit de avaliação da glutathione	26
Tabela 4 – Preparação da placa de glutathione.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Linfoma de células B 2)
CAT	Enzima catalase
Ch	Chagas
Ch+P	Chagas + poluição
CO	Monóxido de carbono
Ct	Controle
Ct+P	Controle + poluição
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
FVCI	Fração de volume do colágeno intersticial
GPx	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Hidrocarbonetos
IL4	Interleucina 4
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
INF	Interferon
iNOS	Isoforma do óxido nítrico sintase
IPM	Índice de <i>performance</i> miocárdica
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Superóxido dismutase de manganês
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOX1	NADPH oxidase 1
NOX4	NADPH oxidase 4
O₂	Oxigênio
OD	<i>Optical density</i> (densidade ótica)
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)

PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
MP	Material particulado
MP_{0,1}	Material particulado com diâmetro inferior a 0,1 µm
MP_{2,5}	Material particulado com diâmetro entre 0,1 e 2,5 µm
MP₁₀	Material particulado com diâmetro entre 2,5 e 10 µm
Prx	Peroxidoxina
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> (espécies reativas de nitrogênio)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa - reação em cadeia de polimerase
SOD	Superóxido desmutase
SO_x	Óxido de enxofre
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCIV	Tempo de contração isovolumétrica
TE	Tampão Tris/EDTA
TGF β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> (fator de crescimento transformador beta 1)
Th1	Linfócitos <i>T helper 1</i>
Th2	Linfócitos <i>T helper 2</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factors</i> (fator de necrose tumoral)
Triv	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
ΔD	Fração de encurtamento

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	–	Micrograma
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	–	Micrograma por metro cúbico
μL	–	Microlitro
μm	–	Micrômetro
mg/kg	–	Miligramma por kilograma
mg/ml	–	Miligramma por mililitro
mM	–	Milimolar
mm/s	–	Milímetro por segundo
$\text{ng}/\mu\text{L}$	-	Nanograma por microlitro
nm	–	Nanomol
pg/ml	–	Picograma por mililitro
rpm	–	Rotações por minuto

LISTA DE SIGLAS

CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DENATRAN	Departamento Nacional de Trânsito
IMT-FMUSP	Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde

RESUMO

Fonseca KCB. *Influência da poluição do ar no remodelamento miocárdico na doença de Chagas em modelo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A doença de Chagas é uma importante causa de miocardiopatia e insuficiência cardíaca no Brasil. Promove disfunção miocárdica caracterizada por intensa fibrose a qual está diretamente relacionada a uma complexa cascata de eventos como inflamação, estresse oxidativo e apoptose. Da mesma forma, a poluição atmosférica leva a ativação dessas mesmas vias, intensificando as respostas do organismo frente a essa agressão. Nossa hipótese é que a poluição poderia amplificar o estresse oxidativo e a inflamação, levando a maior perda de cardiomiócitos com consequente aumento da fibrose miocárdica na miocardiopatia chagásica. Nosso objetivo foi avaliar o papel da poluição do ar no remodelamento ventricular na doença de Chagas experimental. Foram utilizados 100 hamster sírio fêmeas, divididos em 4 grupos (controle – Ct, controle com Poluição – Ct+P, Infectado – Ch e Infectado com Poluição – Ch+P). Os animais foram infectados com 10^5 formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e expostos à poluição por inalação de material particulado, produzido pela queima do diesel. A fração do volume de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo (FVCI-VE) e do ventrículo direito (FVCI-VD) foi determinada em cortes histológicos, corados com picrossirius red. A análise anatômica e funcional foi realizada por ecocardiograma. A avaliação da inflamação foi realizada por análise da expressão gênica, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real e análise proteica por ELISA (IL-10, TNF- α e INF- γ). O estresse oxidativo também foi avaliado por expressão gênica (Nox1, Nox4, MnSOD e iNOS), avaliação da glutathiona total, peroxidação lipídica e produção de ROS. Avaliamos a apoptose por expressão gênica (BCL2 e CASP3) e pelo método de TUNEL. Os resultados foram avaliados em 3 fases: aguda, crônica e casuística total. O acúmulo do colágeno intersticial foi maior nos grupos chagásicos em relação aos controles (VE e VD: $p < 0,05$) na casuística total. Nas fases aguda e crônica observamos maior deposição de colágeno no VE do grupo Ch+P comparado ao Ct ($p = 0,044$ e $p = 0,018$, respectivamente). Não houve interferência da poluição nos grupos infectados. Na análise da geometria do coração na fase crônica mostrou maior diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo no grupo ChxCt+P ($p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente). Já a fase aguda mostrou maior dilatação do VE no grupo Ch (DDVE: Ch x Ct $p = 0,003$ e Ch x Ct+P $p = 0,013$; e DSVE: Ch x Ct $p < 0,05$ e Ch x Ct+P $p < 0,05$). Mais uma vez a poluição do ar não interferiu nessa variável. Os parâmetros da função sistólica do VE, como fração de ejeção (FE) e fração de encurtamento (ΔD), não apresentaram piora na fase crônica ($p = 0,09$ em ambos). Já na fase aguda observamos alteração desses parâmetros no grupo Ch comparado aos controles (FE: Ch x Ct e Ch x Ct+P $p < 0,01$ e ΔD : Ch x Ct e Ch x Ct+P $p < 0,05$). Os parâmetros de função diastólica,

tempo de desaceleração (TD $p=0,11$) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV $p=0,80$), na fase crônica, não apresentaram alteração. Já a variável da relação E/A apresentou-se menor no grupo Ch ($p=0,003$). Na fase aguda, observou-se maior significância no grupo Ch+P em relação ao grupo Ct no parâmetro da relação E/A e TD ($p<0,05$ e $p<0,01$) e TRIV foi significativamente maior no Ch+P grupo comparado aos demais grupos ($p=0,0006$). Não houve diferenças na análise de fase aguda e crônica quanto ao índice de performance miocárdica. A avaliação da inflamação pela expressão gênica (IL-10, TNF- α e INF- γ) foi maior nos grupos chagásicos, tanto na casuística total como na fase aguda. A expressão proteica dessas mesmas citocinas foi maior nos grupos chagásicos apenas na fase aguda. Não houve amplificação da expressão gênica e proteica influenciada pela poluição. A avaliação do estresse oxidativo pela expressão gênica (Nox1, MnSOD e iNOS) foi maior nos grupos chagásicos em comparação aos controles, tanto na fase aguda como na casuística total. A fase crônica não apresentou alterações significativas em nenhum desses genes. A avaliação da glutathiona total bem como a peroxidação lipídica não apresentaram diferenças significantes. A análise da produção de ROS apresentou diferenças quando comparado o grupo Ch+P aos grupos controles na fase aguda e na casuística total (aguda: Ch+P x Ct $p<0,01$ e Ch+P x Ct+P $p<0,05$; total: Ch+P x Ct $p<0,01$ e Ch+P x Ct+P $p<0,01$) e na fase crônica observamos diferenças entre os grupos chagásicos comparado ao Ct (Ch x Ct $p=0,037$ e Ch+P x Ct $p=0,028$). Em nenhuma análise de avaliação do estresse oxidativo houve interferência da poluição no grupo infectado. Na análise da apoptose pela expressão gênica observamos que os grupos infectados apresentaram maior expressão do gene BCL2 e CASP3 tanto na fase aguda como na casuística total, sendo significante na comparação entre os grupos. Nessas 2 fases o grupo Ch+P apresentou maior expressão que o grupo Ch, com p marginal de 0,064 (total) e 0,054 (aguda) na análise de BCL2. A técnica do TUNEL apresentou maior quantidade de células apoptóticas no grupo Ch+P tanto nas fases total como na aguda, sendo que nessa última obtivemos 2x mais células apoptóticas entre Ch+P x Ch, sugerindo modulação da apoptose pela poluição. A curva de sobrevivência demonstra alta mortalidade – 62% dos animais infectados (Ch e Ch+P) nos primeiros 38 dias após infecção. Concluímos que a poluição do ar não aumentou a deposição de colágeno, não piorou a dilatação ou função ventricular, não apresentou alteração das vias da inflamação e do estresse oxidativo, e nem sequer aumentou a mortalidade nesse modelo de miocardiopatia chagásica. Houve possível modulação da via apoptótica pela poluição que, entretanto, não aumentou a fibrose miocárdica nos animais infectados.

Descritores: Doença de Chagas; Fibrose; Remodelação ventricular; Poluição do ar; Inflamação; Estresse oxidativo; Apoptose.

SUMMARY

Fonseca KCB. *Influence of air pollution on myocardial remodeling in Chagas' disease in experimental model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Chagas' disease is a major cause of cardiomyopathy and heart failure in Brazil. It promotes myocardial dysfunction that is characterized by fibrosis and which is directly related to a complex cascade of pathways, such as inflammation, oxidative stress and apoptosis. As well air pollution leads to intense activation of these pathways, intensifying the response against this aggression. Our hypothesis is that pollution could amplify oxidative stress and inflammation, leading to greater loss of cardiomyocytes with an increased myocardial fibrosis in Chagas cardiomyopathy. Therefore, our objective was to evaluate the role of air pollution in ventricular remodeling in experimental Chagas disease. One hundred female *sirius* hamsters were divided into four groups (control – Ct, control with Pollution – Ct+P, Infected – Ch and Infected + Pollution – Ch+P). The animals were infected with the injection of 10^5 trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. The animals were exposed to the inhalation of particulate matter, produced by burning of the diesel fuel. The interstitial collagen volume fraction of left ventricle (ICVF-LV) and right ventricle (ICVF-RV) was analyzed in histological sections stained with Picrosirius red. The anatomical and functional analysis was performed by echocardiogram. The evaluation of the inflammation was done by gene expression analysis using real-time RT-PCR and protein by ELISA (IL-10, TNF- α and INF- γ). Oxidative stress also was evaluated by gene expression using the real-time RT-PCR (Nox1, Nox4, MnSOD and iNOS), total glutathione, lipid peroxidation and ROS production. We evaluated apoptosis by gene expression (BCL2 and CASP3) and by TUNEL. The results were evaluated in 3 phases: acute, chronic and total case series. The accumulation of interstitial collagen was higher in the chagasic groups (LV and RV: $p < 0.05$) in the total series. In the acute and chronic phases, we observed greater collagen deposition in the LV of the Ch+P group compared to the Ct ($p = 0.044$ and $p = 0.018$, respectively). There was no interference of pollution in the infected groups. In the analysis of heart geometry in the chronic phase, it showed a larger LV diastolic (LVDD) and systolic (LVSD) diameter in the Ch x Ct+P group ($p < 0.05$ and $p < 0.05$, respectively). The acute phase showed greater LV dilation in the Ch group (LVDD: Ch x Ct $p = 0.003$ and Ch x Ct+P $p = 0.013$; and LVSD: Ch x Ct $p < 0.05$ and Ch x Ct + P $p < 0.05$). Again, air pollution did not affect this variable. The parameters of LV systolic function, such as ejection fraction (EF) and shortening fraction (ΔD), no worsening of this function was observed in the chronic phase ($p = 0.09$ in both). In the acute phase, we observed a decrease of this parameters in the Ch group compared to the controls (EF: Ch x Ct and Ch x Ct+P $p < 0.01$ and

ΔD : Ch x Ct and Ch x Ct+P $p < 0.05$). The diastolic function parameters, as deceleration time (DT $p = 0.11$) and isovolumetric relaxation time (IRT $p = 0.80$), in the chronic phase, no statistical significance was observed, however, E/A ratio was lower in the Ch group ($p = 0.003$). In the acute phase, we observed higher values in the Ch+P compared to the Ct regarding E/A ratio and DT ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), and IRT was significantly higher in Ch+P compared to the other groups ($p = 0.0006$). There were no differences in the analysis of acute and chronic phase regarding the myocardial performance index. The evaluation of inflammation by gene expression (IL-10, TNF- α and INF- γ) it was higher in chagasic groups, both in the total series and in the acute phase. The protein expression of these same cytokines was higher in the chagasic groups only in the acute phase, whereas in the chronic phase and in the total series there was no significance. There was no amplification of gene and protein expression influenced by pollution. The evaluation of oxidative stress by gene expression (Nox1, MnSOD and iNOS) was higher in chagasic groups compared to controls, both in the acute phase and in the total series. The chronic phase did not show significant changes in any of these analyzed genes. The evaluation of total glutathione as well as lipid peroxidation did not show significant differences. The ROS production analysis showed differences when comparing the Ch+P group to the control groups in the acute phase and in the total series (acute: Ch+P x Ct $p < 0.01$ and Ch+P x Ct+P $p < 0.05$; total: Ch+P x Ct $p < 0.01$ and Ch+P x Ct+P $p < 0.01$) and in the chronic phase we observed differences between the chagasic groups compared to Ct (Ch x Ct $p = 0.037$ e Ch+P x Ct $p = 0.028$). None analysis of oxidative stress showed interference of pollution in the infected group. In the analysis of apoptosis by gene expression, we observed that the infected groups showed greater expression of the BCL2 and CASP3 gene both in the acute phase and in the total series. In these 2 phases, the Ch+P group showed greater expression than the Ch group, with marginal p of 0.064 (total) and 0.054 (acute) in the analysis of BCL2. The TUNEL technique observed a greater number of apoptotic cells in the Ch+P group both in the total and in the acute phases, with 2x more apoptotic cells between Ch+P x Ch, suggesting modulation of apoptosis by pollution. The survival curve shows high mortality as 62% of infected animals (Ch and Ch+P) in the first 38 days after infection. We concluded that air pollution did not increase collagen deposition, did not worsen ventricular dilation or function, did not show changes in inflammation and oxidative stress pathways, and did not even increase mortality in this model of chagasic cardiomyopathy. There was possible modulation of the apoptotic pathway by pollution, which, however, did not increase myocardial fibrosis in infected animals.

Descriptors: Chagas disease; Fibrosis; Ventricular remodeling; Air pollution; Inflammation; Oxidative stress; Apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A doença de Chagas é uma moléstia infecciosa de origem parasitária causada por um protozoário hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo os insetos *triatomídeos* os principais vetores. Sua descoberta deu-se no final de 1908, por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, mas sua descrição só foi divulgada para a comunidade científica em abril de 1909¹. Um século depois de sua descoberta, é possível dizer que é uma doença desafiadora e que muitas questões a respeito da sua patogênese e características clínicas não são completamente entendidas, o que impede a elaboração de um tratamento eficaz.

A descrição das características clínicas, o agente causador e o mecanismo de transmissão da doença renderam a Carlos Chagas vários prêmios e, ainda, duas indicações ao Prêmio Nobel (1913 e 1921)².

O primeiro caso descrito em humano deu-se em uma menina de 2 anos, chamada Berenice, descrição essa feita durante uma expedição de combate à malária, dentro de um vagão de trem, em um laboratório improvisado. Berenice faleceu em 1981, tendo sido acompanhada clinicamente ao longo de 20 anos, sem haver evidências de que sua morte pudesse ter sido atribuída à doença de Chagas³.

Embora a ocorrência da doença de Chagas tenha sido descrita há pouco mais de um século, relatos anteriores mostram evidências de que ela esteja presente no continente americano, há vários milênios. Pesquisas, estudando 283 múmias de aproximadamente 9 mil anos, provenientes do Chile e Peru, revelaram-se positivas para DNA de *T. cruzi*, em 40,6% dos casos⁴.

Um fato histórico relevante sobre a doença de Chagas foi a possibilidade de Charles Darwin ter contraído a doença em uma viagem à América do Sul, fato esse relatado em seu diário como consequência da picada de inseto que teria ocasionado sua morte⁵.

1.2. Epidemiologia e transmissão

Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças tropicais mais negligenciadas no mundo⁶, a doença de Chagas tem sido um grave problema, desde a antiguidade até os dias atuais, sendo de acentuada relevância em muitos países da América Latina.

O número exato de pessoas contaminadas não é plenamente conhecido. Segundo a OMS, estima-se que existam cerca de 8 milhões de pessoas infectadas pelo mundo. Desses, 6 a 7 milhões estão em 21 países da América Latina⁷. No Brasil, estimativas divulgadas no II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (2015) apontam que 1,9 a 4,6 milhões de pessoas podem estar infectadas⁸.

Embora a transmissão da doença de Chagas ocorra predominantemente através da picada do inseto conhecido, popularmente, como barbeiro, existem outras formas de transmissão igualmente importantes: 1) transfusão sanguínea, 2) transplante de órgãos infectados, 3) transmissão oral através de alimentos contaminados, 4) transmissão vertical de mãe para filho durante a gravidez e 5) contato de feridas, mucosas ou olhos com sangue de pacientes infectados⁹.

A transmissão oral é uma forma infrequente de contaminação que vem aumentando o número de casos da doença, nos últimos anos. Embora originalmente não descrito por Carlos Chagas, esse modo de transmissão se estabelece em um período médio de incubação de cinco dias e apresenta quadro clínico mais severo, com sintomatologia grave, além de alta taxa de mortalidade, devido a uma miocardite aguda pela transmissão maciça de parasitas¹⁰.

No contexto epidemiológico, a doença de Chagas aguda, causada por infecção oral foi relatada, na maior parte dos casos, na região Amazônica sob a forma de casos e surtos. Segundo o boletim do Ministério da Saúde do Brasil, foram registrados 1.034 casos de doença de Chagas aguda por via oral no período de 2000 a 2013¹¹. A maioria desses casos agudos foram surtos relacionados à ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (açai, bacaba, carne silvestre como capivara, tatu e gambá), revelando um perfil epidemiológico peculiar que, até o momento, não se manifestou de forma expressiva em áreas tradicionalmente endêmicas¹¹. Dados apresentados pelo Ministério da Saúde do Brasil, entre os anos de 2008 a 2017, evidenciaram o aumento anual e

progressivo da forma aguda da doença de chagas, onde a maioria do total de casos (2172 casos confirmados) aconteceram no estado do Pará (1793 – 82%)¹². Entre os anos de 2005 e 2013, o Ministério da Saúde do Brasil contabilizou 112 surtos em território nacional, envolvendo 35 municípios da região Amazônica. A maioria dos surtos ocorreu nos estados do Pará (85 surtos – 75,9%) e Amapá (14 surtos – 12,5%) e, em menor número, nos estados do Amazonas (5 surtos – 4,5%), Tocantins (2 surtos – 1,8%) e Bahia (2 surtos – 1,8%)¹³.

Em países não endêmicos, a ocorrência da doença de Chagas começa a ser preocupante. Regiões que recebem imigrantes latinoamericanos tornam-se mais susceptíveis à doença, sendo os países norteamericanos e europeus, somados a Japão e Austrália, os que mais recebem esses imigrantes¹⁴. O movimento migratório, proveniente de países latinos, associados às transfusões sanguíneas, aos transplante de órgãos e à transmissão materno-fetal, promove a disseminação da doença¹⁵.

Países norteamericanos apresentam maior probabilidade de contaminação por doença de Chagas, uma vez que, além dos movimentos migratórios, a presença de transmissão autóctone aumenta o risco de contaminação. O Texas é um dos estados que apresentam esse tipo de transmissão e, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que há quase 37.000 pessoas vivendo com a doença de Chagas no Texas, embora a porcentagem de casos transmitidos localmente, versus imigração na fronteira, ainda seja desconhecida¹⁶. Dados do *American Community Survey* e da Organização Mundial da Saúde apontam uma estimativa de 238.091 casos nos Estados Unidos, concentrados principalmente em quatro estados (Califórnia, Texas, Nova York e Flórida), cada um com mais de 10.000 casos¹⁷.

Na Europa, a transmissão por vetores não ocorre, visto o inseto não estar presente nesse continente. Com isso, a doença de Chagas pode ser transmitida por outros meios, como transmissão vertical, transfusão de sangue e transplante de órgãos. Dessa forma, os movimentos migratórios são cruciais nesse tipo de contaminação. Na década de 1990, o fluxo maciço de migrantes latinoamericanos para a Europa (especialmente para Espanha, Portugal e Itália) esteve associado ao aumento dramático de casos de doença de Chagas

diagnosticados nesses países não endêmicos, com importantes implicações para a saúde pública e globalização de uma doença antes restrita às Américas¹⁴. Estima-se que existam mais de 80.000 mil casos da doença nesse continente, corroborando um trabalho publicado em 2014, com média de pessoas infectadas de aproximadamente 97.556 casos na Europa, com uma grande variação entre o número mínimo (13.932) e o máximo (181.181) de casos^{18,19}.

No Brasil, incentivos governamentais de controle da doença iniciaram-se a partir de 1975 com ações sistematizadas de gerenciamento químico e notificação compulsória²⁰. Em 1980, houve uma mobilização de controle da doença no continente americano, sendo mais acentuada na América do Sul. A partir disso, foi criado em 1990 um programa de cooperação internacional, chamado “Iniciativa Cone Sul”, que teve por objetivo implantar uma política de controle da doença, reduzindo o número de novas infecções. O cenário epidemiológico da doença de Chagas começou a mudar movido por medidas de controle da doença, alterações ambientais, econômicas e sociais, associadas a maior migração da população para áreas urbanas. A soma dessas ações levou alguns países como Uruguai (1997), Chile (1999), Brasil (2006) e outros países da América Central (2009-2010) a receberem o certificado de interrupção da transmissão do *T. cruzi* por vetores domésticos pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS)²¹.

1.3. Dados clínicos e histológicos

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas apresenta duas fases diferentes: aguda e crônica.

A fase aguda é assintomática na maioria dos casos e, raramente, apresenta manifestações como miocardite aguda, derrame pericárdico ou meningoencefalite (1% a 5%). Dura aproximadamente 4 a 8 semanas e a parasitemia diminui substancialmente a partir de 90 dias. Além disso, são poucos os casos diagnosticados nessa fase (menos de 10%). Suas manifestações clínicas são: febre, mialgias, dor de cabeça, edema no local da picada (chagoma) e inflamação próximo à região ocular, conhecido como sinal de Romana²². Nessa

fase, o dano ao órgão é secundário à ação direta do parasita e à resposta inflamatória aguda. Achados histopatológicos mostram a presença de *T. cruzi* no miocárdio e em outros tecidos (músculo esquelético e liso). O controle altamente eficiente do parasita é o resultado de uma intensa resposta inflamatória com produção de anticorpos e ativação da resposta imune inata (células *natural killer* e macrófagos), por citocinas pro-inflamatórias Th1, como fator de necrose tumoral e interferon γ , além do infiltrado inflamatório²².

Passado o tempo de infecção aguda, a parasitemia torna-se baixa, os indivíduos evoluem para um quadro de infecção crônica, onde 60% a 70% dos pacientes infectados permanecem assintomáticos, desenvolvendo a fase latente ou indeterminada. Essa fase dura aproximadamente 10 a 30 anos, apresenta sorologia positiva e não há sinais físicos ou evidências clínicas de comprometimento cardíaco ou digestivo²³. Outros 30%-40% dos indivíduos restantes apresentarão manifestações cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas²² sendo mais frequente a miocardiopatia chagásica associada a insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita, tromboembolismo periférico e acidente vascular cerebral²⁴. A principal característica da fase crônica é o dano tecidual com intensa fibrose cardíaca e dilatação ventricular com tendência à formação de aneurisma. Achados histopatológicos mostram presença de miocardite difusa, fibrose, hipertrofia de cardiomiócitos e intenso infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T CD8²².

Quando comparada a outras etiologias a cardiopatia chagásica se mostra com maior depósito de fibrose miocárdica²⁵. O colágeno miocárdico desempenha importantes funções que afetam diretamente a morfologia, a geometria e o desempenho funcional do coração. Shirey *et al.*²⁶, estudando pacientes com miocardiopatias, demonstraram pela primeira vez que o aumento da fibrose miocárdica estava relacionado com maior mortalidade. Nunes *et al.*²⁷, por sua vez, considerando pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática e chagásica, avaliaram, isoladamente, a quantidade de colágeno no miocárdio e não demonstraram relação desses dados à sobrevivência desse grupo, apesar do grupo chagásico ter mais fibrose que o idiopático.

