



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RITO SANTO PEREIRA

**TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL EM COMBINAÇÃO COM
ASPIRINA DURANTE A FASE AGUDA DA DOENÇA DE
CHAGAS EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E LESÕES CARDÍACAS
TÍPICAS NA FASE CRÔNICA**

Londrina
2019

RITO SANTO PEREIRA

**TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL EM COMBINAÇÃO COM
ASPIRINA DURANTE A FASE AGUDA DA DOENÇA DE
CHAGAS EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E LESÕES CARDÍACAS
TÍPICAS NA FASE CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P436 Pereira, Rito Santo.

Tratamento com benznidazol em combinação com aspirina durante a fase aguda da doença de Chagas experimental : avaliação cardiovascular e lesões cardíacas típicas na fase crônica / Rito Santo Pereira. - Londrina, 2019.
64 f.

Orientador: Phileno Pinge Filho.

Coorientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Aspirina - Tese. 2. Benznidazol - Tese. 3. Parâmetros cardiovasculares - Tese. 4. Doença de Chagas - Tese. I. Pinge Filho, Phileno. II. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 615

RITO SANTO PEREIRA

**TRATAMENTO COM BENZNIDAZOL EM COMBINAÇÃO COM
ASPIRINA DURANTE A FASE AGUDA DA DOENÇA DE
CHAGAS EXPERIMENTAL:
AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR E LESÕES CARDÍACAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziela Scianti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz, graça e benção por ter iniciado e terminado mais este desafio com saúde.

Ao orientador Prof. Dr. Phileo Pinge Filho pela oportunidade, confiança, incentivo, apoio e amizade.

Às pessoas que gentilmente doaram sua expertise e disponibilidade, especialmente a Aparecida Malvezi, Vera Tatakihara, Isabel Lovo Martins, Bruno Lucchetti, Tiemi Suzukawa, Tassiani Rodrigues, Raquel Nakama, Gabriela Ferreira e todos outros ICs do laboratório de imunopatologia experimental-LIE.

Ao Departamento de fisiologia - laboratório de fisiologia cardiovascular, especialmente a Prof^a Dra. Marli Martins Pinge.

Ao Departamento de histologia, em especial ao Prof. Dr. Eduardo Araújo, a Andreia Pupim e o Paulo Watanabe.

Ao Departamento de microbiologia - laboratório NIP V, especialmente a Profa. Dra. Sueli Ogatta, Prof. Dr. Eliandro Tavares e a Jussevania de Sá.

À Universidade Estadual de Londrina - Centro de Ciências Biológicas, a todos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Patológicas.

Aos colegas do curso e amigos que fiz durante estes quatro anos de longa caminhada: Jackson Myamoto, Adriano Aranome, Fábio Bonifácio, Eduardo, Tiago Nascimento, Virginia Sousa e Lourival Félix.

Ao meu pai Santos Luís Pente, a primogênita Maria Kyara e aos meus irmãos, Abílio, Artur, Nilza, Nelson e Luís pelos exemplos de moral, determinação, incentivo e apoio moral.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique, Faculdade de Ciências de Saúde da UniZambeze, CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

PEREIRA, Rito Santo. **Tratamento com benznidazol em combinação com aspirina durante a fase aguda da doença de Chagas experimental: avaliação cardiovascular e lesões cardíacas típicas na fase crônica.** 2019. 64 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das principais causas de morte por cardiomiopatia e insuficiência cardíaca nos países da América Latina. O tratamento da doença de Chagas tem como objetivo eliminar o parasito, diminuir a probabilidade de cardiomiopatia e interromper o ciclo de transmissão da doença. O benznidazol (BZ) e o nifurtimox (Nfx) são reconhecidos como medicamentos efetivos para o tratamento da doença de Chagas pela Organização Mundial da Saúde, mas ambos apresentam alta toxicidade e eficácia limitada, especialmente na fase crônica da doença. Em doses baixas, foi relatado que a aspirina (ASA) protege contra a infecção por *T. cruzi*. Administramos BZ em combinação com ASA em doses baixas durante a fase aguda da doença e avaliamos aspectos cardiovasculares e lesões cardíacas na fase crônica. O tratamento com ASA evitou a disfunção cardiovascular (hipertensão e taquicardia) e lesões cardíacas típicas. Além disso, os camundongos tratados com BZ+ASA apresentaram área fibrótica cardíaca menor do que a dos camundongos tratados com BZ. Estes resultados foram associados ao aumento no número de eosinófilos, reticulócitos e no nível de óxido nítrico no plasma e tecido cardíaco de camundongos tratados com ASA em relação aos respectivos controles. Esses efeitos da ASA e BZ+ASA em camundongos infectados cronicamente foram inibidos pelo pré-tratamento com o antagonista do receptor LXA₄, Boc-2, indicando que os efeitos protetores da ASA são mediados pela lipoxina desencadeada por ASA. Esses resultados enfatizam a importância de explorar novas combinações de medicamentos para tratamento da fase aguda da doença de Chagas que são benéficas para pacientes crônicos.

Palavras-chave: aspirina, benznidazol, parâmetros cardiovasculares, doença de Chagas, lipoxina, terapia

PEREIRA, Rito Santo. **Treatment with benznidazole in combination with aspirin during the acute phase of experimental Chagas disease:** cardiovascular evaluation and typical cardiac lesions in the chronic phase. 2019. 64 p. Thesis (Doctorate in Experimental pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is one of the main causes of death due to cardiomyopathy and heart failure in Latin American countries. The treatment of Chagas disease is directed at eliminating the parasite, decreasing the probability of cardiomyopathy, and disrupting the disease transmission cycle. Benznidazole (BZ) and nifurtimox (Nfx) are recognized as effective drugs for the treatment of Chagas disease by the World Health Organization, but both have high toxicity and limited efficacy, especially in the chronic disease phase. At low doses, aspirin (ASA) has been reported to protect against *T. cruzi* infection. We administered BZ in combination with ASA at low doses during the acute disease phase and evaluated cardiovascular aspects and cardiac lesions in the chronic phase. ASA treatment prevented the cardiovascular dysfunction (hypertension and tachycardia) and typical cardiac lesions. Moreover, BZ+ASA-treated mice had a smaller cardiac fibrotic area than that in BZ-treated mice. These results were associated with an increase in the number of eosinophils and reticulocytes and level of nitric oxide in the plasma and cardiac tissue of ASA-treated mice relative to respective controls. These effects of ASA and BZ+ASA in chronically infected mice were inhibited by pretreatment with the LXA₄ receptor antagonist, Boc-2, indicating that the protective effects of ASA are mediated by ASA-triggered lipoxin. These results emphasize the importance of exploring new drug combinations for treatment of acute phase of Chagas disease that are beneficial for chronic patients.

Keywords: aspirin, benznidazole, cardiovascular parameters, Chagas disease, lipoxin, therapy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15-epi-LXA ₄	<i>Aspirin triggered 15-epi lipoxin A4</i>
ALP	Alquil-lisofosfolípídeos
ASA	Aspirina
ATL	Lipoxina iniciada pela aspirina
BZ	Benznidazol
Ca ²⁺	Íon cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase miocárdica
CMP	Clomipramina
COX-1 ou 2	Ciclooxigenase – 1 ou 2
COXs	Ciclooxigenases
CPD-colina	citidina 5' difosfocolina
CYP51	Lanosterol 14 α -desmetilase
DAMPs	Padrões moleculares associadas a danos
DC	Doença de Chagas
ECG	Eletrocardiograma
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
IL-1 β	Interleucina – 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MEC	Matriz extracelular
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade maior de classe II
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
Nfx	Nifurtimox
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
OMS/ WHO	Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization
PAMPs	Padrões moleculares associadas a patógenos