Assim, o remodelamento cardíaco é um mecanismo complexo que participa, isoladamente ou em associação com outros fatores, da progressão das miocardiopatias. A avaliação isolada da quantidade de colágeno miocárdico

intersticial é uma parte desse conjunto, devendo outras variáveis serem consideradas.

1.4. Fisiopatologia da doença de Chagas

- **Inflamação, estresse oxidativo e apoptose**

A doença de Chagas tem sido considerada uma patologia complexa e multifatorial que envolve muitas vias interligadas e, embora o conhecimento pleno dos mecanismos envolvidos permaneça desconhecido, acredita-se que o processo inflamatório, aliado ao estresse oxidativo, causando morte celular programada (apoptose), seja importante contribuinte para disfunção e patogênese durante a infecção crônica da doença de Chagas²⁸. Algumas teorias foram propostas para explicar o desenvolvimento da miocardiopatia chagásica, durante a fase crônica, como inflamação, autoimunidade, disautonomia e dano microvascular²⁹. Nesse sentido, a importância de eicosanoides, imunidade inata, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido amplamente estudados³⁰.

No que se refere ao processo inflamatório, o desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios tem sido estudado e causa consequências profundas na progressão da miocardiopatia chagásica. Modelos experimentais de infecção por *T. cruzi* têm fornecido importantes informações a respeito do mecanismo de ativação celular, controle do parasita e desenvolvimento da doença de Chagas crônica²⁹⁻³¹. Tais estudos demonstraram, na fase aguda, grande produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 12 (IL12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), que controlam a parasitemia pela indução da produção de óxido nítrico (NO)³⁰. A IL12 estimula a síntese de IFN- γ que, em associação com TNF- α , estimula o macrófago a produzir ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estas moléculas irão ajudar a controlar o parasitismo, induzindo a produção de óxido nítrico³⁰. Nesta fase, tal via de resposta se mostra fundamental, quando da evolução na defesa contra o parasita.

Já na fase crônica, quando ocorre a doença miocárdica, nota-se intensa inflamação, responsável pela destruição das fibras miocárdicas. O processo inflamatório precisa ser intensamente regulado, visto que a desregulação desse processo pode causar um efeito deletério ou mesmo fatal na doença de Chagas. Essa inflamação é caracterizada pela presença de macrófagos (50%), linfócitos B (10%) e T (40%), sendo a maioria CD8. As células T, do infiltrado cardíaco de pacientes com miocardiopatia chagásica produzem, predominantemente, IFN- γ e TNF- α que promovem diretamente o dano miocárdico, evoluindo para disfunção³². Tem sido relatado que os mecanismos regulatórios mantêm uma resposta imune atenuada em pacientes chagásicos e, em contrapartida, a produção excessiva de IFN- γ e a falta de regulação pela IL10 estão associadas a progressão da fibrose miocárdica e remodelamento³³. O IFN- γ é a principal citocina responsável pelo controle do parasitismo na fase aguda e também responsável por mantê-lo em níveis baixos na fase crônica. Além disso, nessa fase são descritas a supressão de citocinas tipo Th2 (principalmente IL4 e IL10)³⁰. Ocorre, também, a liberação de quimiocinas e óxido nítrico que participam da agressão tecidual. Essa agressão associada à presença de *T. cruzi*, faz com que se perpetue a resposta inflamatória e intensifique a perda de miócitos, iniciando uma substituição dessas células por colágeno e formando intensa fibrose e remodelamento cardíaco³⁴.

Por ser caracterizada por intensa inflamação, a doença de Chagas também promove grande estímulo ao estresse oxidativo, visto que essas duas vias estão relacionadas a um mecanismo de retroalimentação. Os processos patológicos crônicos e a inflamação progressiva podem levar a alterações no estado antioxidante ou, em outras palavras, ao estresse oxidativo ou desequilíbrio redox³⁵. Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o miocárdio é exposto à injúria celular direta, além da ativação da via inflamatória e liberação de ROS que contribuem para a progressão da doença. A principal causa do estresse oxidativo é o aumento da liberação de ROS, como O₂⁻, HO e peróxido de hidrogênio, que estimulam a formação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) como TNF- α e INF- γ ^{36,37}. O TNF- α estimula a produção de óxido nítrico sintase (iNOS) aumentando a produção de óxido nítrico (NO). De forma geral, o NO atua no relaxamento ventricular e na contratilidade do coração. Seu

aumento resulta em aumento do estresse oxidativo do coração, impedindo a ativação das vias antioxidantes³⁸.

Em resposta à produção de ROS no organismo são expressas enzimas antioxidantes que diminuem o efeito danoso causado pelas ROS. As principais enzimas antioxidantes envolvidas nesse processo são superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), peroxidoxina (Prx) e glutathiona peroxidase (GPx). A isoforma mitocondrial da superóxido dismutase do manganês (MnSOD) representa 70% da atividade do SOD no coração e 90% em cardiomiócitos. Além disso o gene MnSOD é considerado protetor, uma vez que regula o efeito nocivo causado pelas citocinas TNF- α e INF- γ . A importância do MnSOD na regulação das vias oxidantes foi demonstrada em camundongos, cujo gene SOD2 foi deletado e isso acarretou diminuição da expressão e da atividade de MnSOD, com consequente aumento das ROS e por sua vez aumento do dano oxidativo do miocárdio na doença de Chagas³⁹.

Associado à injúria causada pela inflamação e pelo estresse oxidativo, a apoptose, estimulada por essas duas vias, tem se mostrado importante no processo fisiopatológico da perda de miócitos cardíacos, com consequente reposição por fibrose e perda da geometria e função.

1.5. Poluição do ar

Atualmente, muito tem se falado a respeito de urbanização e crescimento industrial. O avanço tecnológico trouxe consigo uma intensificação na quantidade de poluentes emitidos na atmosfera. Em geral, os veículos automotores são os principais causadores dessa poluição.

Nas áreas metropolitanas, a poluição do ar tem sido uma ameaça à qualidade de vida e saúde dos seus habitantes. De acordo com a OMS, ocorrem mais de 7 milhões de mortes por ano, acarretadas pelos efeitos da poluição urbana⁴⁰. Mais de 80% das pessoas, que vivem em áreas urbanas que monitoram a poluição do ar, estão expostas a níveis de qualidade do ar que excedem o nível da diretriz da OMS de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, com países de baixa e média renda sofrendo as maiores exposições. As recomendações de qualidade do ar da OMS exigem que os países reduzam sua poluição do ar para valores médios

anuais de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (para MP_{10}) e $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (para $\text{MP}_{2,5}$)⁴⁰. A manutenção dos níveis elevados contribui, significativamente, para o aumento das doenças cardiovasculares e morte⁴¹. Mais da metade dessas mortes ocorre em populações de países em desenvolvimento e grandes metrópoles.

O Brasil, como todos os países emergentes, possui um crescimento exacerbado das regiões metropolitanas e um aumento expressivo da frota automotiva composta por 103.363.180 veículos automotores, segundo dados emitidos em maio de 2019 pelo Departamento Nacional de Trânsito – DENATRAN⁴².

O estado de São Paulo vive o mesmo problema pois detém grande parte da frota automotiva do país. Os dados do DENATRAN apontam uma frota automotiva de aproximadamente 29,7 milhões veículos, incluindo motocicletas e motonetas (5,6 milhões), automóveis (18,6 milhões), ônibus, micro-ônibus e caminhão (971 mil), comerciais leves (3,3 milhões), outros (1,23 milhões)⁴².

As emissões causadas pelos veículos automotores trazem consigo diversas substâncias tóxicas que podem produzir efeitos nocivos à saúde. Essa emissão é composta de gases como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (Nox), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (Sox) e material particulado (MP), entre outros⁴³.

Um dos grandes causadores da poluição atmosférica são os veículos automotores abastecidos a diesel, responsáveis pela emissão de partículas tóxicas, cancerígenas e mutagênicas, sendo o material particulado (MP), ozônio, dióxido de nitrogênio e o dióxido de enxofre os materiais que mais causam danos à saúde⁴⁴. Dentre os poluentes citados, talvez nenhum seja tão agravante quanto a poluição por material particulado, que é constituído por partículas sólidas e líquidas de diâmetros variados. Seu potencial causador de malefícios à saúde está diretamente relacionado ao tamanho da partícula inalável e, portanto, quanto menor a partícula, maiores os efeitos adversos à saúde⁴³.

Segundo classificação da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, o termo poluente significa “qualquer substância presente no ar e que, pela sua concentração, possa torná-lo impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, causando inconveniente ao bem estar público, danos aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”⁴³. Dentre esses poluentes está o material particulado

(MP) que é constituído de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém na atmosfera por causa de seu tamanho pequeno. O MP é classificado por tamanho e, conseqüentemente, pelo seu potencial de causar doenças: partículas inaláveis grossas (MP₁₀) que apresentam diâmetro aerodinâmico entre 2,5 e 10 µm e podem se alojar nas vias superiores do sistema respiratório ou alcançar os alvéolos pulmonares; partículas inaláveis finas (MP_{2,5}) cujo diâmetro aerodinâmico é compreendido entre 0,1 e 2,5 µm e têm alto poder de penetração no sistema respiratório, atingindo mais facilmente os alvéolos pulmonares e partículas inaláveis ultrafinas (MP_{0,1}) com diâmetro inferior a 0,1 µm⁴⁵.

Atualmente, muitos trabalhos têm associado a poluição atmosférica à ocorrência de doenças cardiovasculares por diferentes mecanismos, como estímulo à inflamação, ao estresse oxidativo e à apoptose^{44,46,47}. Trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, associando poluição atmosférica ao remodelamento cardíaco, demonstrou aumento de fibrose miocárdica em animais saudáveis⁴⁸.

1.6. Mecanismo de lesão pela poluição

- **Inflamação, estresse oxidativo e apoptose**

A poluição do ar, constituída principalmente por partículas finas derivadas da combustão, é um componente importante e apresenta o maior efeito cardiotoxico. O MP_{2,5} é especialmente tóxico devido a sua capacidade de penetrar nos alvéolos pulmonares e ativar múltiplos mecanismos fisiopatológicos⁴⁹. A queima do diesel é um dos principais contribuintes para a poluição do ar e consiste em componentes particulados e gasosos. Partículas de diesel podem representar, aproximadamente, 90% das MP_{2,5}, nas principais cidades⁴⁹.

Os mecanismos fisiopatológicos básicos, pelos quais MP_{2,5} promove a doença cardiovascular, foram estudados extensivamente em humanos e modelos animais. O mecanismo mais aceito é o da inalação de MP_{2,5} pelos pulmões, promovendo uma resposta inflamatória local, transmitindo tal resposta para a circulação, onde os mediadores solúveis e celulares podem promover o

estresse oxidativo vascular sistêmico e a inflamação que afetam o coração e a vasculatura⁵⁰.

O processo inflamatório é facilmente ativado, quando estimulado pela poluição. Atualmente, as especulações estão voltadas para a ideia de que a poluição do ar, através de partículas finas (MP_{2,5}), poderia causar alterações inflamatórias e remodelamento tecidual⁵⁰. Estudos experimentais sugerem que a deposição de material particulado nas células epiteliais que revestem as vias aéreas pode ativar a cascata de sinalização inflamatória e, ainda, alterar as respostas dos sistemas imunológico e inflamatório^{50,51}.

No coração, o processo inflamatório associado ao estresse oxidativo, tem sido sugerido como efector da lesão por desempenhar importante papel na toxicidade por material particulado. A resposta inflamatória, além de estar intimamente associada a esse estresse, também age como fator estimulante do remodelamento cardíaco, atuando na formação de fibrose⁵¹. Duas vias ligadas à formação da fibrose são TGF β -1 e TNF- α que estimulam formação de colágeno tipo I e III, sendo mediadores da fibrinogênese. A síntese dessas duas citocinas inflamatórias é estimulada pelas ROS no miocárdio agredido e, de forma recíproca, elas estimulam e perpetuam o estresse oxidativo.

Muitos trabalhos correlacionam o aumento do material particulado levando ao estresse oxidativo que, por sua vez leva à inflamação, aumentando a possibilidade de lesão em indivíduos susceptíveis. O estresse oxidativo e a inflamação trabalham, concomitantemente, em um processo de retroalimentação e têm sido foco de trabalhos de muitos pesquisadores estudando doenças pulmonares e cardíacas, entre outras⁵²⁻⁵⁴. O principal efeito danoso do material particulado respirável e tóxico está centrado nesse estresse oxidativo. A capacidade das partículas de penetrar no sistema respiratório e atingir outros tecidos, a fim de gerar ROS e outros agentes oxidantes, é sugerida por ser o principal fator envolvido em seu alto potencial patogênico⁵⁵. O estresse oxidativo promove danos às biomoléculas pelo desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes e é considerado o fator responsável pelo aumento de diversas doenças através da inflamação, principalmente quando expostos ao material particulado. As ROS são amplamente estimuladas pela poluição atmosférica e podem causar danos irreparáveis a nossa principal biomolécula – o DNA^{56,57}.

Associado à apoptose e à necrose, o estresse oxidativo e a inflamação causam a perda dos miócitos que leva ao remodelamento estrutural do miocárdio com fibrose intersticial e perivascular.

Portanto, sendo a doença de Chagas uma doença que promove a ativação de uma complexa cadeia de eventos com intensa inflamação, estresse oxidativo, apoptose e intensa fibrose intersticial miocárdica e a poluição do ar, um fator importante no estímulo destas mesmas cascatas de eventos, nossa hipótese é que a poluição amplificaria a resposta destas vias, estimulando o estresse oxidativo e a inflamação, e promovendo maior perda de cardiomiócitos. Assim, a poluição aumentaria a fibrose miocárdica reparativa nos animais com doença de Chagas e levaria a um pior remodelamento estrutural, geométrico e funcional do coração.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da poluição do ar no remodelamento ventricular na doença de Chagas experimental.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a ação da poluição do ar no coração de hamsters chagásicos em relação a:

- deposição de colágeno intersticial no miocárdio
- função ventricular sistólica e diastólica
- inflamação
- estresse oxidativo
- apoptose
- mortalidade

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo experimental

Foram estudados 100 hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas. A quantidade de animais foi determinada a partir do cálculo do tamanho amostral. A variável utilizada no cálculo foi a fibrose miocárdica, considerando a diferença esperada entre os grupos de 1 desvio padrão, o nível de significância de 5% e poder estatístico de 95%, alcançando assim um tamanho amostral mínimo de 44 animais (11 em cada grupo). Além disso, considerando mortalidade de aproximadamente 55% no modelo de Chagas e nenhum efeito da poluição nessa variável, chegamos ao número de 25 animais por grupo. Os animais foram adquiridos da Empresa Anilab Animais de Laboratório, Criação e Comércio Ltda e foram alocados no biotério do Instituto de Medicina Tropical – IMT-FMUSP, mantidos em gaiolas apropriadas com 5 animais, ração e água *ad libitum*, sendo todos identificados com *chip* subcutâneo para garantir a diferenciação de cada animal/grupo. Além disso, os animais foram mantidos em estante ventilada com filtros de purificação de ar, para garantir ar filtrado aos grupos.

O protocolo seguiu rigorosamente as normas e critérios de cuidados em experimento animal definidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA – CONCEA) e pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council)*^{58,59}.

Esses animais foram divididos em 4 grupos:

- ✓ grupo controle não exposto à poluição (Ct) – 25 animais
- ✓ grupo controle exposto à poluição (Ct+P) – 25 animais
- ✓ grupo chagásico não exposto à poluição (Ch) – 25 animais
- ✓ grupo chagásico exposto à poluição (Ch+P) – 25 animais

3.1.1. Obtenção dos parasitas e infecção dos hamsters

Os hamster chagásicos foram infectados via intraperitoneal, com 10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, diluídas em solução salina. A cepa, já estabelecida, foi cedida pelo Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas-Chagas do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Para obtenção dessa forma tripomastigota em suspensão, para a

infecção dos hamsters, foram infectados camundongos BALB/c com cultura de cepa Y de *T. cruzi* e, após um período de 7 dias, os camundongos foram submetidos a um processo de sangria total para obtenção das formas tripomastigostas sanguíneas. Os animais considerados controles eram animais sem doenças cardíacas pré-existentes e que receberam solução salina, ao invés de cepas de *T. cruzi*, simulando o mesmo processo dos hamsters doentes.

3.1.2. Período de infecção e eutanásia

Os animais foram avaliados durante 10 meses após a infecção. Nesse período, foram observados diariamente e os que apresentavam comprometimento de movimento, pelagem ou perda de movimentação foram eutanasiados. Aos 60 dias de protocolo, definido como fase aguda, 10 animais do grupo controle foram sacrificados para servir como controle dessa fase.

A eutanásia dos hamsters, tanto após o período de 10 meses como anterior a esse período, foi realizada sob anestesia com associação de ketamina 50 mg/kg e xylazina 10 mg/kg na região intraperitoneal. Foi realizada laparotomia mediana, com dissecação e punção da veia cava, além da administração de solução com cloreto de potássio (soro fisiológico 0,9% 80 ml + KCl 19,1% 20 ml) administrada, por via intracardíaca, até a parada do coração.

Após a eutanásia, os animais foram colocados em sacos brancos devidamente identificados e armazenados em câmara fria para posterior coleta pelas empresas especializadas.

3.1.3. Exposição à poluição – gerador de partículas do diesel

O sistema de geração de partículas poluentes tem por objetivo expor pequenos animais à inalação aguda, a partir da queima de combustíveis como o diesel e, ainda, realizar a quantificação de material particulado MP_{2,5} (Figuras 1 e 2). Esse sistema está alocado no Laboratório de Poluição na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

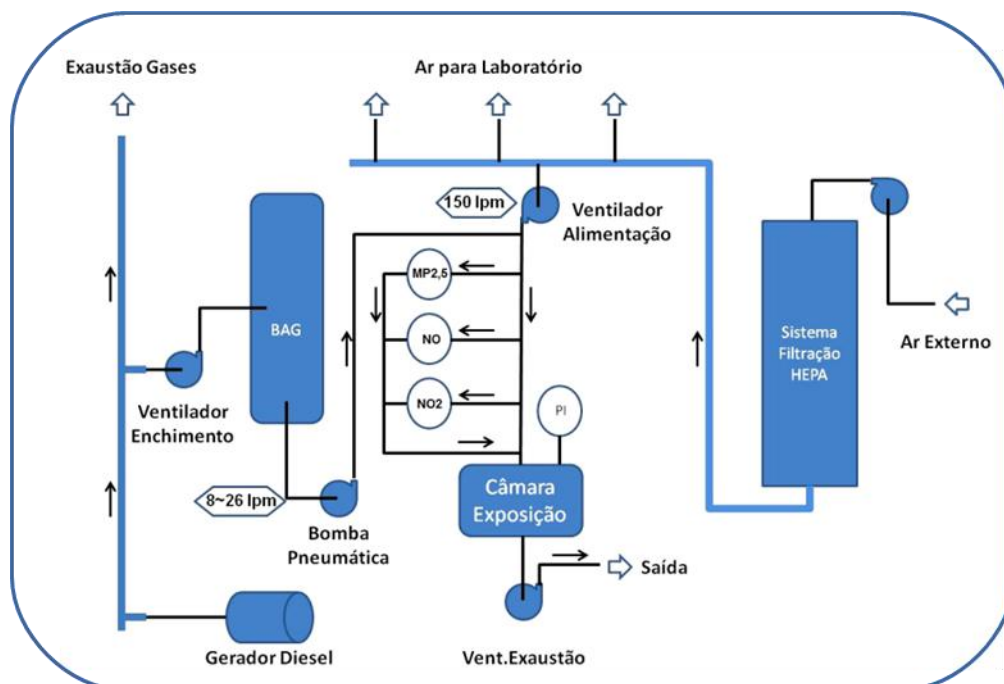


Figura 1 - Sistema de exposição ao ar filtrado (AF) e à exaustão do combustível diesel
 MP_{2,5}: material particulado com diâmetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$; NO: óxido nítrico; NO₂: dióxido de nitrogênio; lpm: litros por minuto; PI: pressão interna. Imagem cedida e desenhada por Paulo Afonso de André

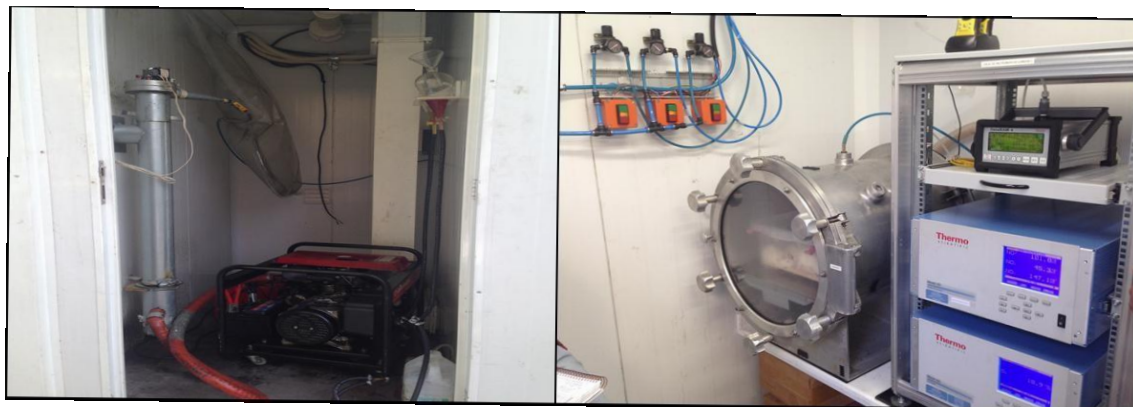


Figura 2 - Concentrador de diesel e câmara de exposição

Os animais foram alocados em câmaras de exposição, onde os gases resultantes da queima do diesel foram conduzidos, a fim de proceder a exposição a poluição. Esses gases foram produzidos pelo gerador de energia a diesel (BD-2500, China). Os hamsters permaneceram nessa câmara para exposição aguda, por inalação, desses gases⁶⁰.

Os gases poluentes resultantes da queima do diesel: monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxido de nitrogênio (Nox), material

particulado (MP) e óxido de enxofre (Sox) foram conduzidos até a câmara de exposição, por tubos de distribuição, associados a uma mistura de ar ambiente filtrado em 98% por um filtro de ar mecânico e químico (modelo ECU-100, Purafil, EUA). Essa mistura foi utilizada para diluir os gases resultantes da queima do diesel, com a função de reduzir a dosagem de intoxicação, de modo a garantir a sobrevivência animal. Os animais controles foram expostos apenas ao ar filtrado e, para tanto, a válvula de abertura dos gases provenientes da queima do diesel foi fechada. A exposição foi realizada 2 vezes por semana, durante 2 horas cada exposição. Durante o período de exposição os animais foram monitorados em tempo real verificando a concentração de MP_{2,5} (TrakPro versão 3.6.1.0, EUA), emissões de CO (ToxyPro), emissão de NO (óxido nítrico), NO₂ (dióxido de nitrogênio) e O₃ (ozônio) pressão dentro da câmara de exposição, nível de ruído (decibelímetro digital), temperatura e umidade relativa (termohigrômetro digital, modelo DHT-2000, Brasil). A concentração de MP_{2,5} dentro da câmara de exposição foi controlada e mantida em 600 µg/m³. Os animais receberam, via inalação, quantidade de MP_{2,5} correspondente à dose que depositaria nos pulmões durante 24 h de exposição, em um ambiente de movimentado trânsito veicular, em um grande centro urbano como São Paulo, com média diária de MP_{2,5} de aproximadamente 25 µg/m³ (44).