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
qPCR-RT	Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real
TNF- α	Fatores de necrose tumoral alfa
TR	Tripanotona redutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS.....	14
2.2	FÁRMACOS PARA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA.....	18
2.3	OUTRAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA DOENÇA DE CHAGAS.....	22
2.3.1	Compostos De Amidina E Análogos.....	22
2.3.2	Inibidores Do Proteassoma De Cinetoplasto	23
2.3.3	Inibidores Da Biossíntese De Ergosterol	23
2.3.4	Inibidores Do Metabolismo Da Tripanotiona	23
2.3.5	Inibidores De Cisteína Protease	24
2.3.6	Inibidores De Fosfolipídios	24
2.3.7	Inibidores Do Metabolismo De Polifosfatos (Bisfosfonatos)	25
2.3.8	Inibidores Da Síntese De Prostaglandinas	25
2.4	COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA PARA DOENÇA DE CHAGAS.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	ARTIGO – Combination Therapy Using Benznidazole And Aspirin During the Acute Phase of Experimental Chagas Disease Prevents Cardiovascular Dysfunction and Decreases Typical Cardiac Lesions of Chronic Phase	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	62
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	63

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações de baixa renda que vivem em regiões de climas tropicais e subtropicais. Vários são os agentes etiológicos dessas doenças, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. A doença de Chagas (DC) é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2019).

A DC, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal, causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, amplamente distribuído nas Américas. Caracteriza-se como uma complexa condição resultante da invasão e estabelecimento bem-sucedido de *T. cruzi* em tecidos-chaves do hospedeiro mamífero, capaz de levar a uma condição crônica limitante (TANOWITZ et al., 2015; URBINA, 2015; WHO, 2019).

Cerca de 65 milhões de pessoas que vivem em 21 países endêmicos da América Latina correm o risco de contrair a DC, levando a óbito cerca de 12 mil indivíduos na região a cada ano. Atualmente estima-se que mais de 6 milhões de pessoas na América Latina vivem com DC e a maioria delas não sabe que está infectada (WHO, 2019).

A epidemiologia dessa infecção está mudando rapidamente devido a fluxos sem precedentes de indivíduos infectados assintomáticos da América Latina para a Europa, Estados Unidos e Austrália. Como consequência das diferentes formas de transmissão, bem como da natureza crônica da doença, atualmente a DC representa um desafio universal (ANTINORI et al., 2017).

A transmissão da infecção pode ser vetorial, através de contato com fezes de insetos triatomíneos infectados, mas também pode resultar da transmissão vertical da mãe para o feto (CARLIER et al., 2015), pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas (NOYA et al., 2015), transfusões de sangue (YOUNG et al., 2007), transplantes de órgãos (KUN et al., 2009) e acidente laboratorial (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009). Atualmente casos de transmissão por ingestão de caldo de cana ou açaí, vem ganhando destaque, sobretudo no Brasil onde a transmissão vetorial foi controlada. Transmissão através de alimentos ou bebida contaminada com fezes ou secreções de triatomíneos parece causar doença mais

grave, com maior mortalidade em relação à transmissão vetorial (PINTO et al., 2008).

O curso clínico da DC é dividido em fases aguda e crônica. A fase aguda da doença é de curta duração e evolui gradualmente para o estágio indeterminado da doença crônica. No estágio indeterminado, os pacientes têm evidências sorológicas de infecção, mas nenhuma evidência clínica, radiológica, eletrocardiográfica ou ecocardiográfica de cardiopatia (NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012). O envolvimento digestivo, caracterizado pela presença de megacólon ou megaesôfago, ocorre em aproximadamente 10% dos casos (PEREZ-AYALA et al., 2011; SOUZA et al., 2013). A cardiomiopatia chagásica é o resultado da remodelação cardíaca e a manifestação clínica mais importante da DC, devido à sua frequência, gravidade e impacto na morbidade e mortalidade. As manifestações clínicas variam desde envolvimento miocárdico à insuficiência cardíaca terminal, com alta incidência de arritmias (NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2012).

Benznidazol (BZ) é utilizado no tratamento da DC desde os anos 70 e é único antiparasitário disponível comercialmente no Brasil para uso clínico, no entanto, uma grande limitação desse fármaco é a toxicidade e atividade curativa limitada na fase crônica da doença (URBINA, 2015). Considerando essas limitações, há um interesse renovado na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da DC (ALONSO-PADILLA; RODRIGUEZ, 2014; LEPESHEVA, 2013). Nos últimos anos, temos visto o surgimento de uma nova estratégia envolvendo combinação de fármacos. Essa abordagem aumentou nossas esperanças de melhorar a eficácia do tratamento da DC, diminuindo a probabilidade de resistência medicamentosa e toxicidade. Diversos estudos mostraram que combinação de BZ com novos ou compostos já em uso, ser uma abordagem bem-sucedida de alternativa terapêutica. Neste contexto, diferentes estudos já mostraram os efeitos positivos e negativos de inibidores da ciclooxigenase, como aspirina (ASA), sobre o curso da infecção por *T. cruzi*, mas até ao momento, nenhum destes se prontificou a avaliar a eficácia do tratamento com BZ e ASA na fase aguda e seus efeitos sobre os parâmetros cardiovasculares e lesões cardíacas típicas na fase crônica da DC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS

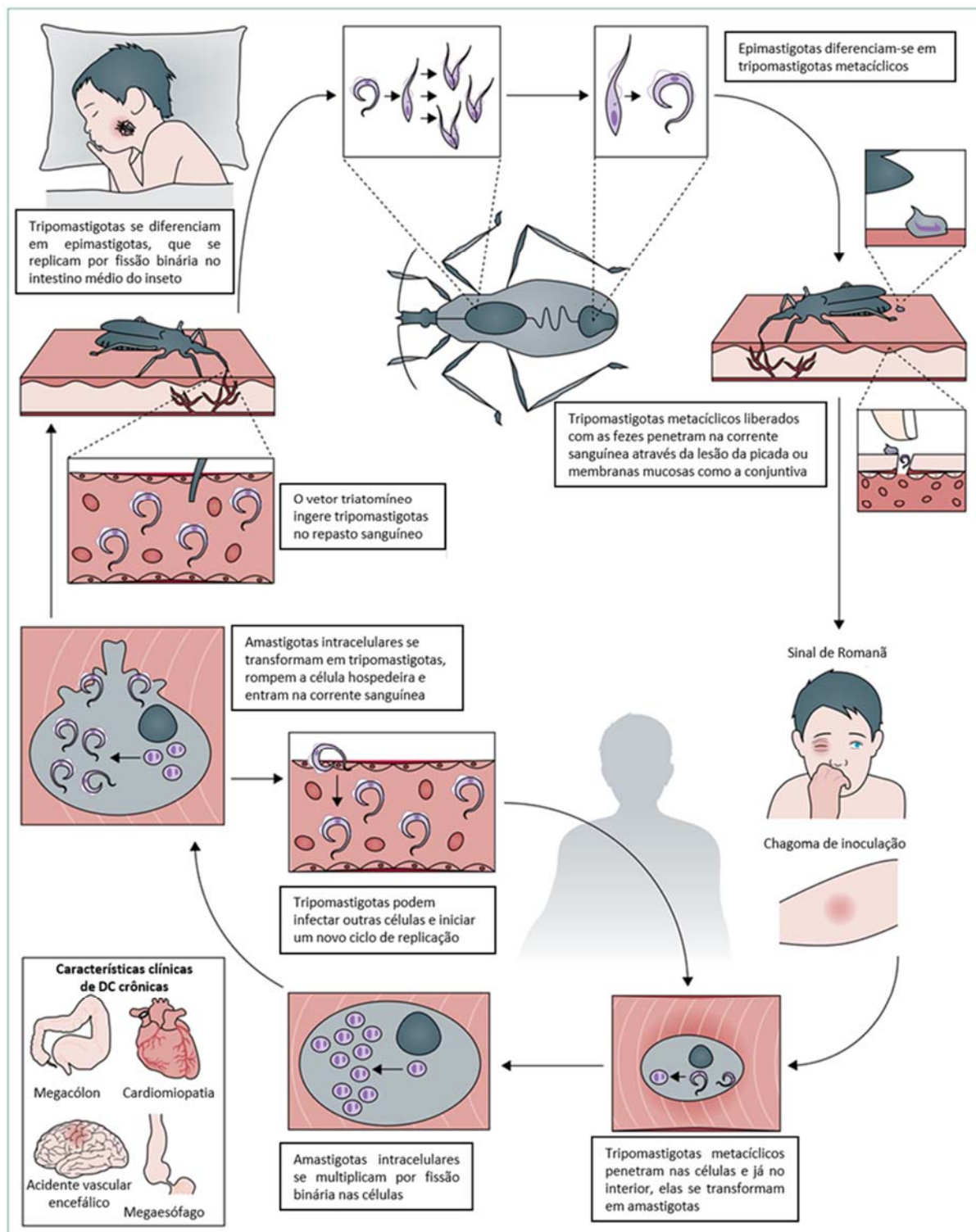
O ciclo biológico de *T. cruzi* (**Figura 1**) inicia durante o repasto sanguíneo do inseto vetor (por exemplo *Triatoma infestans*) em hospedeiro vertebrado infectado (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O vetor ingere formas tripomastigotas que são encaminhadas para o estômago do inseto onde ocorre a diferenciação em epimastigota que migram e se aderem à célula epitelial do intestino e a cutícula serosa do reto através de flagelos, dando início ao processo de diferenciação em tripomastigota metacíclica que se desprende do intestino e é secretada pelo inseto juntamente com as fezes podendo infectar o hospedeiro vertebrado saudável (ROSSI; RAMOS; BESTETTI, 2003).