3.2. Material coletado

- ✓ **Sangue** – separação de soro e plasma
- ✓ **Coração** – pelo processo de toracotomia mediana, o coração foi removido e dividido em 3 partes: base, porção média e ponta. A base e a ponta foram congelados em nitrogênio líquido e a porção média foi mantida em formol 10% e, posteriormente, emblocada em parafina.
- ✓ **Fígado, rins e pulmões** – coletados em formol e congelados.

3.3. Análise morfológica

O coração emblocado em parafina foi submetido a cortes transversais em secções de 4 µm de maneira a analisar os ventrículos direito e esquerdo separadamente. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas, para evitar

deslocamento dos mesmos durante os procedimentos histológicos. Foram corados por *picrosirius red* e, posteriormente, realizada a análise morfométrica para a quantificação da fração do volume de colágeno intersticial (FVCI). Para tanto, foi utilizado o programa *Qwin Image Processing and Analysis Software* (Leica Microsystems Cambridge Ltd.) acoplado à microscopia ótica. A quantificação da fração da área de colágeno intersticial foi determinada calculando-se a porcentagem da área de colágeno sobre a área total do miocárdio, analisando-se todos os campos de um corte, utilizando-se a objetiva de 5x⁶¹.

3.4. Ecocardiograma

Ecocardiograma transtorácico modo M, bidimensional e Doppler pulsado foi realizado utilizando-se o aparelho GE *Vivid E9* com transdutor de frequência de 4 a 12 MHz. Os exames foram realizados por examinador cego aos grupos estudados. O padrão de contração regional e global foi avaliado em tempo real nos cortes paraesternal longitudinal e transversal do ventrículo esquerdo (VE). As dimensões cardíacas sistólicas e diastólicas foram analisadas pelo modo M. A função ventricular sistólica foi calculada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo (método de Teichholz) e pela fração de encurtamento do VE (ΔD)⁶².

A função diastólica foi avaliada pela análise das velocidades da onda E, onda A, relação E/A, tempo de desaceleração (TD) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) ao Doppler pulsátil do fluxo de via de entrada do VE.

Foi calculado o índice de performance miocárdica (IPM ou índice Tei) do ventrículo esquerdo, conforme segue: $IPM = (TCIV + TE + TRIV) - TE/TE$, onde TCIV corresponde ao tempo de contração isovolumétrica, TE corresponde ao tempo de ejeção e TRIV corresponde ao tempo de relaxamento isovolumétrico avaliados ao estudo Doppler da valva mitral e da via de saída do VE⁶².

O ecocardiograma dos animais foi realizado de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. Os animais foram submetidos a esse procedimento no início do estudo, no 1º e no 10º mês após a infecção. O exame foi realizado sob sedação com combinação de ketamina (50 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. A realização do

ecocardiograma seguiu a padronização em pequenos roedores. Foram considerados valores normais de referência os resultados advindos da análise ecocardiográfica do grupo de animais sadios designado controle⁶³.

3.5. Análise da expressão gênica – técnica PCR em tempo real

3.5.1. Isolamento do RNA total

Após o sacrifício dos animais, o tecido cardíaco (ápice) foi retirado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído, utilizando-se miRNeasy Mini Kit (*Qiagen, EUA*), conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese e sua concentração determinada por meio de leitura em espectrofotômetro no aparelho *Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA)*. O RNA isolado foi armazenado a -80°C e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

3.5.2. Transcrição reversa: síntese de DNA complementar (cDNA)

Para cada 12,0 μL contendo 1,0 μg de RNA a ser reversamente transcrito foram adicionados 0,5 μL de Oligo dT (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, *Invitrogen*), 0,5 μL de *Random Hexamers* (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$, *Invitrogen*) e 1,0 μL de solução com mistura de dNTPs (10 mM , *Invitrogen*). Este produto foi incubado, por 5 minutos, a 65°C para sua denaturação e, em seguida, foi imediatamente resfriado (etapa realizada no gelo) por 2 minutos.

A seguir, foram adicionados a cada amostra 4,0 μL do tampão de síntese 5x (*RT Buffer, Invitrogen*), 2,0 μL de DTT 0,1M (*Invitrogen*), 1,0 μL de inibidor de Rnase (*RNaseOUT 40U/ μL , Invitrogen*) e, por fim, 1,0 μL da enzima transcriptase reversa (*Superscript II Reverse Transcriptase 200U/ μL , Invitrogen*), totalizando um volume final de 20 μL de reação. Cada amostra foi levemente homogeneizada e, novamente, incubada por 2 minutos a 42°C , e por 15 minutos a 70°C .

Ao final da reação, as amostras apresentavam concentração final de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (1000 ng de RNA em 20 μL de volume total). Foram diluídas na proporção 1:5 e armazenadas em -20°C .

3.5.3. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A expressão gênica das citocinas anti e pró-inflamatórias (IL10, IFN- γ e TNF- α), dos genes da apoptose anti e pró-apoptóticos (BCL2 e CASP3) e estresse oxidativo (NOX1, NOX4, MnSOD e iNOS) foi analisada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real. O sistema de emissão de luz selecionado para o estudo foi o TaqMan que utiliza, além dos *primers*, sondas fluorescentes para a detecção e quantificação do produto de PCR. Esse tipo de detecção é altamente específico, não necessitando de padronização da reação. Os oligonucleotídeos foram desenhados e sintetizados pela empresa *Thermo Fisher Scientific (USA)*.

As reações de amplificação foram realizadas no *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies, EUA)* com *software* que gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido automaticamente, no qual a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo, cuja fluorescência da amostra intercepta o *threshold*, é chamado Ct (*cycle threshold*).

Todas as reações foram realizadas em duplicata e consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão $<0,5$ ou quando apresentaram diferença de Ct <1 . Cada reação apresentava volume final de 20 μL , constituídos de 10 μL do reagente *TaqMan Gene Expression Master Mix 2x (Applied Biosystems)*; 6,0 μL de água MilliQ; 1,0 μL do sistema *TaqMan Gene Expression Assays 20x (Applied Biosystems)* específico para cada gene-alvo a ser analisado, e um para cada gene normalizador (GAPDH e β -actina); no final foram adicionados 3,0 μL de cDNA diluído (1:5). As condições de termociclagem seguiram os parâmetros do aparelho, ajustados para um pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos *primers* e extensão.

A expressão gênica foi calculada pelo método Ct comparativo demonstrado, descrito por Livak e Schmittgen (2001)⁶⁴. O valor de ΔCt equivale

à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. A diferença entre os valores de Ct (Δ Ct), entre as amostras para cada gene-alvo, após normalização pelo Ct do gene de expressão constante (*housekeeping gene* ou *endogenous control gene*), reflete sua expressão diferencial. A Tabela 1 mostra o detalhamento e sequência dos primers e sondas dos genes de interesse e dos genes normalizadores utilizados nesse estudo.

Tabela 1 - Sequência de *primers* e *probes*

Gene	Primers e Probes	Fragmento	ID Thermo
IL10	F: CCAGAAATCAAGGAGCATTGAA R: GAAGACCCTCAGGAGGCAACT P: TCCCTAGGAGAGAAGC	62 pb	APYMJ2F
IFN- γ	F: GCGTTGGCCTAGCTCTGAGAT R: GCAGAGCAACAAAGCCAAGAT P: ATGCACACCACACGTT	79 pb	AP322R7
TNF- α	F: ACACTGTCAGCCGCATTGC R: TGGCGGACAGGAGGTTGA P: TGTCCTACGAGGATAAC	57 pb	APAAAVP
MnSOD	F: GACACTGCGTTTCTGATTTTGC R: GGTCAATTTCCACAGTGCACAA P: CAGTGTTTGCACATGGA	68 pb	APDJXZJ
iNOS	F: CAGCCTGTGAGGCGTTTGAT R: AGCGTTTCGGGATCTGAATG P: TCCGAAGCAAACATC	57 pb	AP9HJGY
NOX1	F: GCAACCGCACACTGAGGAA R: TGCCACCAGCTTATGGAAGAT P: CCATTGGATCACAACT	59 pb	APZTEMD
NOX4	F: CTGAATGCAGCAAGATACCAAAA R: CCGTCAGACCCGGAACAG P: TCCTAGAAAAGCTTCTCTTCACA	70 pb	AP47WC4
BCL2	F: CCTCTGTCGTGCTCTTGAGATCT R: ACGGTTTGGCTTCACTGAAAA P: CAATTGGGATTCTACGAAT	70 pb	AP2W77A
CASP3	F: CCGGAAGGTGGCAACAGA R: TTTGCATGAAACGTGGAGTCA P: TTTGAGTCCTTTTCCC	57 pb	AP7DPW2
GAPDH	F: TGCTGGTGCCGAGTATGTTG R: GTGGGCCCCAGCCTTCT P: TCTACTGGCGTCTTCA	67 pb	APCE4FM
Beta Actina	F: TCCCCCTGAGCGCAAGTAC R: GTGGACAGTGAGGCCAGGAT P: TGTGTGGATCGGTGGC	60 pb	APXGRGH

3.6. Análise da expressão proteica - Técnica de ELISA

A determinação proteica pela técnica de ELISA foi estudada no tecido dos animais para análise da inflamação. A quantificação proteica das citocinas inflamatórias (IL10, IFN- γ e TNF- α) foi realizada através de *kits* comerciais da empresa *MyBioSource* (*San Diego, California, USA*), seguindo rigorosamente orientação da descrição do fabricante. Na Tabela 2, estão descritas as citocinas inflamatórias avaliadas e seus respectivos *kits*.

Tabela 2 - *Kits* das citocinas inflamatórias

Citocina	Kit Elisa - nº catálogo	Faixa de detecção
IL10	MBS023537	3,12 – 100 pg/ml
IFN- γ	MBS010146	6,25 – 200 pg/ml
TNF- α	MBS046042	31,2 – 1000 pg/ml

As amostras de tecido foram preparadas conforme descrito abaixo:

- para elaboração do extrato de tecido cardíaco, foi utilizada uma porção de 30 mg de tecido congelado homogeneizado e triturado em 300 μ L de tampão PBS em equipamento *MagnaLyser* (*Roche*) durante 30 segundos. Em seguida, esse material foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm e coletado, o sobrenadante, cuidadosamente. O extrato foi utilizado imediatamente.

O início do protocolo prevê a manutenção de todas as amostras a serem analisadas e dos reagentes dos *kits*, à temperatura ambiente (18°C a 25°C), por 30 minutos. Passado esse tempo, foram pipetados 50 μ L amostra-alvo, amostra padrão (curva padrão) e amostra branca (controle negativo) na placa de ELISA, fazendo cada uma em duplicata. Foram adicionados 100 μ L de reagente conjugado HRP em cada poço e a placa foi incubada a 37°C, durante 60 minutos. Terminada a incubação, a placa passou por repetidas lavagens (4 vezes), utilizando tampão de lavagem proveniente dos *kits*. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de solução de cromógeno A, seguidos de 50 μ L de solução de cromógeno B em cada poço. A partir desse momento a placa precisou ficar protegida da luz e foi incubada, por 15 min, a 37°C. Então, para finalizar, foram

acrescentados 50 μ L de solução de parada na reação. A leitura das placas foi realizada com densidade óptica (OD) de 450 nm, nos primeiros 5 minutos, imediatamente após colocada a solução de parada. Todos os ensaios (IL10, IFN- γ e TNF- α) utilizaram o mesmo procedimento (figura 4).



Figura 3 - Montagem da placa de ELISA para citocinas inflamatórias

3.7. Análise da glutatona - espectrofotometria

A quantificação da glutatona total (reduzida e oxidada) foi realizada no tecido cardíaco. Para isso, utilizamos o *Glutathione Assay Kit* (Sigma-Aldrich, EUA). A quantificação por espectrofotômetro e o protocolo foi realizado seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. A tabela 3 detalha as especificações desse *kit*.

Tabela 3 - *Kit* glutatona

	Kit ELISA - nº catálogo	Faixa de detecção
Glutaciona	CS0260	3,125 – 50 μ M

Para realização desse protocolo, foi necessário obter um extrato do tecido cardíaco. Um fragmento de peça com aproximadamente (20 mg), adicionados 3 volumes (600 μ L) de solução a 5% de ácido 5-sulfosalicílico (SSA). Em seguida, o material foi triturado em equipamento *MagnaLyser* (Roche) durante 30 segundos e, novamente, acrescentados 7 volumes (1400 μ L) da solução SSA a

5%. Posteriormente, essa mistura ficou à temperatura de 2^o-8^oC durante 10 minutos e foi centrifugada a 10.000 x g, durante 10 minutos. Foi realizada medição do volume do sobrenadante, para ser usado no cálculo da determinação da glutatona como volume original da amostra. Para realização do procedimento, foi necessária uma diluição do extrato 5 vezes.

As amostras alvo passaram por um processo de desproteíntização, em solução de ácido 5-sulfosalicílico a 5% e, em seguida, foram centrifugadas para remover a proteína precipitada. Cada amostra diluída e desproteíntizada foi acrescida de 150 µL de uma solução mistura composta por: 228 µL da solução enzimática diluída (6 unidades/mL) e 228 µL de *DTNB Stock Solution* (1,5 mg/mL). Essa solução foi adicionada aos 5 pontos de curva padrão, à amostra branca (controle negativo da reação) e às amostras desconhecidas. Segue, na tabela 4, a descrição dos itens adicionados a cada poço da placa.

Tabela 4 - Preparação da placa – *kit* glutatona

Tipo de amostra	Mistura
Reagente branco	10 µL de SSA 5% + 150 µL de solução de mistura
Pontos da curva padrão	10 µL de GSH + 150 µL de solução de mistura
Amostra alvo	10 µL de amostra + 150 µL de solução de mistura

As amostras foram quantificadas em duplicata. A placa, depois de totalmente distribuída, passou por um processo de incubação, durante 5 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, foi pipetado 50 µL de NADPH (0,16 mg/mL). A leitura das placas foi realizada imediatamente utilizando densidade óptica (OD) de 412 nm com leitura cinética, em intervalos de 1 minuto por 5 minutos.

3.8. Análise da apoptose – técnica de TUNEL

A análise das células em processo de apoptose foi verificada *in situ*, pela técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling*), utilizando-se o *kit in situ* “*Cell Death Detection Kit, POD*” (Roche Applied Science, Germany).

O tecido foi fixado em formol e emblocado em parafina. Cortes de tecido cardíaco de 5 µm foram cortados e as lâminas foram desparafinadas em banhos de xilol à temperatura ambiente e lavadas em água. A permeabilização foi feita com proteinase K (2,5 µg/ml), em solução Tris-HCl 10 mM pH 7.4, imersa em banho-maria a 37°C por 3 minutos e meio. Em seguida, foi realizado o bloqueio com peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 6%, durante 10 minutos, seguido de lavagens abundantes em água corrente. Por fim, as lâminas foram mergulhadas em PBS e incubadas com o reagente de TUNEL, por 60 minutos, a 40°C. Foram adicionados 30 µL de reação de TUNEL em cada corte, e depois as lâminas foram lavadas em PBS 3 vezes durante, 5 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foi adicionado o POD e seguiu-se o protocolo de incubação em câmara úmida, por 30 minutos, a 37°C. Por fim, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e reveladas com o DAB. A coloração foi feita com hematoxilina.

As lâminas foram escaneadas e analisadas em aparelho *Scan Scope* (*Aperio, EUA-Vista, CA*) utilizando-se o *software Image Scope* em aumento de 20X.

3.9. Análise da peroxidação lipídica (MDA) – espectrofotometria

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a partir da mensuração do malonaldeído (MDA) que é um dos principais produtos produzidos nesse processo. A quantificação do MDA foi realizada a partir do *Kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (*Sigma-Aldrich, EUA*). Esse protocolo foi realizado em tecido cardíaco, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante, conforme descrito abaixo:

O extrato do tecido foi realizado com 10 mg de fragmento cardíaco. Esse fragmento foi triturado em equipamento *MagnaLyser* (*Roche*) durante 30 segundos com 300 µL de tampão MDA de lise contendo 3 µL de BHT (100x). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 x g durante 10 minutos para remover o material não dissolvido.

Após obtenção do extrato, foram acrescentados 600 μL de solução TBA em cada microtubo da amostra-alvo, curva padrão e branco. Essa mistura foi incubada a 95°C durante 60 minutos e, em seguida, foi colocada em banho de gelo, durante 10 minutos. Para aumentar a sensibilidade do método, foram adicionados 300 μL de n-butanol aos 800 μL de amostra e 100 μL de NaCl 5M. Foi agitada em vortex vigorosamente e, posteriormente, centrifugada a 16.000 x g, durante 3 minutos, para separar as fases. Em seguida, foi transferida a fase do n-butanol (superior) para um novo tubo e colocado em banho seco a 55°C , para evaporar o álcool. Após secar o tubo, foi dissolvido o resíduo em 200 μL de água e transferido todo esse volume para placa de leitura.

As amostras foram analisadas e quantificadas em duplicata. A leitura das placas foi realizada por colorimetria e usando densidade óptica (OD) de 532 nm.

3.10. Análise de espécies reativas de oxigênio – ROS (DHE)

A realização desse experimento foi possível a partir do di-hidroetídio (DHE) que é uma sonda não fluorescente, permeável à membrana passível de ser oxidada em diferentes produtos fluorescentes, entre os quais os dois mais bem estudados são: 2-hidroxi-etídio (2-E + OH) e etídio (E+). O primeiro é formado exclusivamente na presença de ânion superóxido. O outro (etídio) é formado na presença de oxidantes de 1 elétron ou enzimaticamente, de modo que a identificação E+ informará sobre a geração total de oxidante e não é específica para identificar uma ROS em particular. Portanto, a análise microscópica da fluorescência total, derivada de DHE em células e tecidos, identificará ROS geral, sendo possível a diferenciação dos dois produtos, apenas por HPLC.

Nesse protocolo, o tecido cardíaco foi fixado em formol e embocado em parafina. As lâminas foram desparafinadas em banhos de xilol à temperatura ambiente e lavadas em PBS com Tween 1%, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com reagente DHE (5 mM), durante 10 minutos, a 37°C em câmara escura umidecida. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS por 2 vezes e foram colocadas para secar, no escuro, por um período mínimo de 4 horas. Passado esse período, foi pipetado reagente prolong[®] e o corte foi protegido com lamínula. Foi mantido no escuro por mais

1 hora para secar o prolong[®] e armazenado em freezer -20°C. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência e a quantificação das ROS deu-se a partir de fotos em aumento de 20x, utilizando o *software IrfanView*.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foram expressas pela média e desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis mínimo e máximo. As variáveis qualitativas foram expressas pela frequência absoluta e porcentagem. O teste de Kolmogorov–Smirnov foi utilizado para avaliação da distribuição da amostra. Nos casos de distribuição normal, foram aplicados ANOVA e Tukey para as diferenças. Nos casos de distribuição não-normal, foi utilizado método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das medidas quantitativas entre os grupos. Quando houve diferenças significativas entre os grupos, foram aplicadas comparações múltiplas aos pares, com correção de Bonferroni⁶⁵.

Na comparação entre os grupos, e ao longo do tempo, foi utilizada ANOVA não paramétrica para medidas repetidas.

Foi utilizado o método de Kaplan-Meier para construção das curvas de sobrevida e comparadas com o teste log-rank. Quando houve diferença entre as curvas, foram aplicadas comparações múltiplas aos pares, com correção de Bonferroni.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1. Análise morfológica

5.1.1. Colágeno intersticial do ventrículo esquerdo (VE) e do ventrículo direito (VD)

A análise do acúmulo do colágeno intersticial foi avaliada pela técnica *picrosirius red*. Pode-se notar uma deposição maior nos grupos chagásicos como demonstra a figura 4.

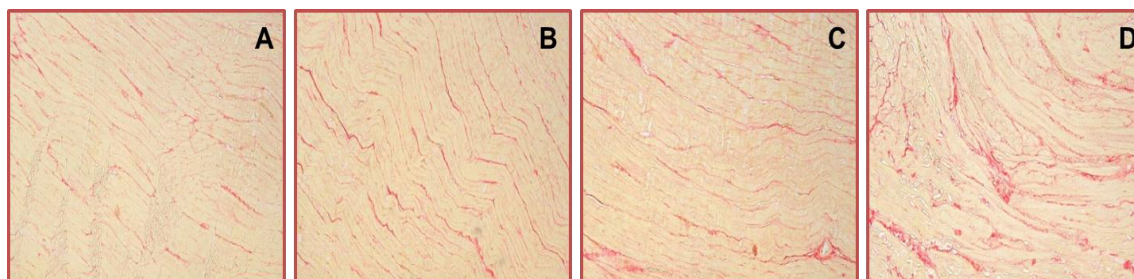


Figura 4 - Fotomicrografia do miocárdio corado com *picrosirius red* (em vermelho a marcação do colágeno)

A: miocárdio de um animal controle; **B:** miocárdio de um animal controle exposto à poluição; **C:** miocárdio de um animal infectado; **D:** miocárdio de um animal infectado exposto à poluição

Analisando o colágeno intersticial, com as amostras de todo o estudo, observa-se maior deposição nos grupos chagásicos em relação aos controles, tanto no VE ($p < 0,05$) quanto no VD ($p < 0,05$) (figura 5A). Se analisarmos separadamente a fase aguda (até 60 dias pós-infecção) (figura 5B) e a fase crônica (figura 5C) observamos, novamente, maior deposição de colágeno no VE dos grupos chagásicos comparados ao controle. Chamamos a atenção de que, na fase aguda, a poluição aumentou a fibrose no grupo controle exposto à poluição em relação ao controle ($p = 0,02$). Observamos que, em nenhuma fase (total, aguda ou crônica), a poluição amplificou a deposição de colágeno intersticial nos grupos infectados.

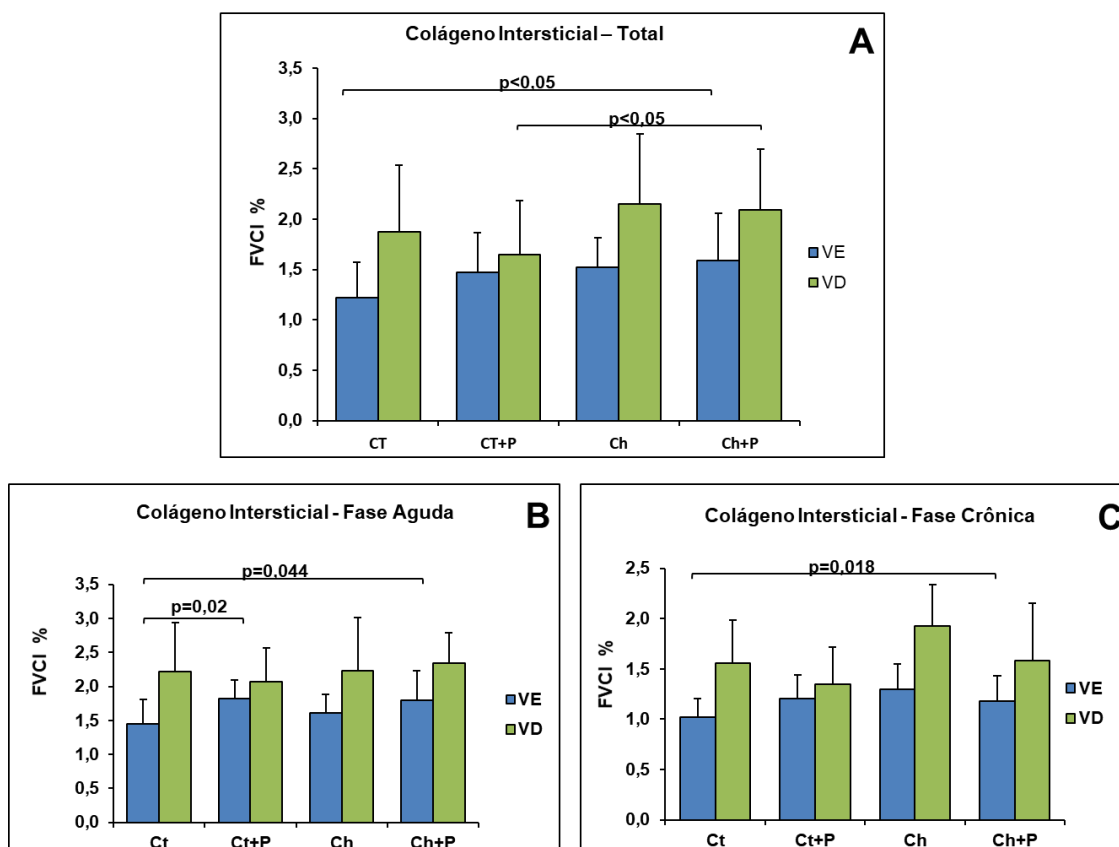


Figura 5 - Fração do volume de colágeno intersticial (FVCI)

A: FVCI casuística completa (total). **B:** FVCI na fase aguda (60 dias). **C:** FVCI na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição, VE – ventrículo esquerdo e VD – ventrículo direito

5.2. Ecocardiograma

5.2.1. Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo – DDVE

Na análise da geometria do coração, observamos que o diâmetro diastólico final do VE (DDVE), nos animais sobreviventes aos 10 meses, apresentou aumento da dilatação do grupo controle exposto à poluição, em comparação ao grupo chagásico (figura 6A). Nos grupos chagásicos, a poluição não aumentou o DDVE.

Na fase aguda (animais até 60 dias pós-infecção), observamos dilatação do VE no grupo chagásico comparado aos controles (Ct x Ch e Ct+P x Ch) (figura 6B). Mais uma vez, a poluição não aumentou a dilatação entre os grupos infectados.

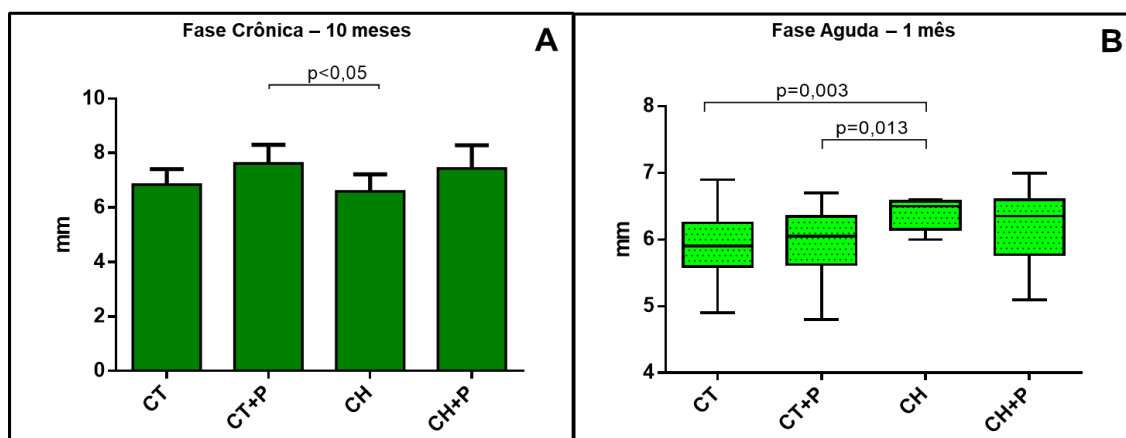


Figura 6 - Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDVE – mm)

A: DDVE aos 10 meses. **B:** DDVE na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.2. Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo – DSVE

Na análise do diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSVE), nos animais sobreviventes aos 10 meses, observamos que houve aumento da dilatação na comparação entre os grupos, sendo estatisticamente significativa, quando comparado os grupos Ct+P x Ch (figura 7A). A poluição não aumentou o DSVE, nesse período, entre os grupos infectados, apesar de observarmos um aumento do valor absoluto nos grupos expostos a poluição (Ct+P e Ch+P).

Na fase aguda (animais até 60 dias pós-infecção), observamos dilatação do VE no grupo chagásico (Ch x Ct, $p < 0,05$) e (Ch x Ct+P, $p < 0,05$) e, apesar da não significância estatística, também foi maior no grupo chagásico exposto à poluição (Ch+P) (figura 7B). Mais uma vez, a poluição não aumentou essa dilatação entre os infectados.

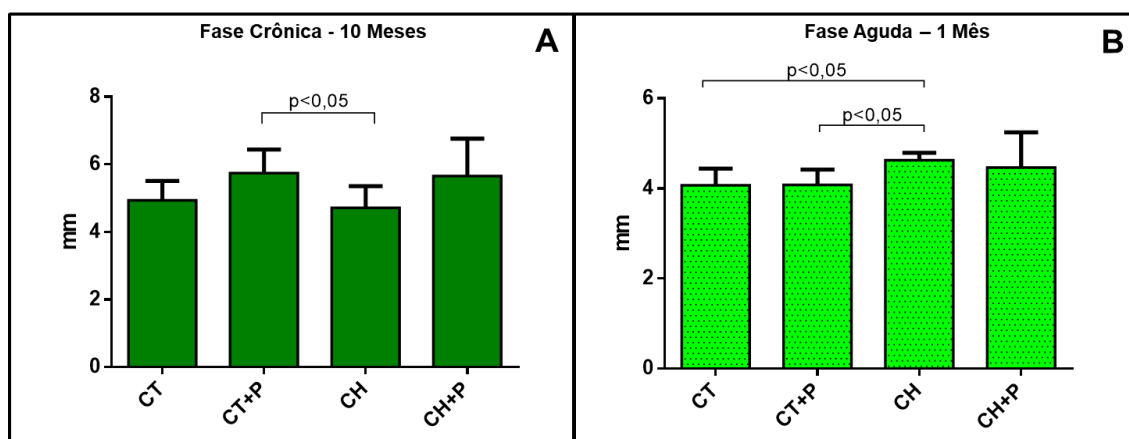


Figura 7 - Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSVE – mm)

A: DSVE aos 10 meses. **B:** DSVE na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.3. Fração de ejeção – FE

Ao analisar um dos parâmetros da função sistólica do VE, como a fração de ejeção (FE), não observamos piora dessa variável nos animais sobreviventes aos 10 meses. Na fase aguda (até 60 dias pós-infecção), nota-se piora desse parâmetro no grupo chagásico (Ch x Ct, $p < 0,01$) e (Ch x Ct+P, $p < 0,01$) e, embora não apresente significância estatística, o grupo chagásico exposto à poluição (Ch+P) também apresentou diminuição dessa função (figura 8).

Na fase crônica, apesar da não significância estatística ($p = 0,094$), observamos aos 10 meses, que houve redução absoluta da FE nos animais expostos à poluição (Ct+P e Ch+P) (figuras 8A), mas sem significância estatística na comparação Ch x Ch+P, demonstrando não haver piora da função causada pela poluição.

Na fase aguda da infecção (até 60 dias pós-infecção), houve piora na fração de ejeção dos animais infectados comparados aos grupos controle ($p = 0,002$) (figura 8B). Chamamos a atenção de que a poluição do ar não piorou a fração de ejeção nos animais infectados.

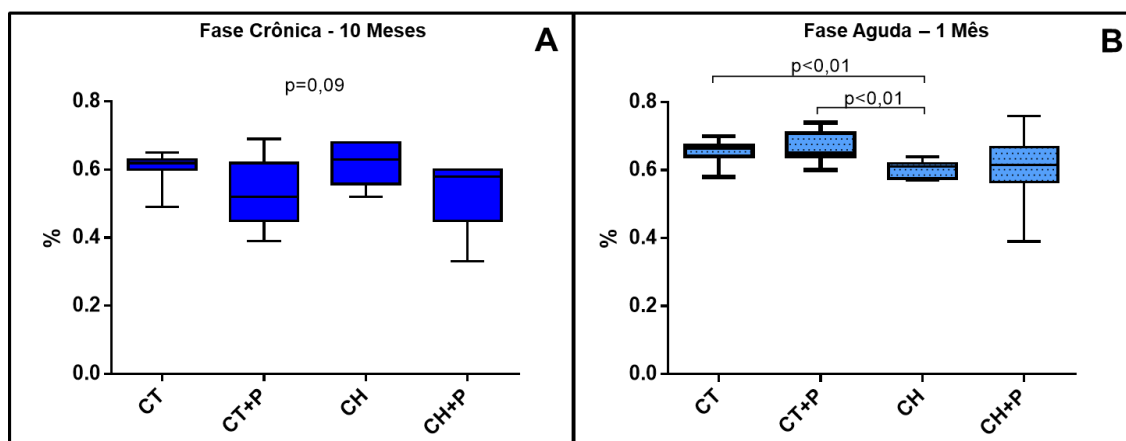


Figura 8: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE)

A: FE aos 10 meses. **B:** FE na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.4. Fração de encurtamento - ΔD

Outro parâmetro de avaliação de função sistólica é a fração de encurtamento (ΔD). Ao observarmos a fase crônica, não notamos piora dessa variável nos animais sobreviventes aos 10 meses, sem diferença estatística ($p=0,092$), com redução não significativa do grupo Ct+P (figura 9A). Outra observação é que os grupos expostos à poluição (Ct+P e Ch+P) apresentam redução do ΔD , em comparação aos grupos não expostos (Ct e Ch), mas sem significância estatística.

Na fase aguda, houve redução do ΔD no grupo chagásico, comparado aos controles (Ct x Ch e Ct+P x Ch) (figura 9B). Novamente, a poluição não piorou essa variável nos grupos infectados.

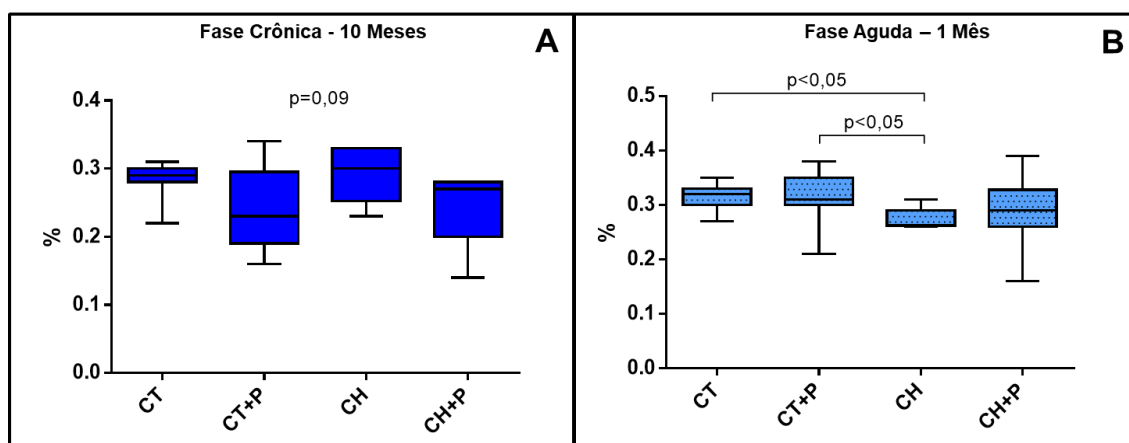


Figura 9 - Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (ΔD)

A: ΔD aos 10 meses. **B:** ΔD na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.5. Relação E/A

Ao analisarmos a variável da relação do doppler da válvula mitral E/A, observamos que o grupo chagásico apresentou menor relação E/A, em comparação aos outros grupos ($p=0,003$) aos 10 meses (figura 10A).

Na fase aguda, apenas o grupo chagásico exposto à poluição mostra diferença significativamente maior que o grupo controle (figura 10B). Mais uma vez, analisando esta variável de função diastólica, não observamos interferência da poluição entre os grupos infectados.

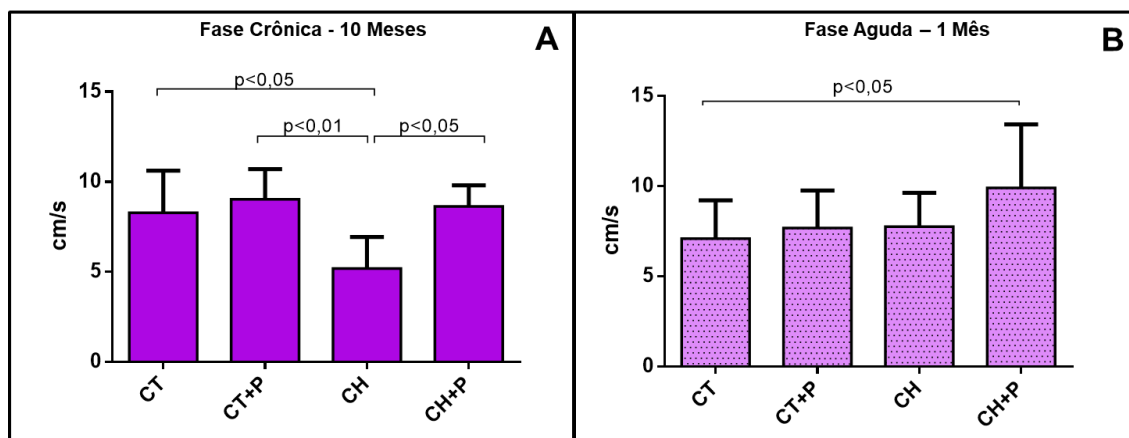


Figura 10 - Relação onda E sobre onda A (E/A)

A: E/A aos 10 meses. **B:** E/A na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.6. Tempo de desaceleração – TD

Observamos redução do tempo de desaceleração (TD) nos grupos expostos à poluição, infectados ou não, nos animais sobreviventes aos 10 meses, mas sem significância estatística na comparação entre os grupos ($p=0,111$) (figura 11A).

Na fase aguda, o grupo chagásico exposto à poluição apresentou TD mais elevado em relação ao grupo controle, com significância estatística entre eles ($p<0,05$) (figura 11B).

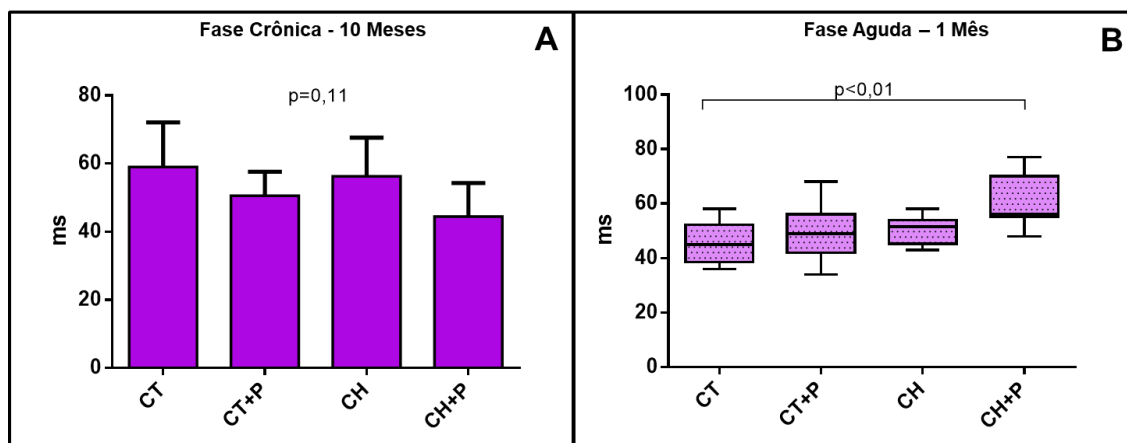


Figura 11 - Tempo de desaceleração (DT)

A: DT aos 10 meses. **B:** DT na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.7. Tempo de relaxamento isovolumétrico – TRIV

Outra variável, para avaliar a função diastólica, é o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). Nos animais sobreviventes, não houve diferença estatisticamente significativa na análise entre os grupos. ($p=0,801$) (figura 12A).

Na fase aguda, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0006$), onde o grupo chagásico exposto à poluição (Ch+P) apresentou maior TRIV, comparado aos demais grupos (figura 12B). Nessa análise, a poluição sugeria poder modular essa variável.

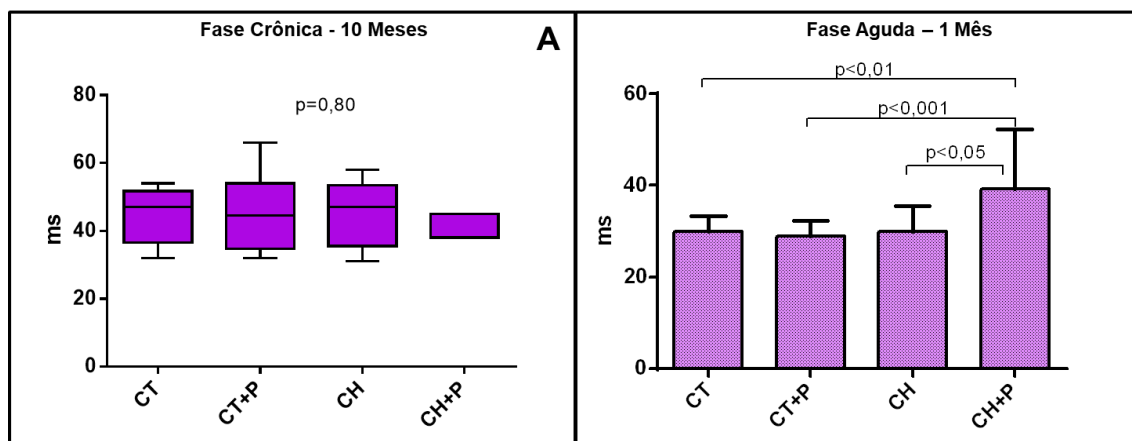


Figura 12 - Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV)

A: TRIV aos 10 meses. **B:** TRIV na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.2.8. Índice de performance miocárdica – IPM

O índice de performance miocárdica (IPM) avalia função global do coração. Não houve diferenças, aos 10 meses, nos animais sobreviventes na comparação entre os grupos (figura 13A).

Na fase aguda, não houve diferença estatística, apesar do nível de significância marginal ($p=0,06$). Observamos que os animais do grupo chagásico exposto à poluição (Ch+P), apresentou uma média menor em valores absolutos que os demais grupos na fase aguda (figura 13B).

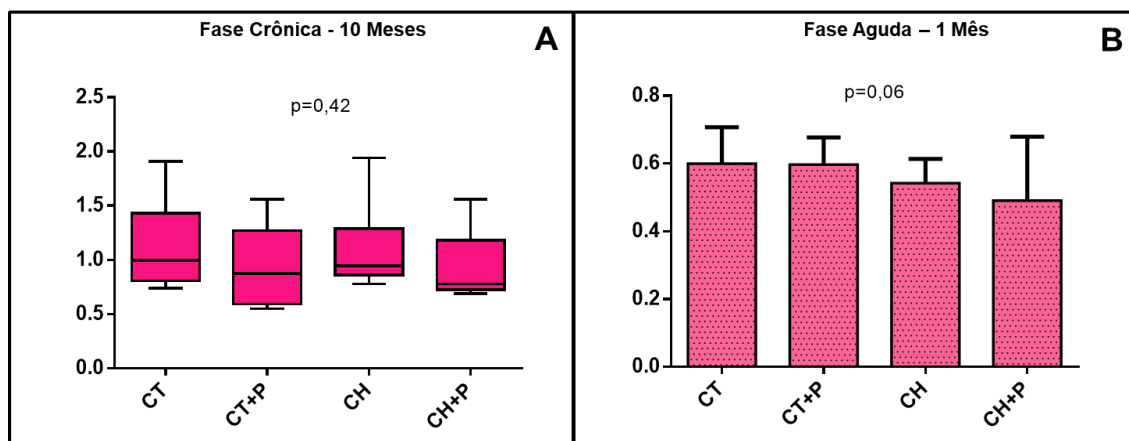


Figura 13 - Índice de performance miocárdica (IPM)

A: IPM aos 10 meses. **B:** IPM na fase aguda. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3. Expressão gênica

5.3.1. Avaliação das citocinas inflamatórias

Na análise referente à inflamação, os três genes (IL10, IFN- γ e TNF) apresentaram expressão com diferenças significativas, ao nível de 5%, entre os grupos, sendo mais expressados nos grupos chagásicos.

5.3.1.1. IL10

Na análise total da casuística, observamos maior expressão da IL10 nos grupos infectados comparados aos controles. Podemos notar expressão mais acentuada no grupo chagásico exposto à poluição, comparado ao chagásico, mas sem diferença estatística entre eles (figura 14A). A análise na fase aguda apresentou o mesmo padrão de expressão gênica, sendo mais expressos nos grupos chagásicos (figura 14B). Já, na fase crônica, evidenciamos o grupo chagásico exposto à poluição com expressão aumentada de IL10, mas sem significância estatística comparado aos outros grupos ($p=0,524$) (figura 14C).

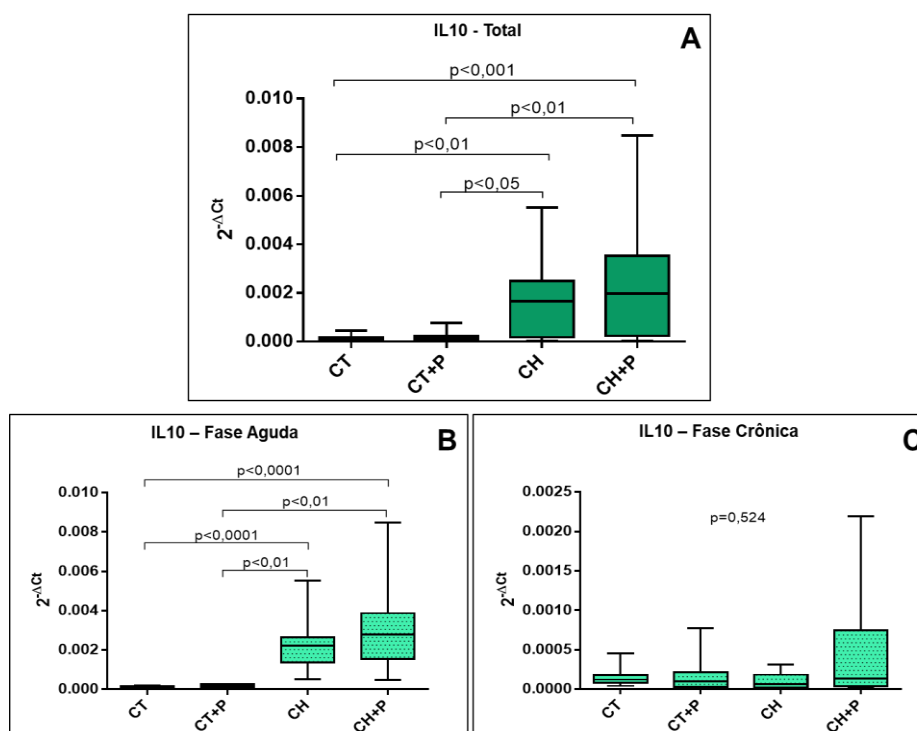


Figura 14 - Expressão absoluta do gene IL10

A: IL10 casuística completa (total). **B:** IL10 na fase aguda (até 60 dias). **C:** IL10 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.1.2. IFN- γ

Quando analisamos o gene IFN- γ , tendo como foco a casuística total, notamos maior expressão desse gene nos grupos chagásicos, quando comparado aos grupos controles. Observamos que, apesar de não ser detectada uma diferença estatística, o grupo chagásico exposto à poluição apresenta maior mediana da expressão desse gene, em relação grupo chagásico (figura 15A).

Na fase aguda, notamos o mesmo padrão de expressão acentuada nos grupos chagásicos comparados aos controles (figura 15B). Já, na fase crônica, não houve significância estatística na comparação entre os grupos ($p=0,093$) (figura 15C) apesar de, em números absolutos, a mediana do grupo chagásico exposto à poluição ser mais elevado.