No hospedeiro vertebrado saudável, o ciclo inicia-se quando formas tripomastigostas metacíclicas eliminadas junto com fezes do triatomíneo são depositadas no local da lesão da picada ou mucosa. Essas formas interagem com diferentes tipos celulares através de glicoconjugados na superfície do parasito e vários receptores presentes em células como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais facilitando a internalização por fagocitose do parasito pela célula hospedeira onde se diferenciam em amastigotas. Estas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas, rompem a célula hospedeira e caem na corrente sanguínea, infectando células vizinhas ou mais distantes, diferenciam-se em amastigotas e repetindo o ciclo (CHATELAIN, 2015).

A DC apresenta duas fases, uma de curta duração, denominada de fase aguda, que pode durar de 6 a 8 semanas, seguida por uma fase de longa duração (fase crônica) que persiste por toda a vida do indivíduo na ausência de tratamento específico. A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia, em que o parasito assume uma forma tripomastigota e invade fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e cardíacos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). As principais manifestações clínicas incluem a presença do sinal de Romanã, um edema unilateral, dilatação das pálpebras ou chagoma de inoculação na pele e os sintomas são febres, fadiga e inchaço glandular (LYMBERG; THOMPSON, 2015).

Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi* em hospedeiro invertebrado e vertebrado



Fonte: PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018.

Incluem-se também aos sinais clínicos taquicardia, hipertrofia ventricular leve, alteração da amplitude da onda P, distúrbios de repolarização e outras alterações elétricas (NETTO; MELLO; BARBOSA, 1970). Essas alterações

ocorrem tanto em humanos como em modelos experimentais da DC. Em poucos pacientes (cerca de 5%), a morte súbita pode ocorrer na fase aguda devida à falência cardíaca congestiva associada com miocardite ou meningoencefalite (ZACKS et al., 2005).