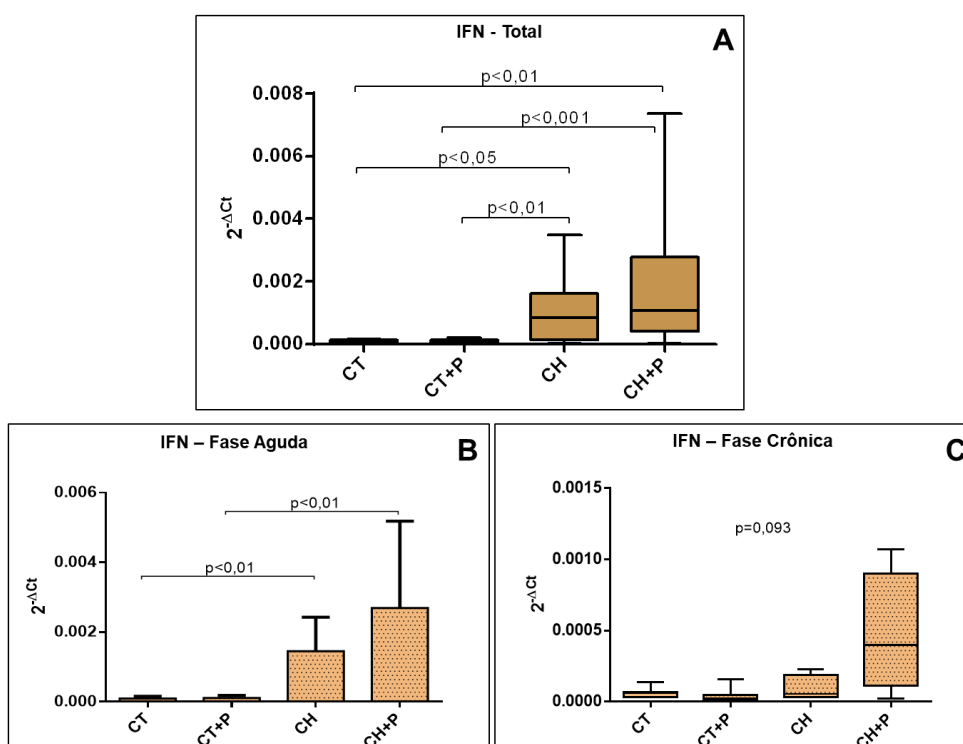


Figura 15 - Expressão absoluta do gene INF- γ

A: IFN- γ casuística completa (total). **B:** IFN- γ na fase aguda (até 60 dias). **C:** IFN- γ na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.1.3. TNF

Ao analisar o gene TNF, notamos maior expressão nos grupos chagásicos comparados aos grupos controles na avaliação da casuística completa (figura 16A). A fase aguda apresenta o mesmo padrão citado acima, com visível expressão aumentada nos grupos chagásicos (figura 16B). A análise da fase crônica não demonstrou significância estatística na comparação entre os grupos estudados (figura 16C). Observamos que, em nenhuma fase, a poluição amplificou a expressão de TNF nos grupos infectados.

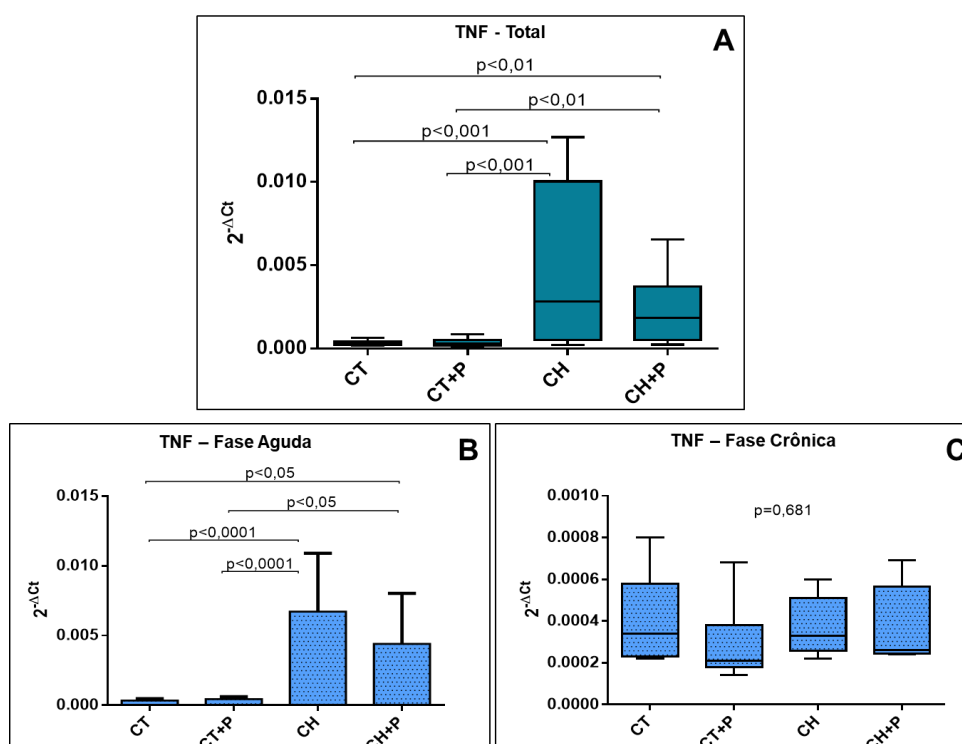


Figura 16 - Expressão absoluta do gene TNF

A: TNF casuística completa (total). **B:** TNF na fase aguda (até 60 dias). **C:** TNF na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.2. Avaliação do estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo mostrou alteração em 3 dos 4 genes estudados, sendo eles NOX1, MnSOD e iNOS. O NOX4, também avaliado, não demonstrou diferença estatística significativa.

5.3.2.1. NOX1

Avaliando a casuística total, nos 10 meses de experimento, notamos maior expressão de NOX1 no grupo chagásico exposto à poluição, apresentando significância quando comparamos os grupos controles (Ct x Ch+P e Ct+P x Ch) (figura 17A). Analisando a fase aguda, notamos os grupos chagásicos com maior expressão desse gene (Ct x Ch e Ct x Ch+P) (figura 17B). A avaliação da fase crônica demonstra maior expressão desse gene no grupo chagásico exposto à poluição, mas sem diferença estatística relevante (figura 17C). A exposição à poluição não amplificou a expressão da NOX1 entre os grupos infectados.

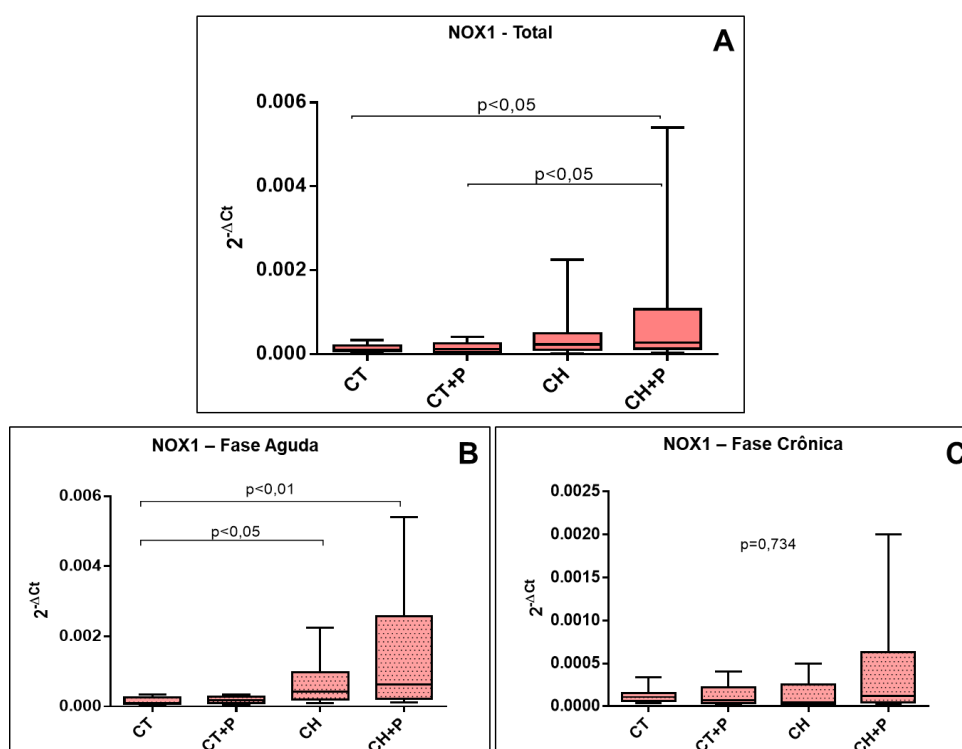


Figura 17 - Expressão absoluta do gene NOX1

A: NOX1 casuística completa (total). **B:** NOX1 na fase aguda (até 60 dias). **C:** NOX1 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.2.2. NOX4

O gene NOX4 não apresentou resultados com diferenças significantes de expressão gênica em nenhuma das fases analisadas: casuística total, aguda e crônica (figura 18).

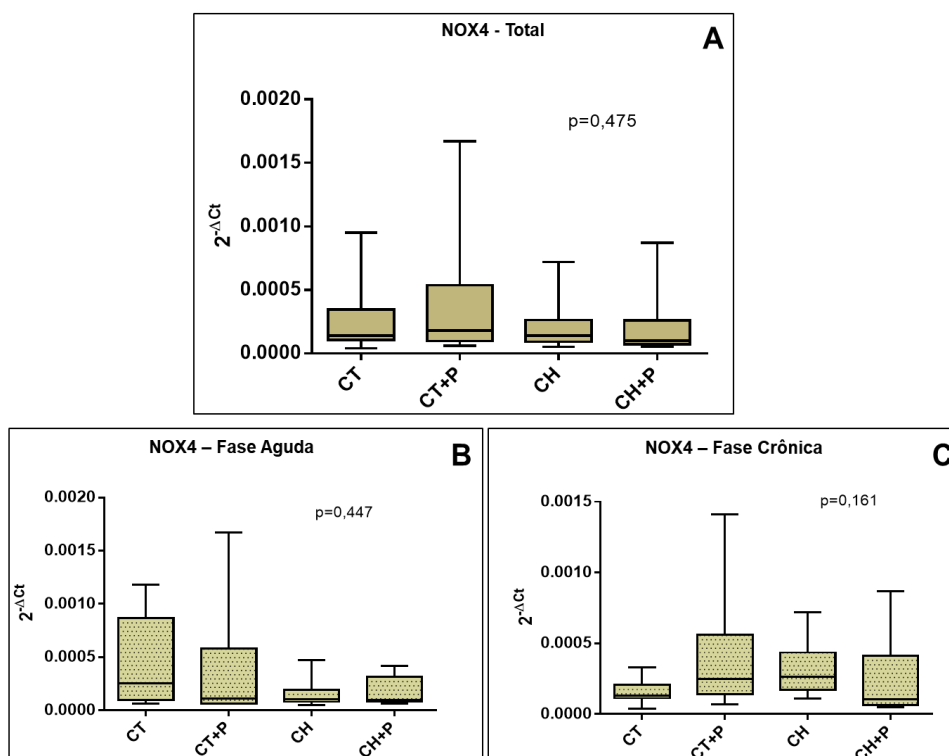


Figura 18 - Expressão absoluta do gene NOX4

A: NOX4 casuística completa (total). **B:** NOX4 na fase aguda (até 60 dias). **C:** NOX4 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.2.3. MnSOD

Avaliamos, também, o MnSOD que é outro gene envolvido no estresse oxidativo. Esse gene apresentou importante expressão nos grupos chagásicos, sendo que a poluição não intensificou essa resposta. Na análise total da casuística, a expressão desse gene foi aumentada nos grupos chagásicos comparados aos grupos controles (Ct x Ch, Ct x Ch+P, Ct+P x Ch, Ct+P x Ch+P) (figura 19A). Na fase aguda, tivemos resultados muito semelhantes ao apresentado na casuística total (figura 19B). A análise da fase crônica apresentou maior expressão desse gene nos grupos chagásicos, mas sem significância estatística (figura 19C). Na análise da expressão gênica do MnSOD, a poluição não intensificou essa resposta.

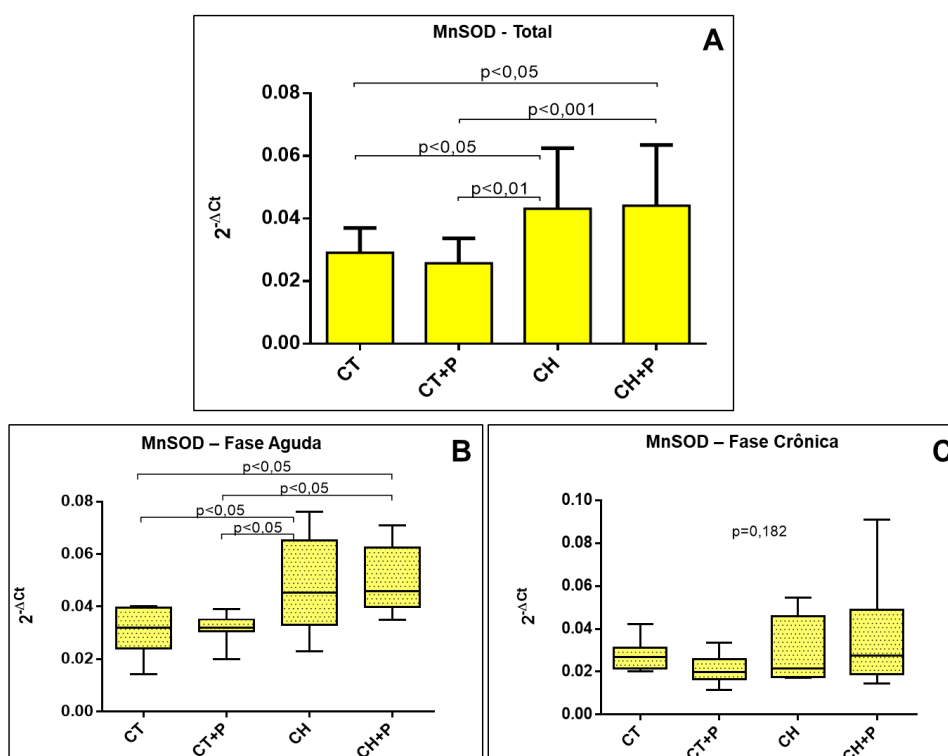


Figura 19 - Expressão absoluta do gene MnSOD

A: MnSOD casuística completa (total). **B:** MnSOD na fase aguda (até 60 dias). **C:** MnSOD na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.3.2.4. iNOS

Outro gene de estresse oxidativo analisado foi o iNOS. Como aconteceu com outros genes, sua maior expressão deu-se nos grupos chagásicos comparados aos controles. Na análise total do experimento, e na fase aguda, evidenciamos o mesmo padrão de expressão, sendo nos grupos chagásicos muito maior essa expressão que nos grupos controles (figuras 20A e 20B, respectivamente). A análise da fase crônica não apresentou resultado estatisticamente significativo (figura 20C). Mais uma vez, a poluição não modulou a expressão desse gene nos animais infectados.

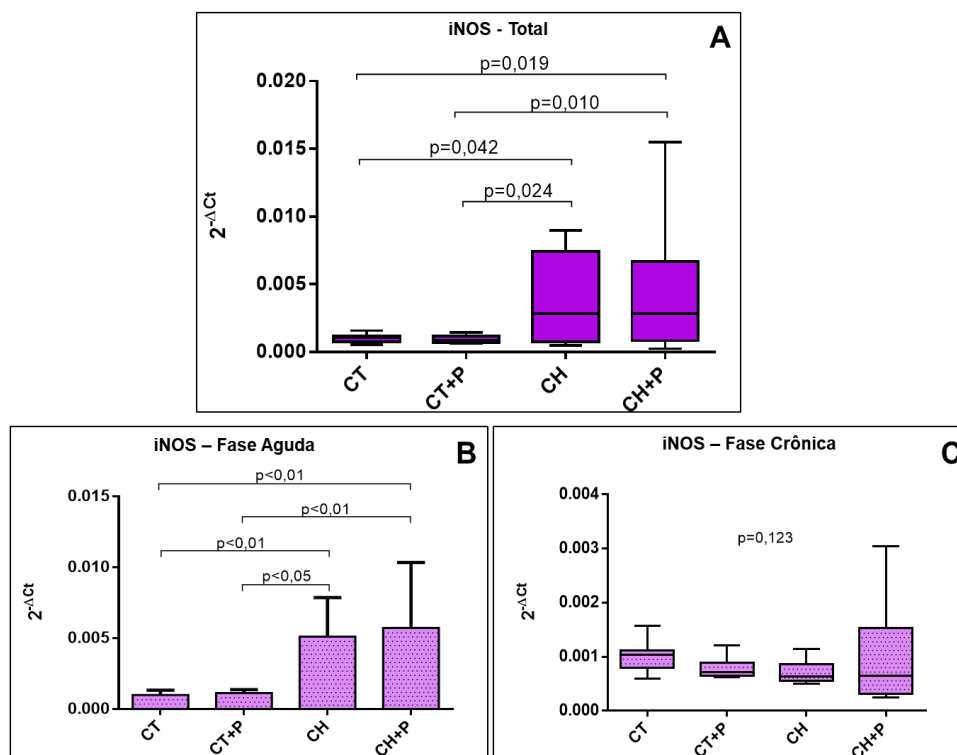


Figura 20 - Expressão absoluta do gene iNOS

A: iNOS casuística completa (Total). **B:** iNOS na fase aguda (até 60 dias). **C:** iNOS na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição.

5.3.3. Avaliação da apoptose

Para determinação da expressão gênica relacionada à apoptose, avaliamos a expressão dos genes BCL2 e CASP3.

5.3.3.1. BCL2

Na análise da casuística total dos 10 meses de experimento, observamos que os grupos infectados apresentam maior expressão do gene BCL2 em comparação aos controles. O grupo infectado exposto à poluição (Ch+P) apresentou expressão ainda maior que o grupo infectado (Ch) e, embora não tendo significância estatística entre esses grupos, apresentou p marginal de 0,064 (figura 21A). Quando separamos a fase aguda, observamos o mesmo padrão de resposta; com grupo Ch+P com expressão maior de BCL2 e p marginal na comparação entre esses grupos de 0,054 (figura 21B). Na fase crônica, mais uma vez, a poluição amplificou a resposta no grupo infectado exposto à poluição (Ch+P), mas sem significância estatística (figura 21C).

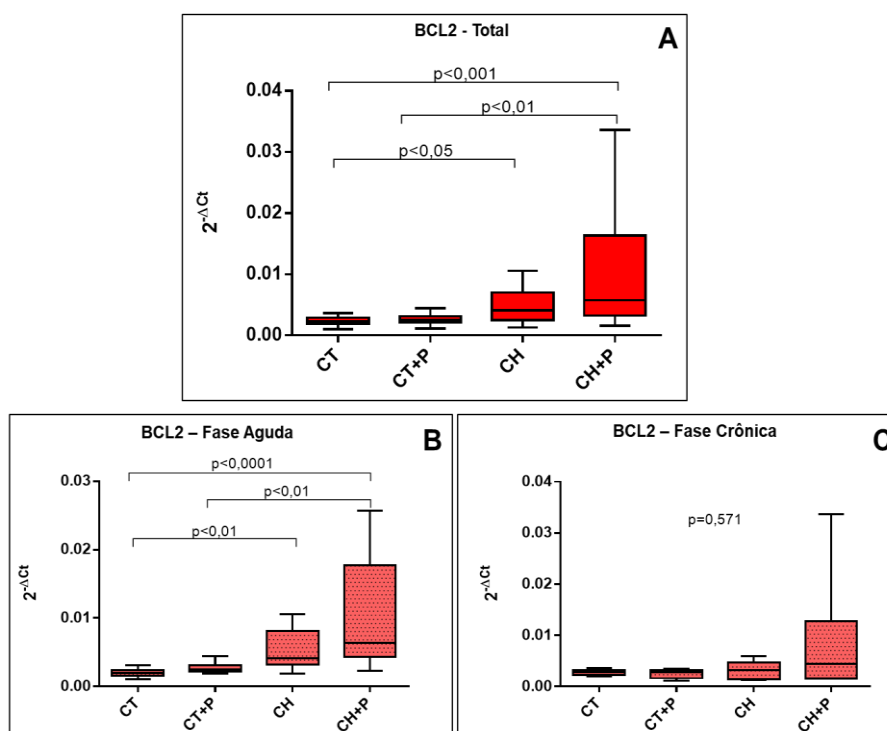


Figura 21 - Expressão absoluta do gene BCL2

A: BCL2 casuística completa (total). **B:** BCL2 na fase aguda (até 60 dias). **C:** BCL2 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição.

5.3.3.2. CASP3

Na análise da casuística total dos 10 meses de experimento, observamos que os grupos infectados apresentam maior expressão do gene CASP3 em comparação aos controles (figura 22A). Analisando a fase aguda, observamos o mesmo padrão de resposta com elevação da expressão da CASP3 nos grupos infectados, em comparação aos controles sem amplificação da expressão pela poluição nos grupos infectados (figura 22B). Na fase crônica, não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,150$) (figura 22C).

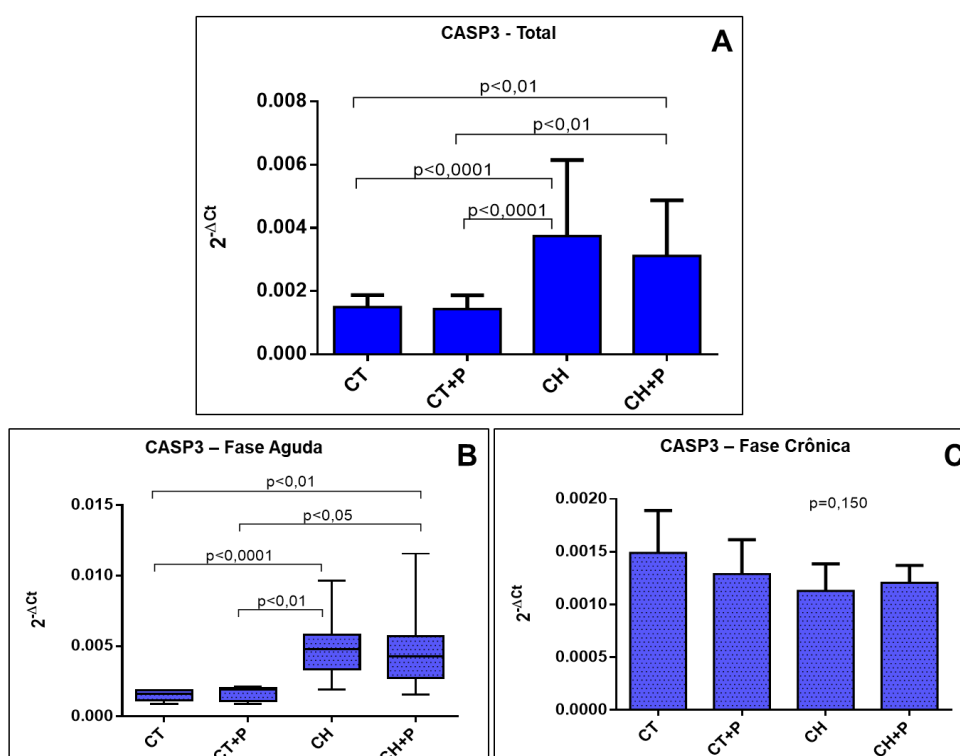


Figura 22 - Expressão absoluta do gene CASP3

A: CASP3 casuística completa (total). **B:** CASP3 na fase aguda (até 60 dias). **C:** CASP3 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.4. Análise proteica – ELISA

5.4.1. Avaliação das citocinas inflamatórias

A avaliação proteica das citocinas inflamatórias foi realizada no coração.

5.4.1.1. IL10

A avaliação da expressão proteica de IL10, na casuística total, mostrou aumento dessa expressão no tecido cardíaco dos animais infectados, mas sem significância estatística entre os grupos avaliados (figura 23A). Na fase aguda, tivemos o mesmo cenário com destaque para o aumento de IL10 no tecido dos animais infectados, com significância estatística comparando ao grupo controle exposto à poluição (Ct+P x CH e Ct+P x Ch+P) (figura 23B). Ao avaliarmos a fase crônica, observamos regularidade de expressão dessa proteína (figura 23C). Mais uma vez, a poluição não afetou a produção de IL10 no miocárdio.

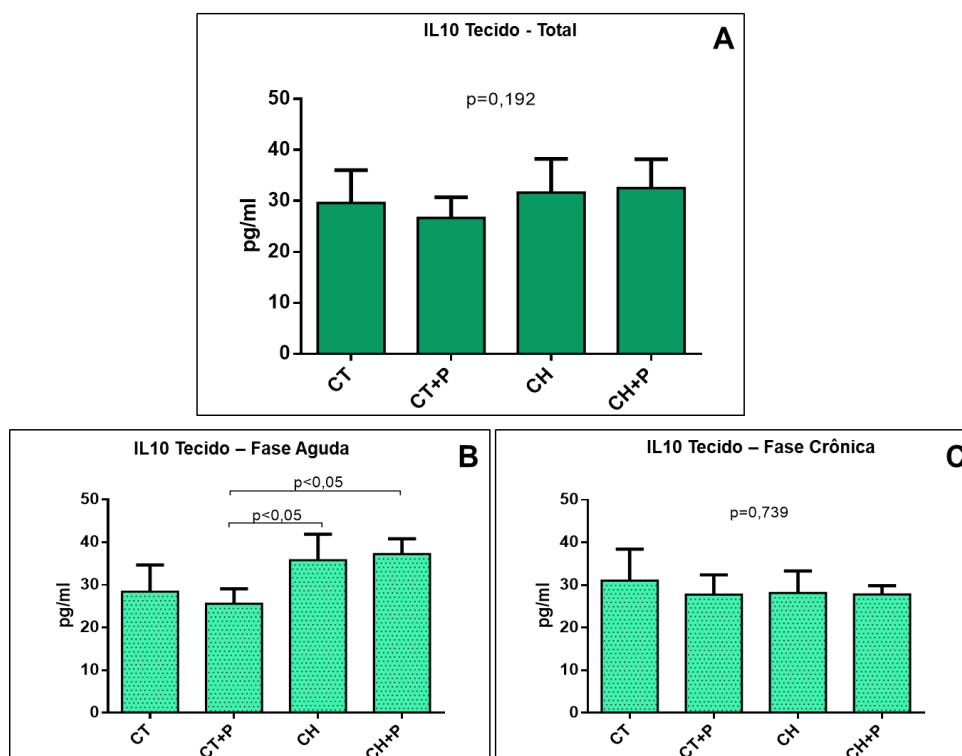


Figura 23 - Expressão proteica de IL10 no tecido cardíaco

A: IL10 casuística completa (total). **B:** IL10 na fase aguda (até 60 dias). **C:** IL10 na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição.

5.4.1.2. IFN- γ

Quando avaliamos a produção proteica de IFN- γ , no tecido cardíaco, observamos na análise da casuística total, níveis semelhantes e sem diferença entre os grupos (figura 24A). Já, na análise da fase aguda da síntese proteica do IFN- γ no tecido cardíaco, observamos aumento significativo nos grupos infectados, quando comparados ao grupo controle exposto à poluição (Ct+P x Ch e Ct+P x Ch+P), mas sem amplificação da poluição na modulação dessa proteína (figura 24B). Na fase crônica, não ocorreu diferença na comparação entre os grupos (figura 24C).

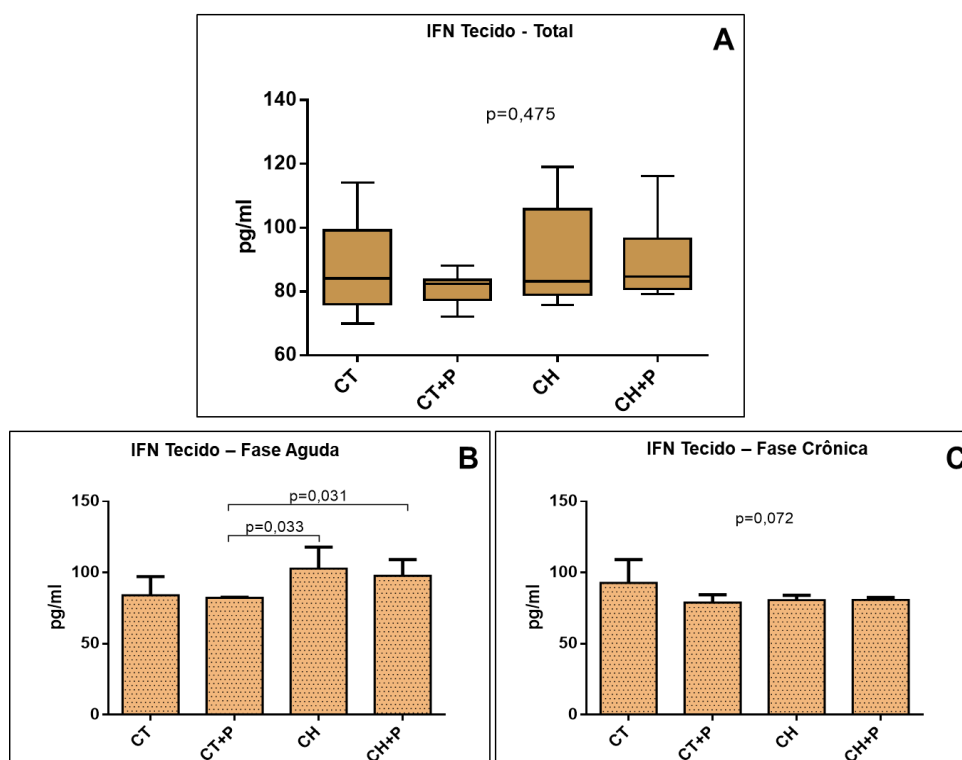


Figura 24 - Expressão proteica de IFN- γ no tecido cardíaco

A: IFN- γ casuística completa (total). **B:** IFN- γ na fase aguda (até 60 dias). **C:** IFN- γ na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.4.1.3. TNF

Ao avaliarmos a expressão proteica de TNF, no tecido cardíaco, não observamos diferença em nenhuma das fases estudadas. A análise da casuística completa demonstra uma regularidade na expressão proteica dessa citocina nos grupos avaliados (figuras 25A). Na fase aguda, observamos um pequeno aumento do número absoluto da expressão proteica de TNF nos grupos chagásicos (figuras 25B). A fase crônica também não apresentou significância estatística na comparação entre os grupos, como ocorreu nas outras fases estudadas (figuras 25C).

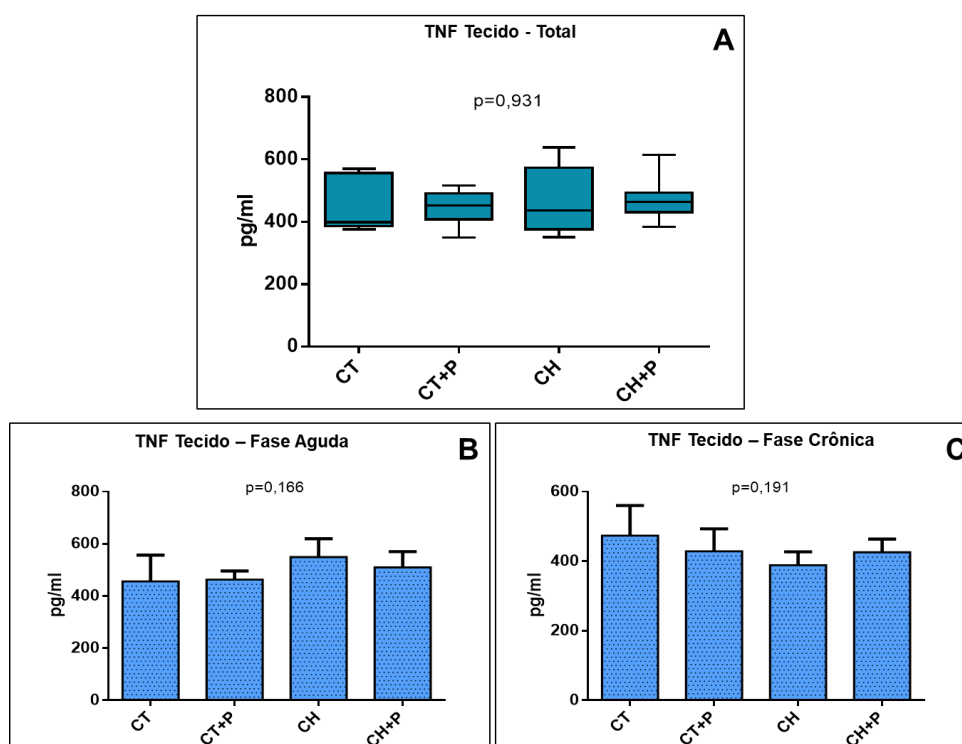


Figura 25 - Expressão proteica de TNF no tecido cardíaco

A: TNF casuística completa (total). **B:** TNF na fase aguda (até 60 dias). **C:** TNF na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.5. Análise da glutatona – espectrofotometria

A análise da glutatona foi avaliada, tanto na forma oxidada (GSSG) como na forma reduzida (GSH) desse tiol. A análise da casuística total nos 10 meses evidenciou maior concentração dos níveis de glutatona total (glutatona oxidada e glutatona reduzida) nos grupos chagásicos, mas sem significância estatística na comparação entre os grupos ($p=0,273$) (figura 26A). Ao analisarmos a fase aguda, notamos o mesmo padrão apresentado na casuística total (figura 26B). A análise da fase crônica mostrou um padrão homogêneo (figura 26C). A poluição não amplificou a síntese de glutatona em nenhuma das fases da doença.

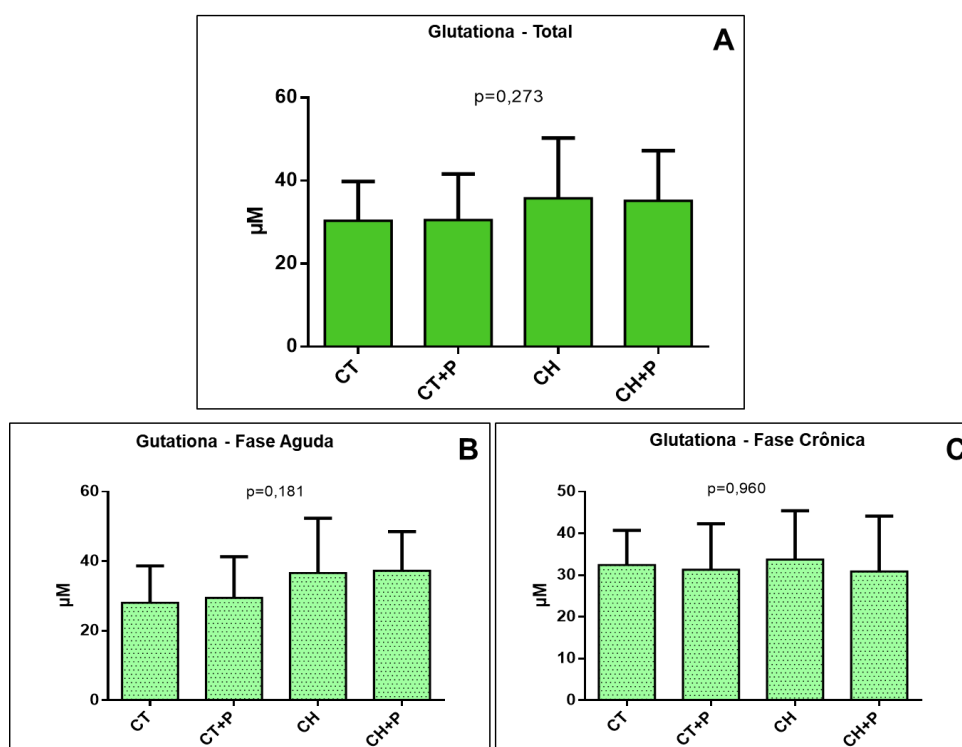


Figura 26 - Concentração da glutatona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH)

A: Glutathione casuística completa (total). **B:** Glutathione na fase aguda (até 60 dias). **C:** Glutathione na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.6. Análise da apoptose – método TUNEL

A avaliação da apoptose contou com análise tecidual em lâmina realizada pela técnica de TUNEL. Nesse método, é possível visualizar maior deposição de células apoptóticas (coradas em marrom) nos grupos chagásicos (C) e chagásico exposto à poluição (D), como demonstra a figura 27.

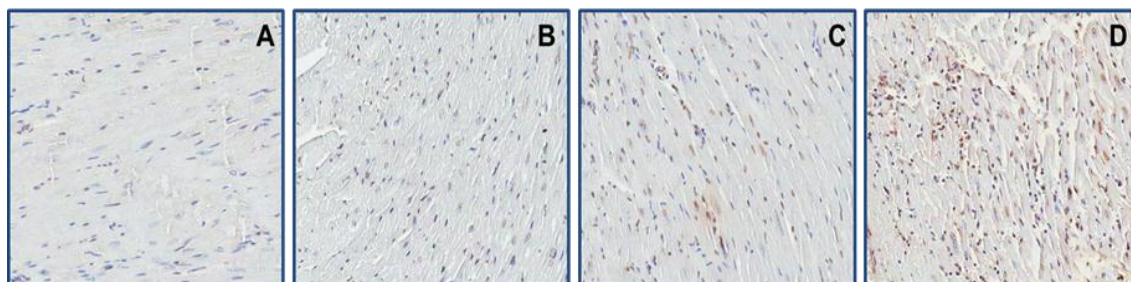


Figura 27 - Fotomicrografia do miocárdio para detecção de fragmentação de DNA pelo TUNEL (células apoptóticas em marrom)

A: miocárdio de um animal controle; **B:** miocárdio de um animal controle exposto à poluição; **C:** miocárdio de um animal infectado; **D:** miocárdio de um animal infectado exposto à poluição

A avaliação da casuística total mostrou maior quantidade de células apoptóticas nos grupos infectados (Ch e Ch+P), especialmente no grupo chagásico exposto à poluição, sendo significativa na comparação com o grupo controle (figura 28A). Nessa fase, a poluição não modulou a apoptose. Ao observarmos a fase aguda, notamos que o grupo chagásico exposto à poluição apresenta 2 vezes mais células apoptóticas que o grupo chagásico, demonstrando uma possível modulação da apoptose pela poluição (figura 28B). Já, na fase crônica, o grupo o chagásico mostrou maior quantidade de morte celular em número absoluto, mas sem significância estatística na comparação entre os grupos (figura 28C).

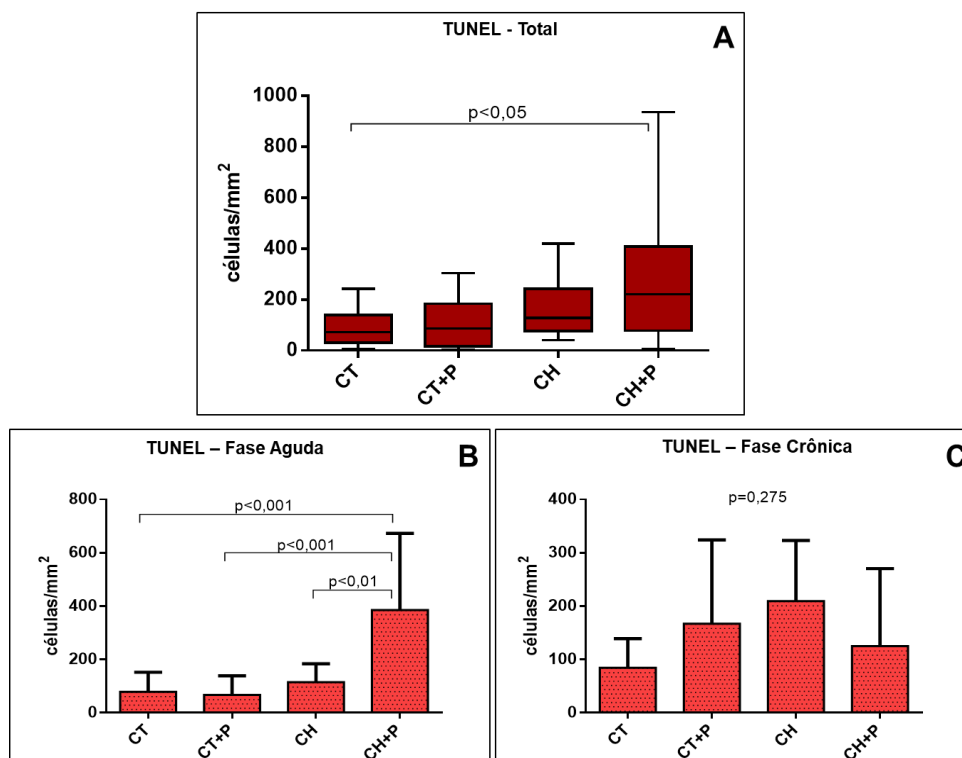


Figura 28 - Apoptose pela técnica de TUNEL

A: Apoptose (TUNEL) casuística completa (total). **B:** Apoptose (TUNEL) na fase aguda (até 60 dias). **C:** Apoptose (TUNEL) na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.7. Análise da peroxidação lipídica – espectrofotometria

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da quantificação do malonaldeído (MDA). A análise da casuística total aos 10 meses de experimento não evidenciou diferenças desse parâmetro na comparação entre os grupos (figura 29A). A análise da fase aguda mostrou uma menor concentração dos níveis de MDA nos grupos chagásicos, novamente, sem diferença estatística na comparação entre os grupos (figura 29B). A mesma forma não significativa foi notada na avaliação da fase crônica, com pequena predominância de malonaldeído nos grupos infectados em valor absoluto (figura 29C).

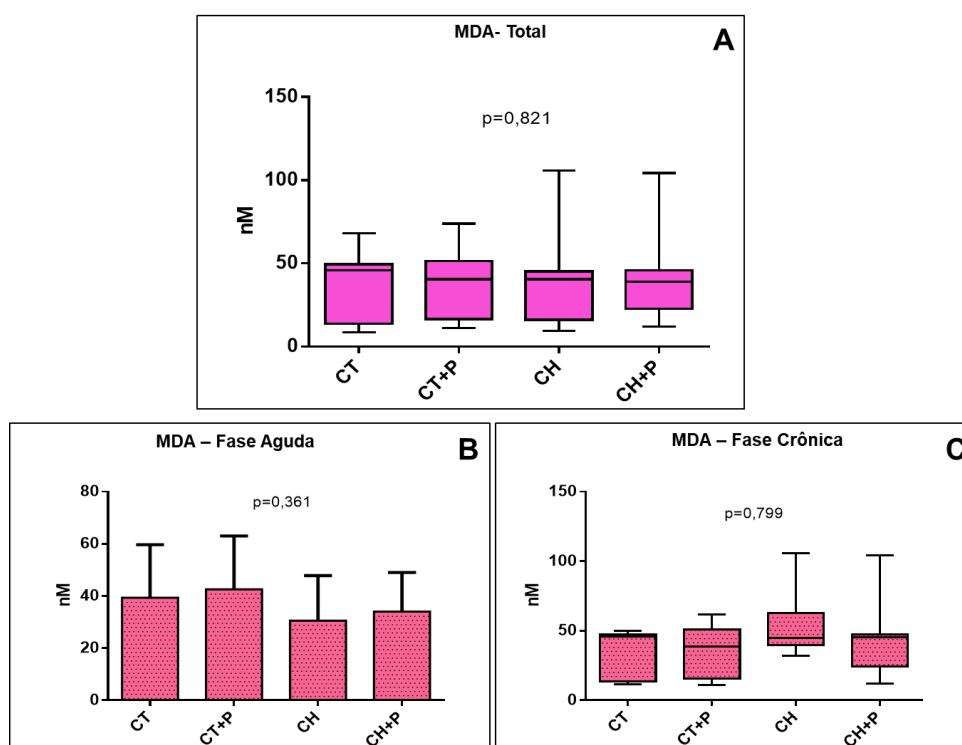


Figura 29 - Peroxidação lipídica (MDA)

A: MDA casuística completa (total). **B:** MDA na fase aguda (até 60 dias). **C:** MDA na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.8. Análise de espécies reativas de oxigênio – ROS (DHE)

Outro protocolo de avaliação do estresse oxidativo é a análise da produção de ROS, via detecção dessa, por microscopia de fluorescência. Nesse método, é possível visualizar o crescente número de células marcadas por DHE, conforme visualizamos a sequência (A até D). A fluorescência indica maior marcação de ROS (coradas em vermelho) nos grupos chagásicos (C) e chagásico exposto à poluição (D), como demonstra a figura 30.

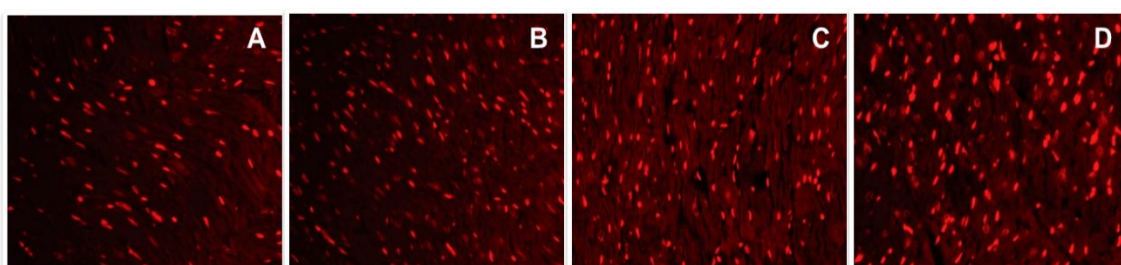


Figura 30 - Fotomicrografia do miocárdio para detecção de ROS

A: miocárdio de um animal controle; **B:** miocárdio de um animal controle exposto à poluição; **C:** miocárdio de um animal infectado; **D:** miocárdio de um animal infectado exposto à poluição

Ao observarmos a casuística total (figura 31A) notamos maior marcação de ROS no tecido cardíaco nos grupos infectados expostos ou não à poluição, sendo considerado significativo, quando comparamos o grupo chagásico exposto à poluição aos controles (Ct x Ch e Ct+P x Ch, $p < 0,01$). A avaliação da fase aguda mostrou o mesmo padrão observado na casuística total, com predomínio de ROS nos grupos infectados (figura 31B). Na fase crônica foi observada maior produção de ROS nos grupos infectados (figura 31C). Apesar de maior valor absoluto no grupo chagásico exposto à poluição, não houve diferença estatística com o grupo chagásico.