Após a fase aguda da doença, a maioria dos pacientes pode progredir para fase crônica indeterminada clinicamente assintomática, apesar de testes sorológicos e parasitológicos serem positivos para *T. cruzi* (RIBEIRO et al., 2012). Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes progredirão da fase indeterminada para a determinada da doença onde 20 a 40% desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) devido à persistência do parasito, autoimunidade e disfunções microvasculares (RIBEIRO et al., 2012). As complicações cardíacas mais comuns da DC crônica são: insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo, arritmias e condução intraventricular e atrioventricular, que é a principal causa de mortalidade em pacientes com CCC (TANOWITZ et al., 2015). A incidência anual de tromboembolismo em pacientes chagásicos é de 1 a 2%, afetando principalmente pacientes com insuficiência cardíaca (IC). Ocasionalmente, esse agravamento é a primeira manifestação da DC (KAWAGUCHI et al., 2018). Os êmbolos cardíacos podem atingir a circulação pulmonar e sistêmica, sendo a região cerebral a mais clinicamente evidente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A CCC categorizada em estágios de comprometimento cardíaco (A, B, C e D) de acordo com as manifestações, eletrocardiograma, alterações radiológicas e da função ventricular, é indiscutivelmente a mais expressiva e grave manifestação da doença, associada a altas taxas de morbimortalidade (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; MORA, 2016). Ela provoca danos tissular progressivo e fibrose extensa no coração e no plexo nervoso, levando a alterações na matriz extracelular (MEC) (KUPAI et al., 2010). A síntese e degradação da MEC é controlada por enzimas proteolíticas, como metaloproteinases de matriz (MMPs) e citocinas. MMPs são importantes enzimas envolvidas em muitas condições fisiopatológicas através da degradação de moléculas de MEC (por exemplo, colágeno, laminina e fibronectina) e liberação de epítomos crípticos da MEC (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; KUPAI et al., 2010). Entre as MMPs, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 foram associadas a distúrbios cardiovasculares (HU et al., 2007; POLYAKOVA et al., 2011). Foi demonstrado que as atividades das MMP-2 e MMP-9 estão aumentadas durante a miocardite aguda na infecção experimental por *T. cruzi*

e que a inibição dessas enzimas leva à redução da miocardite e melhora na sobrevida em camundongos (FARES et al., 2013; GUTIERREZ et al., 2008). Assim, as MMPs são ativadas em condições inflamatórias ou isquêmicas/ reperfusão (GU et al., 2002). Muitos tipos de células podem produzir MMPs e citocinas; no entanto, os neutrófilos são a principal fonte celular imune de MMPs e sabe-se que os monócitos são capazes de produzir citocinas (OPDENAKKER; VAN DEN STEEN; VAN DAMME, 2001). Estas células de imunidade inata iniciam a resposta inflamatória e a deposição de fibrose/colágeno no coração através da estimulação contínua do antígeno, que pode ser por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs) (EPELMAN; LIU; MANN, 2015).

Os métodos de diagnóstico da CCC incluem anormalidades no eletrocardiograma (ECG) (WILLIAMS-BLANGERO et al., 2007) e ressonância magnética para detectar fibrose cardíaca e disfunção diastólica (REGUEIRO et al., 2013).

O tratamento de pacientes com CCC baseia-se nas manifestações clínicas (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017), visando reduzir os sintomas, retardar a evolução da disfunção ventricular e prolongar a sobrevida (BILATE; CUNHA-NETO, 2008). Sugere-se que o tratamento da CCC seja realizado de acordo com as diretrizes gerais para o tratamento de IC e deve consistir na combinação de três classes terapêuticas: inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina, diuréticos e bloqueadores β -adrenérgicos (DIAS et al., 2016).

Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina como o captopril (LEON; WANG; ENGMAN, 2003) e o enalapril (BOTONI et al., 2007) desempenham um papel essencial no remodelamento cardíaco diminuindo a miocardite e fibrose, aliviando a progressão da disfunção ventricular da IC na CCC. Em relação à bloqueadores dos receptores da angiotensina, a espironolactona e a eplerenona melhoram a qualidade de vida e reduzem os sintomas associados a CCC (PITT et al., 2003). As arritmias ventriculares dos pacientes chagásicos são tratadas com amiodarona que podem ser associadas a agentes alternativos como propafenona, sotalol e β -bloqueadores, para reduzir eventos arrítmicos graves (BARBOSA et al., 2015). A bradiarritmia em pacientes chagásicos crônicos, está relacionada à disfunção do nó sinusal ou bloqueios atrioventriculares e o tratamento dos sintomas é feito com implante de marcapasso permanente (BESTETTI, 2016).

O megaesôfago é outra forma de manifestação clínica da DC crônica (DE OLIVEIRA et al., 2015). Os sintomas comumente relatados no megaesôfago são: disfagia, regurgitação e dor no esôfago. O tratamento do megaesôfago incluiu medidas clínicas, farmacológicas, dilatação e procedimento cirúrgico para auxiliar no trânsito de alimentos e líquidos (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009). O tratamento farmacológico é baseado em substâncias que visam relaxar o esfíncter esofágico. Os derivados nítricos (dinitrato de isossorbitol) e os bloqueadores dos canais de cálcio (nifedipina) são recomendados. Outra alternativa é a injeção de toxina botulínica, que atua para inibir a liberação de acetilcolina (CAMPOS et al., 2009).

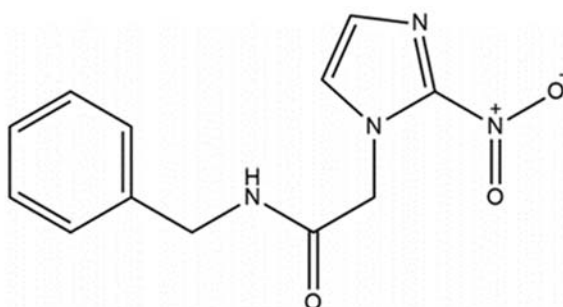
Os sintomas mais frequentes no megacólon consistem em constipação intestinal, desconforto à distensão abdominal, fenômenos oclusivos associados ao fecaloma e vólculo sigmoide (BRAGA et al., 2013). O tratamento do megacólon pode ser clínico ou cirúrgico e varia de acordo com a concordância do paciente, nível de complicações, estado nutricional, condição clínica, presença de comorbidade e idade (DIAS et al., 2016).

2.2 FÁRMACOS PARA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA

Os 2 medicamentos antiparasitários disponíveis para o tratamento da CD são benznidazol (BZ) e nifurtimox (Nfx). Ambos são mais eficazes na fase aguda da doença, com taxas de cura parasitológica de 60% a 80%. Atualmente, o Nfx foi desaprovado por *Food and Drug Administration* (FDA) para administração em crianças de 2 a 12 anos de idade (PAHO, 2019).

O BZ ou N-benzil-2- (2-nitro-imidazol-1-il) acetamida (**Figura 2**) é um fármaco nitro-heterocíclico, derivado nitroimidazólico sintetizado no início dos anos 70 por Wineholt e Liebman e produzido por Hoffman - La Roche, Suíça. Em 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do BZ foram concedidos ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) - Recife / PE - Brasil (APT, 2017) mas também são produzidos pela companhia farmacêutica Elea Phoenix - Argentina (SALES et al., 2017).

Figura 2. Estrutura química de benznidazol [N-benzil-2- (2-nitro-imidazol-1-il) acetamida].



Fonte: KAWAGUCHI et al., 2018.

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, BZ é classificado como classe 4, exibindo assim uma absorção limitada e/ ou variável devido as seguintes características: baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Portanto, há interesse em estratégias para melhorar a taxa de absorção, aumentando assim sua biodisponibilidade (PRIOTTI et al., 2015).