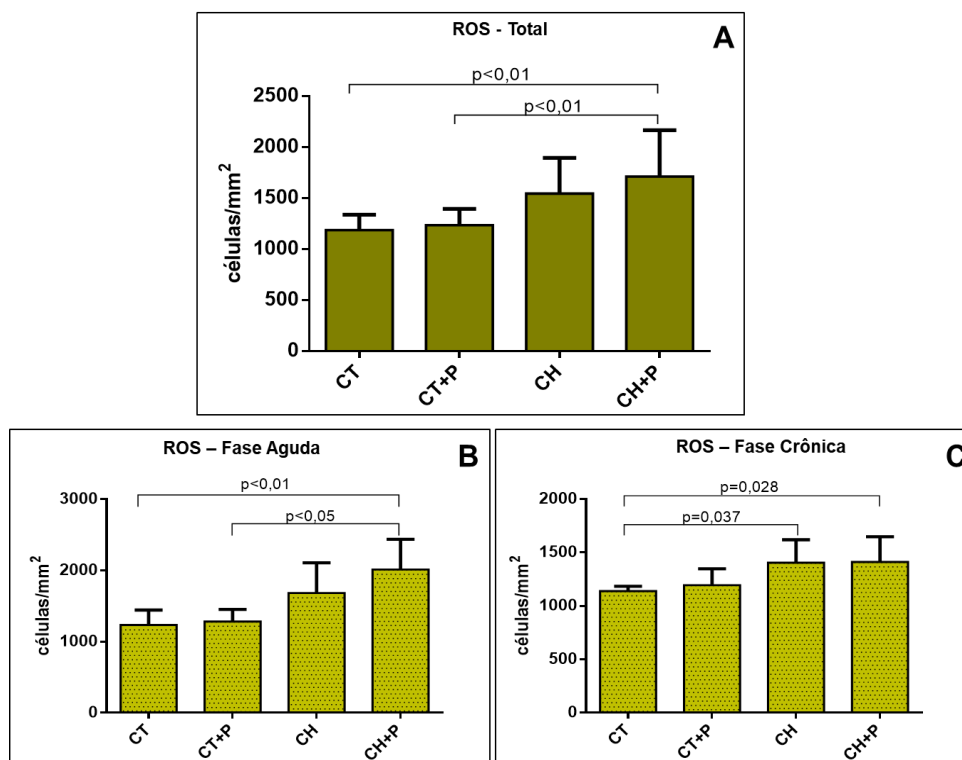


Figura 31 - Espécies reativas de oxigênio (ROS)

A: ROS casuística completa (total). **B:** ROS na fase aguda (até 60 dias). **C:** ROS na fase crônica. Ct – grupo controle, Ct+P – grupo controle exposto à poluição, Ch – grupo chagásico, Ch+P – grupo chagásico exposto à poluição

5.9. Curva de sobrevida

A curva de sobrevida demonstra alta mortalidade - 62% dos animais infectados (Chagas e Chagas expostos à poluição), nos primeiros 38 dias após infecção. Os grupos controles (controle e controle expostos à poluição) apresentaram apenas 4 óbitos, mantendo-se saudáveis até o final do experimento (figura 32). A poluição do ar não alterou a sobrevida dos animais infectados ou não.

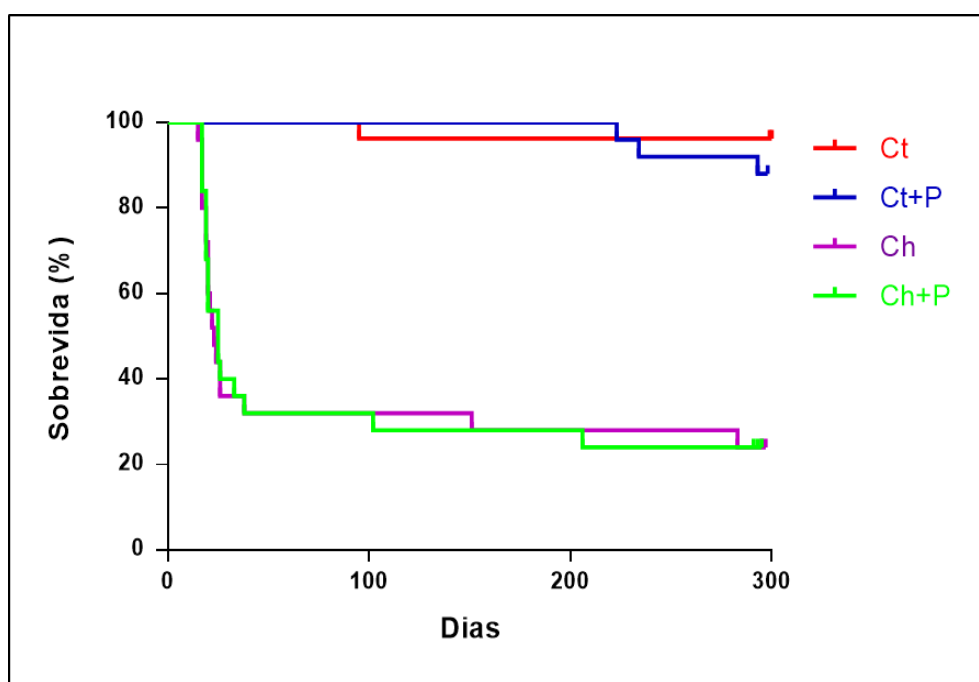


Figura 32 - Curva de sobrevida mostrando mortalidade acentuada nos grupos infectados, até 38 dias pós-infecção

6. DISCUSSÃO

A poluição do ar é tema de crescente interesse na comunidade científica, visto seu potencial em causar doenças. Vários trabalhos têm correlacionado os efeitos da poluição atmosférica, considerando principalmente o MP, e seus efeitos danosos, associados ao aumento de admissões hospitalares por doenças cardíacas e pulmonares⁶⁶⁻⁶⁸. A doença de Chagas também tem sido alvo de crescente número de estudos, apesar de ser uma doença negligenciada, sendo ainda causa frequente de miocardiopatia e morte por doenças cardíacas na América Latina em pacientes entre 30 e 50 anos⁹. Sua prevalência tem aumentado, não só na América Latina, mas também em regiões não endêmicas como América do Norte e Europa.

No presente estudo, visto sabidamente a miocardiopatia da doença de Chagas ter, em seu mecanismo fisiopatológico, a interferência direta da ativação de uma sequência de eventos inflamatórios, associados ao estresse oxidativo e à perda de cardiomiócitos, levando a intensa fibrose miocárdica; e também a evidência de que a poluição do ar estimula esses mesmos mecanismos, a hipótese testada foi de uma amplificação dessas vias, promovendo aumento da fibrose miocárdica. Para tanto, elaboramos um cenário onde animais infectados pelo *T. cruzi* foram expostos à poluição por material particulado (MP_{2,5}), proveniente da queima do diesel^{44,69}.

Até o presente momento, não existem trabalhos científicos avaliando o efeito da poluição atmosférica na doença de Chagas, principalmente tendo como foco o remodelamento cardíaco.

Um dos mecanismos fisiopatológicos que explica a ação da poluição do ar, mais especificamente do MP_{2,5}, causando danos ao coração, está ligado à inalação desse material pelo sistema respiratório, promovendo inflamação local, que é transmitida em cascata para o sistema circulatório, por ativação sequencial, alcançando coração e induzindo a lesões⁴⁰. Um dos mecanismos fisiopatológicos da doença de Chagas também é a ativação do processo inflamatório, estimulado pelo *T. cruzi* e por alterações imunológicas, associado ao estresse oxidativo, promovendo a morte celular e, assim, causando intensa fibrose miocárdica. Em nosso estudo, de fato, observamos um aumento significativo, nos grupos infectados, da expressão gênica das citocinas inflamatórias estudadas (IL10, TNF- α e INF- γ). Avaliamos, também, o perfil

dessa expressão nas fases aguda e crônica da infecção. Em ambas as fases, foi encontrado aumento dessas citocinas nos grupos chagásicos, principalmente na fase aguda, onde a carga parasitária é intensa e o estímulo à inflamação é maior. Nesta fase aguda, é desencadeada imunidade inata pelo parasita, promovendo a produção exacerbada das citocinas inflamatórias, incluindo IL12, TNF- α e IFN- γ , como evidenciado por Cunha-Neto et al.⁷⁰ e Teixeira et al.⁷¹. A alta produção de IL10, evidenciada em nosso trabalho, mostra-se de grande importância na fase aguda para o controle do parasitismo e modulação das citocinas pro-inflamatórias. Holscher et al.⁷² demonstraram a importância de IL10 em estudo com camundongos que não produziam essa citocina (Knockout ou IL10^{-/-}) e infectados com *T. cruzi*. Camundongos homozigotos IL10^{-/-} apresentaram maior letalidade, a partir da terceira semana pós-infecção, enquanto os controles selvagens deficientes dessa citocina (IL10^{+/-}) sobreviveram à infecção aguda. Todos os mutantes homozigotos (IL10^{-/-}) morreram, apesar de apresentarem parasitemia reduzida e aumento da resposta pro-inflamatória (INF- γ , TNF- α e IL12). Isso, possivelmente, ocorreu justamente devido à supressão da inibição das citocinas inflamatórias e inibidoras da parasitemia. Apesar do controle eficiente do parasita, desenvolveram uma síndrome semelhante ao choque endotóxico, devido à exacerbação na produção de TNF- α . Na fase crônica da doença de Chagas, é descrito que a expressão gênica das citocinas inflamatórias está aumentada, sendo encontrados níveis elevados de TNF- α e IFN- γ em pacientes chagásicos, como provável resposta à persistência do parasita ou à resposta imunológica⁷³. Em nosso estudo, apesar de encontrarmos níveis mais elevados dessas citocinas na fase crônica, não houve uma diferença significativa entre os grupos. Possivelmente, isso ocorreu devido a estudarmos esta fase aos 10 meses, sendo este tempo longo na vida do hamster sírio e estando os níveis de citocinas inflamatórias em queda. Outra possível causa seria devido à grande mortalidade do nosso estudo na fase aguda, sendo os animais estudados, na fase crônica, apenas os sobreviventes aos 10 meses, ou seja, mais saudáveis e que, portanto, apresentaram menor agressão da doença. Trabalho anterior, em nosso laboratório, demonstrou o aumento da expressão gênica dessas citocinas estimulada pela poluição. Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ avaliaram o coração de ratos Wistar infartados e expostos

à poluição e observaram maior expressão de IFN- γ nos grupos expostos por mais tempo. No cenário da doença de Chagas, não encontramos uma exacerbação da produção dessas citocinas pela poluição. Chama a atenção que tanto na fase aguda, como na casuística total, onde ocorreu o aumento das citocinas inflamatórias nos grupos chagásicos, a poluição não amplificou essa resposta. Na fase crônica, onde os grupos apresentam expressão homogênea das citocinas e não houve exacerbação das mesmas, também a poluição não promoveu aumento dessa expressão gênica. Essa não amplificação, pela poluição, pode estar relacionada a um estímulo antigênico muito intenso da infecção pelo *T. cruzi* e pela resposta imunológica causada por ele, sendo que a poluição nesse cenário, pouco acrescentou para amplificar essa resposta.

Em relação às análises proteicas das citocinas inflamatórias estudadas em tecido cardíaco, a expressão proteica de IL10 e IFN- γ apresenta-se aumentada nos grupos chagásicos, na fase aguda da doença, quando comparada aos grupos controles. Na fase crônica, e na casuística total, não houve alteração dessa expressão em nenhuma das citocinas analisadas. O TNF- α apresentou aumento de 20% nos grupos chagásicos em relação aos controles, porém sem diferença estatística. Mendonça et al.⁷⁴ estudaram as mesmas citocinas inflamatórias em tecido cardíaco de ratos Wistar e também encontraram aumento significativo de IL10, TNF- α e INF- γ , nos grupos infectados na fase aguda da doença. A maior expressão proteica de IL10 e INF- γ , na fase aguda da doença de Chagas, sugere um estímulo compensatório dessas duas citocinas, uma vez que a IL10 regula a resposta inflamatória que é exacerbada nessa fase. Mesmo com a maior expressão proteica inflamatória nos grupos infectados na fase aguda, a poluição não intensificou a produção das citocinas estudadas. Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ mostraram aumento do infiltrado inflamatório no coração de ratos saudáveis expostos à poluição. Em nosso estudo, a poluição não aumentou os níveis de citocinas no coração dos animais infectados. Mais uma vez, o estímulo à inflamação pelo *T. cruzi* talvez seja tão intenso que a poluição não acrescentou maior ativação.

A interrelação das vias inflamatórias e do estresse oxidativo acontece pela interação de mediadores e sinalizadores. Vários trabalhos mostraram que as citocinas inflamatórias estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio,

e que essas mantêm a resposta inflamatória⁷⁵⁻⁷⁷. O dano celular causado pelas ROS é bem descrito na literatura. Vários autores mostraram o aumento do estresse oxidativo com a exposição à poluição do ar^{78,79}. Outros estudos evidenciaram a mesma resposta no cenário da infecção por *T. cruzi*^{80,81}. Em nosso estudo, avaliamos o papel da NOX1 (formador de superóxido) e da NOX4 (formador de H₂O₂). Ambos parecem ter uma expressão controversa dependendo do tipo de tecido ou célula estudada. Em nossos resultados, observamos uma maior expressão de NOX1 nos grupos chagásicos comparados aos controles, mas sem interferência da poluição, nas três fases estudadas. Resultados semelhantes foram apresentados por Gray et al.⁸² que demonstraram, em outro cenário inflamatório, qual seja, aterosclerose, aumento na expressão de NOX1 descrito em placas de pacientes que tiveram eventos cardiovasculares ou diabetes mellitus, e redução dos níveis de NOX4 nos mesmos pacientes. Tal comportamento da dinâmica do estresse oxidativo na doença de Chagas não foi mostrado, anteriormente, na literatura. Novamente, Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ demonstraram aumento de glutathione nos animais saudáveis expostos à poluição. Em nosso modelo de Chagas, os animais infectados expostos a poluição não tiveram maior ativação do estresse oxidativo nas variáveis estudadas, possivelmente pelo intenso estímulo causado pela infecção por *T. cruzi*.

Ainda em relação ao estresse oxidativo algumas evidências apontam que as enzimas antioxidantes são essenciais reguladoras da inflamação e o superóxido dismutase de manganês (MnSOD) atua nessa via. Wen et al.³⁹, com objetivo de avaliar os efeitos da deficiência de MnSOD sob os danos oxidativos na doença de Chagas crônica, utilizaram camundongos selvagens (normais) e camundongos deficientes de MnSOD (MnSOD^{+/-}) infectados com *T. cruzi* e demonstraram que essa deficiência diminui a expressão miocárdica e a atividade de MnSOD e aumenta, significativamente, a lesão oxidante nas mitocôndrias. Nosso trabalho mostrou maior produção de MnSOD nos grupos chagásicos, tanto na casuística total, como na fase aguda, comparados aos controles. Esse aumento, possivelmente, deu-se em resposta ao aumento das ROS, como observamos em relação a NOX1. Embora a expressão gênica de

MnSOD tenha sido maior nos grupos chagásicos, mais uma vez a poluição não foi capaz de exacerbar essa expressão.

O óxido nítrico (NO), um produto da oxidação de L-arginina em L-citrulina por uma família de enzimas dependentes de NADPH, a óxido nítrico sintase (NOS), desempenha um papel central em vários processos fisiopatológicos. A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e na musculatura lisa vascular. Não é regulada por cálcio e atua em parasitas e células tumorais. A produção de NO pode ser regulada pelas citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e por quimiocinas que regulam positivamente essa produção, enquanto IL10, IL4, IL13 e TGF-beta podem bloquear a produção de NO com consequente inibição da atividade antimicrobiana⁸³. Em nosso estudo, observamos alta expressão de iNOS nos grupos chagásicos comparado aos controles, tanto na casuística total do estudo, como na fase aguda. Na fase crônica, não observamos diferença estatística na comparação entre os grupos. Vasconcelos et al.⁸⁴ avaliaram a administração de dimetilefingosina (DMS - mediador de eventos celulares durante a resposta inflamatória) em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* e, também, demonstraram que houve maior expressão de iNOS no coração de camundongos infectados e tratados com solução salina, em comparação ao grupo não infectado. Entretanto, mais uma vez, essa alta produção de iNOS nos animais infectados não foi agravada pela poluição.

Outro parâmetro para avaliação do estresse oxidativo foi a análise da glutatona total (GSH + GSSG). Ela é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos e que desempenha um papel importante na remoção de muitas espécies reativas. Nossos achados mostram alta produção de GSH + GSSG, em número absoluto, nos grupos chagásicos na casuística total e na fase aguda da doença. Tieghi et al.⁸⁵ também observaram aumento nos níveis de GSH nos eritrócitos de camundongos, na fase aguda da doença de Chagas. Esses resultados demonstram uma resposta do organismo de controlar o estresse oxidativo nessas fases, onde a parasitemia é altamente agressiva. Na fase crônica, não observamos diferenças entre os grupos. Em nenhuma das três fases avaliadas observamos aumento da glutatona em função da exposição à poluição. Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ mostraram

aumento da glutathione nos animais saudáveis expostos à poluição. Em nosso, estudo essa exposição não amplificou essa produção nos animais infectados. Mais uma vez, possivelmente porque o estímulo pela infecção por *T. cruzi* foi extremamente intenso e a poluição não conseguiu acrescentar um maior estímulo.

Dada a importância do estresse oxidativo no mecanismo de lesão celular avaliamos, ainda, o malonaldeído que é o subproduto da peroxidação lipídica mais abundante. Nossos achados mostraram um padrão homogêneo nas amostras em todas as fases estudadas. Esses dados diferem da literatura que mostra um aumento de MDA nos grupos infectados na fase aguda. Novaes et al.⁸⁶ e Mendonça et al.⁷⁴ observaram aumento de MDA na fase aguda da doença de Chagas, utilizando modelo de ratos Wistar e mantendo o treinamento físico como estratégia diferencial no tratamento da doença. Sabidamente, o modelo de ratos Wistar tem críticas, sobretudo porque o modelo oferece uma certa resistência à infecção do *T. cruzi*, sendo necessária uma quantidade maior de inóculo do parasita para obter manifestações clínico-patológicas evidentes⁸⁷. De qualquer forma, era esperado que, quanto maior o dano oxidativo, maior seria a quantidade de MDA presente nos grupos. Sabidamente, a doença de Chagas causa dano oxidativo com liberação excessiva de radicais livres e consequente estresse oxidativo. Nossos resultados de MDA se apresentaram praticamente em consonância com o grupo normal, trazendo um equilíbrio entre os grupos. Vimos anteriormente que o sistema de defesa antioxidante está atuante nesses animais, como mostramos com MnSOD (Mn – cofator de enzima antioxidante e SOD – enzima antioxidante) na análise da expressão gênica e, também, vimos aumento de glutathione total em número absoluto nos grupos chagásicos. É possível que a quantidade de MDA esteja praticamente em equilíbrio devido à ação desse sistema antioxidante. Mais uma vez, a poluição não influenciou a estimulação da produção de MDA na peroxidação lipídica e, por isso, possivelmente não modulou essa via de ativação.

Avaliamos, ainda, as ROS em tecido cardíaco fixado em formol e incubadas com DHE (dihidroetídio). A fluorescência vermelha, produzida pela oxidação do DHE em hidroxietídio e etídio, foi quantificada. Nossos achados mostraram maior produção de ROS nos grupos infectados, confirmando o

estímulo ao estresse oxidativo. Tanto na casuística total, quanto na fase aguda e crônica, obtivemos maior produção de ROS nos grupos chagásicos comparados aos grupos controles. O mesmo resultado pode ser observado no trabalho de Novaes et al.⁸⁶ que, utilizando modelo de rato Wistar na fase aguda da doença de Chagas, observaram aumento de ROS nos animais dos grupos infectados. Em nosso estudo, notamos que o grupo chagásico exposto à poluição apresentou maior produção de ROS, apesar de não mostrar diferença estatística, entre os grupos infectados. Provavelmente, o dano oxidativo causado pela doença de Chagas nas fases estudadas seja tão intenso que, apesar da poluição ter aumentado a produção de ROS no grupo chagásico, não foi determinante para amplificar, de forma significativa, essa via. Os dados do estresse oxidativo, provenientes da avaliação da expressão gênica, da produção de antioxidantes e da produção de ROS mostram aumento dessa agressão nos grupos chagásicos, podendo proporcionar maior perda de cardiomiócitos por apoptose. Na avaliação global do estresse oxidativo, seja a expressão gênica ou mediadores finais, a poluição não amplificou a resposta entre os animais infectados.

A apoptose foi melhor definida, em 1970, como um processo de morte celular programada que ocorre durante o crescimento embrionário dos metazoários (animais pluricelulares vertebrados ou invertebrados), sendo fundamental para a manutenção dos processos biológicos⁸⁸. Em condições normais, a apoptose ocorre como forma de manter o organismo em perfeitas condições (homeostase), removendo células não funcionais ou danificadas dos tecidos, de maneira precoce, evitando a resposta inflamatória. Já, no cenário patológico, a apoptose apresenta um papel crucial de defesa, compondo um mecanismo para controlar a disseminação do patógeno. Quando falamos da apoptose na doença de Chagas, evidenciamos que esse processo pode ocorrer desencadeado por antígenos, fatores secretados e/ou liberados por patógenos, infecção crônica e intensa ativação celular⁸⁹. Da mesma forma, quando analisamos a apoptose em animais expostos à poluição do ar, por diesel, notamos que ela é descrita em vários órgãos e tecidos como rins, artérias e pulmão⁹⁰⁻⁹². Para analisar a apoptose nesse estudo, um dos métodos utilizados foi avaliação da expressão gênica dos genes BCL2 que é uma proteína

mitocondrial que funciona para inibir a apoptose em células de mamíferos e, assim, prolongar a sobrevivência celular⁹³, e CASP3 que é uma protease classicamente descrita como executora de apoptose⁹⁴. Além da expressão gênica, utilizamos a técnica de TUNEL para marcação de fragmentação de DNA proveniente da cascata apoptótica. Nossos resultados, referentes à expressão de BCL2 (anti-apoptótico), mostraram aumento dessa expressão nos grupos chagásicos em comparação aos controles, tanto na casuística total, como na fase aguda do experimento. Em ambos os casos, a poluição não intensificou a expressão desse gene, muito embora o p entre os grupos chagásicos tenha sido limítrofe (casuística total $p=0,06$ e fase aguda $p=0,05$), sugerindo que, como na produção de ROS que foi maior no grupo infectado exposto à poluição, mas sem significância estatística, o estímulo à apoptose pela poluição nos grupos infectados parece estar presente. Essa possibilidade é reforçada, quando avaliamos a fase aguda pelo método de TUNEL. O mesmo padrão gráfico podemos observar na análise da expressão gênica da CASP3 (pró-apoptótico), com maior expressão nos grupos chagásicos em comparação aos controles, tanto na casuística total do estudo como na fase aguda, sem intensificação pela poluição. O trabalho de Seriani et al.⁹⁵ apresentou uma expressão inversamente proporcional desses 2 genes, onde houve predominância da expressão da CASP3 em comparação a BCL2. Eles utilizaram células de epitélio brônquico exposto à poluição do diesel e notaram que os fatores apoptóticos são sobrepostos ao não apoptótico. Parece que existe uma competição entre fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos, atuando intensamente sobre esses animais estudados, com ligeira predominância dos fatores antiapoptóticos, muito provavelmente, induzidos pelas citocinas inflamatórias. Na fase crônica, ambos os genes não promoveram diferença significativa na expressão dos grupos estudados.

A técnica do TUNEL também sugere um processo apoptótico na fase aguda da doença, quando observamos maior quantidade de células apoptóticas no grupo chagásico exposto à poluição, em comparação aos outros grupos. Com essa técnica pudemos observar a influência da poluição na apoptose das células cardíacas. Carbajosa et al.⁹⁶, utilizando fatias de timo de camundongos infectados com *T. cruzi*, em diferentes dias pós-infecção, observaram aumento

significativo de timócitos apoptóticos, aos 21 dias pós-infecção, ou seja, alta apoptose na fase aguda.

Se considerarmos o aumento da produção de ROS como fator estimulante da apoptose, podemos especular que existe coerência nos resultados, onde observamos o aumento de marcadores de estresse oxidativo como NOX1 e iNOS, assim como de fatores antioxidantes como a glutathione, MnSOD, associados ao aumento de marcadores da apoptose como CASP3 e TUNEL, apesar da não haver diferença estatística. Lembramos que quando utilizamos a análise estatística, o quanto valorizamos o valor de p deve ser considerado, visto sabermos que outras variáveis matemáticas estão implicadas na análise. Nos achados da pesquisa, há muito mais significados do que aquele resumido em um valor de p e sua significância estatística. $P < 0,06$ significa que temos apenas 6% dos resultados ao acaso e, portanto, 94% são verdadeiros. A somatória dessas alterações poderia levar à perda de mais cardiomiócitos com eventual aumento de fibrose e perda de função ventricular.

Fibrose é a formação de tecido conjuntivo de reposição em resposta a uma agressão, ou por estímulo à deposição excessiva de colágeno no coração. Os mecanismos envolvidos que podem promover a fibrose miocárdica figuram como base deste estudo e formam nossa hipótese. As vias de inflamação, estresse oxidativo e apoptose são possíveis candidatas que promovem deposição exacerbada do colágeno no miocárdio, levando ao remodelamento estrutural e agindo como mecanismo de disfunção cardíaca⁹⁷. A exposição ao material particulado ativa as mesmas vias e, além de causar remodelamento ventricular e piora da fibrose cardíaca⁹⁸, causa também perda da capacidade de contratilidade do coração. Em nosso estudo, analisando o colágeno intersticial, observamos deposição acentuada de colágeno nos grupos chagásicos em comparação aos controles, tanto no ventrículo direito, como no esquerdo em todas as fases estudadas. Mais uma vez, a poluição não aumentou essa deposição de fibrose. Observamos aumento da fibrose comparando os grupos Ct e Ct+P no VE. Esse achado sugere que, de fato, a poluição estimula o acúmulo de colágeno no miocárdio. Wold et al.⁹⁸, utilizando camundongos expostos a poluição (MP_{2,5}), mostraram o impacto da deposição de colágeno no coração, onde observaram aumento de 166% de deposição de colágeno em

camundongos expostos ao $MP_{2,5}$, comparado a camundongos submetidos à inalação de ar filtrado. Nossos resultados mostraram que há interferência da poluição entre os grupos controles, mas não observamos os mesmos resultados comparando os grupos chagásicos entre si. Apesar de o grupo chagásico exposto à poluição apresentar maior deposição de colágeno, tanto no VE quanto no VD, a poluição não modulou esse aumento. A deposição de colágeno, e consequente remodelamento por fibrose, podem impactar na geometria do coração e na perda de função do mesmo.

A análise ecocardiográfica fornece dados sobre geometria, estrutura e função cardíaca. Nossos resultados da geometria mostraram uma dilatação do VE (DDVE e DSVE) em ambos os grupos chagásicos, na fase aguda da doença. Na fase crônica não observamos essa dilatação, possivelmente relacionada ao fato de que aos 10 meses os animais sobreviventes eram os mais saudáveis. Em ambas as fases, a poluição não aumentou a dilatação entre os grupos infectados. Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ compararam a geometria do VE entre grupos de animais infartados e expostos à poluição e também não observaram dilatação pela poluição entre os grupos.

Com relação aos parâmetros de função sistólica (FE e ΔD), observamos uma diminuição dessa função nos grupos chagásicos (Ch e Ch+P), durante a fase aguda, como era esperado. Embora tenhamos mostrado uma significativa diminuição dessa função, na fase aguda, entre os grupos chagásicos e os grupos controles, a poluição não interferiu na perda da função ventricular. Na fase crônica, a perda de função não apresenta significância estatística na comparação entre os grupos. Mais uma vez, possivelmente pela alta mortalidade na fase aguda, sendo os animais sobreviventes aos 10 meses os mais saudáveis. Oliveira-Fonoff et al.⁴⁸ também avaliaram a fração de encurtamento e observou que os animais infartados apresentaram diminuição de ΔD , mas sem interferência da poluição na disfunção ventricular.

Já, a análise dos parâmetros de função diastólica (relação E/A e TD) apresentaram aumento dessas variáveis no grupos chagásicos e mais ainda, nos expostos à poluição na fase aguda, sugerindo que, apesar da não alteração na histologia do miocárdio, o envelhecimento dos animais e a manutenção da exposição à poluição, promovendo aumento da apoptose, além de alterações

moleculares, pode ter promovido a alteração da função diastólica. Ainda, a análise do TRIV também demonstrou o aumento no grupo Ch+P em comparação aos outros grupos, incluindo grupo Ch, a partir do que podemos sugerir que a poluição estaria modulando essa variável. Wallace et al.⁹⁹ estudaram o efeito do carvedilol no remodelamento miocárdico na miocardiopatia chagásica e não conseguiram demonstrar diferenças na comparação entre os grupos (grupo controle, grupo infectado e grupo infectado tratado com carvedilol), usando como medida o TRIV isoladamente.

Esses dados de geometria e função parecem estar coerentes com o estímulo da inflamação, estresse oxidativo, apoptose e fibrose, pois observamos aumento desses parâmetros na fase aguda da doença, levando à dilatação e à perda de função do coração sem modulação pela poluição.

Observamos maior estímulo inflamatório, de estresse oxidativo e de apoptose nos grupos infectados. Essas vias, possivelmente, formaram a complexa cascata de eventos que promoveram a maior deposição de colágeno nos ventrículos desses animais. Esse remodelamento estrutural resultou na dilatação ventricular na fase aguda e perda da função sistólica do VE. Entretanto, apesar do estímulo da poluição nessas mesmas vias de sinalização, a poluição não amplificou a resposta inflamatória, nem o estresse oxidativo nos animais infectados e, portanto, não piorou o remodelamento geométrico e funcional do coração.

A alta mortalidade ocasionada na fase aguda foi determinante na avaliação da fase crônica, sendo essa uma das grandes limitações de nosso estudo. A inoculação dos hamsters dos grupos infectados gerou uma mortalidade inicial de 62%, até o primeiro mês pós-infecção. A mortalidade no final do experimento foi de 76% dos animais infectados. Embora a mortalidade tenha sido alta nos grupos infectados, não observamos aumento ocasionado pela exposição à poluição. Wallace et al.⁹⁹ também mostraram alta mortalidade dos animais infectados nos primeiros 30 dias pós-infecção, chegando a aproximadamente 50%.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os animais infectados apresentaram maior deposição de colágeno no VE e no VD, entretanto, a poluição não aumentou a fibrose miocárdica nos animais chagásicos.
- ✓ Esse aumento da fibrose miocárdica refletiu em piora do remodelamento geométrico, com aumento dos diâmetros sistólico e diastólico no VE, principalmente na fase aguda
- ✓ Tal remodelamento estrutural e geométrico levou à piora do remodelamento funcional, com queda na função sistólica ventricular esquerda, também na fase aguda. Em nenhuma das situações, a poluição promoveu piora no remodelamento geométrico ou funcional do coração.
- ✓ Tal remodelamento (estrutural, geométrico e funcional) foi coincidente com a piora do perfil inflamatório e do estresse oxidativo desencadeado pela doença de Chagas. Entretanto, não houve exacerbação pela poluição nessas vias estudadas.
- ✓ Apenas a via da apoptose apresentou uma tendência a ser modulada pela poluição, tanto na expressão gênica de BCL2, como na técnica de TUNEL. Podemos sugerir que a poluição ativa essa via, entretanto, não foi capaz de aumentar a fibrose miocárdica.
- ✓ A mortalidade foi elevada na fase aguda e não mostrou ser exacerbada pela poluição.

8. REFERÊNCIAS

1. Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159-218.
2. Pittella JEH. O banco de dados do Prêmio Nobel como indicador de internacionalização da ciência brasileira entre 1901 e 1966. Hist. cienc. saude-Manguinhos [online]. 2018;25(2):569-90.
3. Salgado JA, Garcez PN, Oliveira CA, Galizzi J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. 1962;4(5): 330-7.
4. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhi F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9.000-years record of Chagas' disease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2004;101(7):2034-9.
5. Souza DSM, Povoá RMS. Aspectos epidemiológicos e clínicos da doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina. Rev. Soc. Cardiol Estado de São Paulo 2016;26(4):222-9.
6. WHO.2019 https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ [(Accessed July 03, 2019)].
7. Sangenito LS, da Silva Santos V, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Douza dos Santos AL, de Oliveira SSC. Leishmaniasis and Chagas Disease - Neglected Tropical Diseases: Treatment Updates. Curr Top Med Chem. 2019;19(3):174-177.
8. Dias JCP, Ramos Jr AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, Torres RM, Melo JRC, Almeida EA, Oliveira Jr W, Silveira AC, Rezende JM, Pinto FS, Ferreira AW, Rassi A, Filho AAF, Sousa AS, Filho DC, Jansen AM, Andrade GMQ, Britto CFFC, Pinto AYN, Rassi Jr A, Campos DE, Abad-Franch F, Santos SE, Chiari E, Hasslocher-Moreno AM, Moreira EF, Marques DSO, Silva EL, Marin-Neto JÁ, Galvão LMC, Xavier SS, Valente SAS, Carvalho NB, Cardoso AV, Silva RA, Costa VM, Vivaldini SM, Oliveira SM, Valente VC, Lima MM, Alves RV. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 25:7-86, 2016.
9. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. Clin Microbiol Infect. 2017;23(5):290-5.
10. Labello Barbosa R, Dias VL, Lorosa ES, de Góes Costa E, Pereira KS, Gilioli R, Guaraldo AMA, Passos LAC. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açai pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. Exp Parasitol. 2019;197:68-75.

11. Santos VRCD, Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira JRDS, Coura JR, Junqueira ACV. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):e170298.
12. Ministério da Saúde (BR). Acessado em 29 de Julho de 2019 <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/26/CASOS-AGUDOS-CONFIRMADOS-NO-SINAN-POR-UF-DE-RESID--NCIA--2008-A-2017-.pdf>
13. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol*. 2015;46(21):1-9.
14. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med*. 2017;43:6-15.
15. Benck L, Kransdorf E, Patel J. Diagnosis and Management of Chagas Cardiomyopathy in the United States. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(12):131.
16. Hotez PJ. The rise of neglected tropical diseases in the "new Texas". *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(1):e0005581.
17. Manne-Goehler J, Umeh CA, Montgomery SP, Wirtz VJ. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(11):e0005033.
18. Clemente WT, Pierroti LC, Abdala E, Morris MI, Azevedo LS, López-Vélez R, Cuenca-Estrella M, Torre-Cisneros J, Petersen E, Camargo LFA, Wright AJ, Beeching NJ, Vilela EG, Santoro-Lopes G, Len O, Stucchi RSB, Manuel O, Faria LC, Leblebicioglu H, Huprikar S, Molina I, Mourão PHO, Kotton CN, Aguado JM; working group on Endemic Disease and Travel Medicine in Solid-Organ Transplantation. Recommendations for Management of Endemic Diseases and Travel Medicine in Solid-Organ Transplant Recipients and Donors: Latin America. *Transplantation*. 2018;102(2):193-208.
19. Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol*. 2014;103(1):1-10.
20. <https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>. Acessado em Julho de 2019
21. Organização Mundial de Saúde. Research priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Genebra, Suíça: OMS; 2012.
22. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82-94.

23. Barreto AC, Ianni BM. The undetermined form of Chagas' heart disease: concept and forensic implications. *São Paulo Med J.* 1995;113:797-801.
24. Simões MV, Romano MMD, Schmidt A, Martins KSM, Marin-Neto JA. Cardiomiopatia da doença de Chagas. *Int J of Cardiovasc Sci.* 2018;31(2):173-89.
25. Barretto AC, Higuchi ML, da Luz PL, Lopes EA, Bellotti G, Mady C, Stolf N, Arteaga-Fernández E, Pileggi F. Comparison of histologic changes in Chagas' cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 1989;52(2):79-83.
26. Shirey EK, Proudfit WL, Hawk WA. Primary myocardial disease. Correlation with clinical findings, angiographic and biopsy diagnosis. Follow-up of 139 patients. *Am Heart J.* 1980;99(2):198-207.
27. Nunes VL, Ramires FJA, Pimentel WS, Fernandes F, Ianni BM, Mady C. O Papel do acúmulo de colágeno no interstício miocárdico na sobrevida dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática e chagásica. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87:757-62.
28. Brazão V, Colato RP, Santello FH, Filipin Mdel V, Toldo MP, do Vale GT, Tirapelli CR, do Prado Júnior JC. Interleukin-17, oxidative stress, and inflammation: role of melatonin during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Pineal Res.* 2015;59(4):488-96.
29. Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev.* 2012;20(2):53-65.
30. Machado FS, Tanowitz HB, Ribeiro AL. Pathogenesis of Chagas Cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. *J Am Heart Assoc.* 2013;23;2(5):e000539.
31. Ianni BM. Efeito da sinvastatina no remodelamento estrutural miocárdico em modelo animal de miocardiopatia chagásica [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
32. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, Faé KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007;9(9):1104-13.
33. Medeiros NI, Gomes JAS, Correa-Oliveira R. Synergic and antagonistic relationship between MMP-2 and MMP-9 with fibrosis and inflammation in Chagas' cardiomyopathy. *Parasite Immunol.* 2017;39(8).

34. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1116-24.
35. Oliveira TB, Pedrosa RC, Filho DW. Oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007;116(3):357-63.
36. Gupta S, Wen JJ, Garg NJ. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:190354.
37. Chowdhury IH1, Koo SJ, Gupta S, Liang LY, Bahar B, Silla L, Nuñez-Burgos J, Barrientos N, Zago MP, Garg NJ. Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. *J Innate Immun.* 2017;9(2):203-216.
38. Zhang YH. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. *F1000Res.* 2017;6:742.
39. Wen JJ, Garg NJ. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates the mitochondrial ROS production and oxidative damage in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(7):e0006687.
40. <https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>. Acessado em 24 de Julho de 2019
41. Franklin BA, Brook R, Arden Pope C 3rd. Air pollution and cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol.* 2015;40(5):207-38.
42. <https://infraestrutura.gov.br/component/content/article/115-portal-denatran/8559-frota-de-veiculos-2019.html>. Acessado em 24 Julho de 2019.
43. <https://cetesb.sp.gov.br/ar/poluentes/> Acessado em 24 de Julho de 2019
44. de Brito JM, Mauad T, Cavalheiro GF, Yoshizaki K, de André PA, Lichtenfels AJFC, Guimarães ET, Rivero DHRF, Antonangelo L, Oliveira LB, Pedroso LRM, Macchione M, Saldiva PHN. Acute exposure to diesel and sewage biodiesel exhaust causes pulmonary and systemic inflammation in mice. *SCI Total Environ.* 2018;628-629:1223-33.
45. Gorr MW, Falvo MJ, Wold LE. Air Pollution and Other Environmental Modulators of Cardiac Function. *Compr Physiol.* 2017;7(4):1479-95.
46. Mishra S. Is smog innocuous? Air pollution and cardiovascular disease. *Indian Heart J.* 2017;69(4):425-9.

47. Hadley MB, Baumgartner J, Vedanthan R. Developing a Clinical Approach to Air Pollution and Cardiovascular Health. *Circulation*. 2018;137(7):725-42.
48. de Oliveira-Fonoff AM, Mady C, Pessoa FG, Fonseca KCB, Salemi VMC1, Fernandes F, Saldiva PHN, Ramires FJA. The role of air pollution in myocardial remodeling. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176084.
49. Chin MT. Basic mechanisms for adverse cardiovascular events associated with air pollution. *Heart*. 2015;101(4):253-6.
50. Liu Y, Goodson JM, Zhang B, Chin MT. Air pollution and adverse cardiac remodeling: clinical effects and basic mechanisms. *Front Physiol*. 2015;6:162.
51. Pessoa FG, Mady C, Fonseca KCB, de Oliveira-Fonoff AM, Salemi VMC, Jordão MR, Fernandes F, Ramires FJA. Erythropoietin reduces collagen deposition after myocardial infarction but does not improve cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(6):541-9.
52. Cattani-Cavaliere I, Valenca SS, Lanzetti M, Carvalho GMC, Zin WA, Monte-Alto-Costa A, Porto LC, Romana-Souza B. Acute Exposure to Diesel-Biodiesel Particulate Matter Promotes Murine Lung Oxidative Stress by Nrf2/HO-1 and Inflammation Through the NF- κ B/TNF- α Pathways. *Inflammation*. 2019;42(2):526-37.
53. Fiordelisi A, Piscitelli P, Trimarco B, Coscioni E, Iaccarino G, Sorriento D. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev*. 2017;22(3):337-47.
54. Hamanaka RB, Mutlu GM. Particulate Matter Air Pollution: Effects on the Cardiovascular System. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:680.
55. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loidas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):3886-907.
56. Moller P, Danielsen PH, Karotki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, Jensen DM, Christophersen DV, Hemmingsen JG, Cao Y, Loft S. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;762:133-66.
57. Zhang J, Liu J, Ren L, Wei J, Duan J, Zhang L, Zhou X, Sun Z. PM_{2.5} induces male reproductive toxicity via mitochondrial dysfunction, DNA damage and RIPK1 mediated apoptotic signaling pathway. *Sci Total Environ*. 2018;634:1435-44.

58. Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos. 2016. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. Disponível em http://www.cena.usp.br/ceua/dbca_2_fev_2016.pdf
59. National Research Council. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals [online]. 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C. Available from <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
60. Brito JM, Belotti L, Toledo AC, Antonangelo L, Silva FS, Alvim DS, Andre PA, Saldiva PH, Rivero DH. Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles. *Toxicol Sci.* 2010;116(1):67-78.
61. Fernandes F, Ramires FJ, Ianni BM, Salemi VM, Oliveira AM, Pessoa FG, Canzian M, Mady C. Effect of colchicine on myocardial injury induced by *Trypanosoma cruzi* in experimental Chagas' disease. *J Card Fail.* 2012;18(8):654-9.
62. Armstrong WF, Ryan T. Feigenbaum's Echocardiography. Seventh Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
63. Salemi VM, Bilate AM, Ramires FJ, Picard MH, Gregio DM, Kalil J, Neto EC, Mady C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamster. *Eur J Echocardiogr.* 2005;6(1)41-6.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
65. Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric statistics for the behavioral science. New York, NY: McGraw-Hill, 2nd ed.1988.
66. Davoodabadi Z, Soleimani A, Pourmoghaddas A, Hosseini SM, Jafari-Koshki T, Rahimi M, Shishehforoush M, Lahijanzadeh A, Sadeghian B, Moazam E, Mohebi MB, Ezatian V, Rabiei K, Sarrafzadegan N. Correlation between air pollution and hospitalization due to myocardial infarction. *ARYA Atheroscler.* 2019;15(4):161-7.
67. Wei Y, Wang Y1, Di Q, Choirat C, Wang Y, Koutrakis P, Zanobetti A, Dominici F, Schwartz JD. Short term exposure to fine particulate matter and hospital admission risks and costs in the Medicare population: time stratified, case crossover study. *BMJ.* 2019;367:l6258.
68. Chen C, Liu X, Wang X, Li W, Qu W, Dong L, Li X, Rui Z, Yang X. Risk of temperature, humidity and concentrations of air pollutants on the hospitalization of AECOPD. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225307.

69. Yoshizaki K, Brito JM, Silva LF, Lino-Dos-Santos-Franco A, Frias DP, E Silva RCR, Amato-Lourenço LF, Saldiva PHN, de Fátima Lopes Calvo Tibério I, Mauad T, Macchione M. The effects of particulate matter on inflammation of respiratory system: Differences between male and female. *Sci Total Environ.* 2017;586:284-295.
70. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, Bacal F, Carrara D, Ianni B, Mady C, Kalil J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(1):133-7.
71. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002;18(6):262-5.
72. Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68(7):4075-4083.
73. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 2005;167(2):305-13.
74. Mendonça AAS, Gonçalves RV, Souza-Silva TG, et al. Concomitant exercise training attenuates the cardioprotective effects of pharmacological therapy in a murine model of acute infectious myocarditis. *Life Sci.* 2019;230:141-9.
75. Monkkonen T, Debnath J. Inflammatory signaling cascades and autophagy in cancer. *Autophagy.* 2018;14(2):190-8.
76. Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology.* 2019;224(2):242-53.
77. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol.* 2016;26(4):249-61.
78. Kim KE, Cho D, Park HJ. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci.* 2016;152:126-34.
79. Bourdrel T, Bind MA, Béjot Y, Morel O, Argacha JF. Cardiovascular effects of air pollution. *Arch Cardiovasc Dis.* 2017;110(11):634-42.
80. Paiva CN, Medei E, Bozza MT. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* 2018;14(4):e1006928.

81. Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DSS, Mendonça AAS, Marques-da-Silva EA, Cardoso SA, Fietto JLR, Oliveira LL. Purinergic Antagonist Suramin Aggravates Myocarditis and Increases Mortality by Enhancing Parasitism, Inflammation, and Reactive Tissue Damage in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:7385639.
82. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, Calkin AC, Biessen EA, Touyz RM, Cooper ME, Schmidt HH, Jandeleit-Dahm KA. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(2):295-307.
83. Laucella SA, Rottenberg ME, de Titto EH. Papel de las citoquinas en la resistencia y patología durante la infección con *Trypanosoma cruzi* [Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection]. *Rev Argent Microbiol*. 1996;28(2):99-109.
84. Vasconcelos JF, Meira CS, Silva DN, Nonaka CKV, Daltro PS, Macambira SG, Domizi PD, Borges VM, Ribeiro-Dos-Santos R, de Freitas Souza BS, Soares MBP. Therapeutic effects of sphingosine kinase inhibitor N,N-dimethylsphingosine (DMS) in experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):6171.
85. Tieghi TM, Manca CC, Garcia LCT, Castanho REP, Therezo ALS, Frei F, Taipeiro EF, Martins LPA. Evaluation of antioxidant therapy in experimental Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(2):184-93.
86. Novaes RD, Gonçalves RV, Penitente AR, Cupertino MC, Maldonado IRSC, Talvani A, Natali AJ. Parasite control and skeletal myositis in *Trypanosoma cruzi*-infected and exercised rats. *Acta Trop*. 2017;170:8-15.
87. Jorge TCA, Castro SL (org.). *Doença de Chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from: <http://books.scielo.org/id/cdbjg/pdf/araujo-9788575413937-09.pdf>.
88. Menna-Barreto RFS. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):93.
89. Decote-Ricardo D, Nunes MP, Morrot A, Freire-de-Lima CG. Implication of Apoptosis for the Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front Immunol*. 2017;8:518.
90. Hsu YH, Chuang HC, Lee YH, Lin YF, Chen YJ, Hsiao TC, Wu MY, Chiu HW. Traffic-related particulate matter exposure induces nephrotoxicity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2019;135:235-44.

91. Liu J, Ye X, Ji D, Zhou X, Qiu C, Liu W, Yu L. Diesel exhaust inhalation exposure induces pulmonary arterial hypertension in mice. *Environ Pollut*. 2018;237:747-55.
92. Moreira AR, Pereira de Castro TB, Kohler JB, Ito JT, de França Silva LE, Lourenço JD, Almeida RR, Santana FR, Brito JM, Rivero DHRF, Vale MICA, Prado CM, Câmara NOS, Saldiva PHN, Olivo CR, Lopes FDTQDS. Chronic exposure to diesel particles worsened emphysema and increased M2-like phenotype macrophages in a PPE-induced model. *PLoS One*. 2020;15(1):e0228393.
93. Adams JM, Cory S. The BCL2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-6.
94. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380-9.
95. Seriani R, de Souza CE, Krempel PG, Frias DP, Matsuda M, Correia AT, Ferreira MZ, Alencar AM, Negri EM, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(10):9862-70.
96. Carbajosa S, Gea S, Chillón-Marinas C, Poveda C, Del Carmen Maza M, Fresno M, Gironès N. Altered bone marrow lymphopoiesis and interleukin-6-dependent inhibition of thymocyte differentiation contribute to thymic atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection. *Oncotarget*. 2017;8(11):17551-61.
97. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(1):62-9.
98. Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, Youtz DJ, Wang A, Lucchesi PA, Sun Q, Rajagopalan S. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. *Circ Heart Fail*. 2012;5(4):452-61.
99. Pimentel W de S, Ramires FJ, Ianni BM, Salemi VMC, Bilate AMB, Cunha-Neto E, Oliveira AM, Fernandes F, Mady C. The effect of beta-blockade on myocardial remodeling in Chagas' cardiomyopathy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(9):1063-9.