O mecanismo de ação de BZ não é totalmente compreendido (BENZIGER, CARMO, RIBEIRO, 2017). No entanto, alguns relatos associam sua ação à formação de radicais livres e/ ou metabólitos eletrofílicos. Nos derivados do nitroimidazol, a redução do grupo nitro (NO_2) no grupo amino (NH_2) ocorre pela ação da nitroreductase presente nas células hospedeiras ou em protozoários. Essa reação leva à formação de intermediários radicais, bem como metabólitos eletrofílicos. O processo é iniciado pela ação da enzima NADPH citocromo P450 reductase, que atua no grupo nitro (R-NO_2) da molécula nitroimidazol, induzindo a produção de um radical nitro intermediário (R-NO_2) e a formação de hidroxilamina (R-NHOH). Esses intermediários atuam na modificação covalente de macromoléculas, como o DNA, causando fragmentação na cadeia e desestabilização da hélice, inibindo a síntese de DNA levando à morte celular de protozoários parasitários e/ ou bacterianos. Além dessa alteração no DNA, seu mecanismo envolve a modificação de outras macromoléculas, como lipídios e proteínas, afetando o metabolismo de *T. cruzi*. Um mecanismo adicional de ação de BZ é o aumento da fagocitose, levando à lise e inibição do crescimento de *T. cruzi* por meio de mecanismo dependente de interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e pela enzima NADH-fumarato reductase (MAYA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008). Concomitantemente, os metabólitos eletrofílicos mencionados acima, devido à sua alta reatividade e baixa especificidade, podem

apresentar ação no hospedeiro humano responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados durante o tratamento de pacientes (TROCHINE, 2014).

A terapia com BZ apresenta algumas limitações, como altas doses administradas, a duração do tempo de tratamento e a ocorrência de efeitos adversos (ANTINORI et al., 2015). É considerada longe de ser ideal por apresentar vários efeitos adversos que incluem hipersensibilidade, desde erupções sensíveis à luz até dermatite esfoliativa, depressão da medula óssea, anorexia, alterações psíquicas, polineuropatia periférica, edema generalizado, linfadenopatia, artralgia, prurido, distúrbios gastrointestinais, perda de peso e cefaleia (REPETTO et al., 2015; SANTOS et al., 2015). É contraindicado em mulheres grávidas e pacientes com insuficiência hepática ou renal grave (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O tratamento é descontinuado em 9 a 29% dos casos, apesar das reações serem reversíveis e graves em menos de 1% dos casos (MOLINA et al., 2015). Esses desafios são menos frequentes quando comparados ao Nfx (**Tabela 1**).

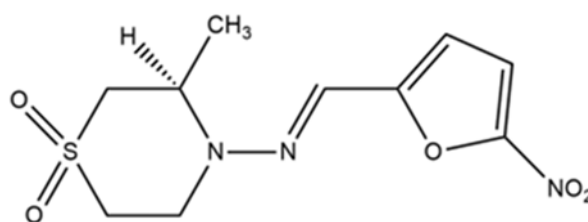
Tabela 1. Frequências de efeitos adversos associados ao benznidazol e nifurtimox.

Efeitos adversos	Benznidazol	Nifurtimox
Anorexia e perda de peso	5 – 40%	50 – 75%
Náusea	0 – 5%	15 – 50%
Vômito	0 – 5%	15 – 26%
Neuropatia periférica	0 – 5%	2 – 5%
Leucopenia	Raro: <1%	Raro: <1%

Fonte: KAWAGUCHI et al., 2018.

O Nfx ou 5-nitrofurano (3-metil-4- (50-nitrofurfurilideneamina) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (**Figura 3**) pertence à classe de compostos de nitrofurano, sintetizada em 1962 na Alemanha e produzida pela Bayer™. Este foi o primeiro medicamento projetado para tratar tripanossomíase, como doença do sono e de Chagas. Até 2014 era a base da terapia para DC nos Estados Unidos (AGB, 2015). Por mais de uma década, a Bayer oferece gratuitamente à OMS 1 milhão de comprimidos (de 120 mg e 30 mg sob a marca Lampit) por ano, além de assistência financeira para sua distribuição pela *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), principalmente em Honduras e El Salvador (CDC, 2018).

Figura 3. Estrutura química de nifurtimox [5-nitrofurano (3-metil-4- (50-nitrofurfurilideneamina) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido)].



Fonte: KAWAGUCHI et al., 2018.

É bem absorvido após administração oral e os níveis plasmáticos variam de 10 a 20 mM e concentrações mais baixas são encontradas na urina e nos tecidos (CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006). O mecanismo de ação de Nfx é baseado no dano celular originado pela produção do radical nitro-ânion através de duas vias: através de um ciclo redox com a formação de O^{\bullet} (ânion superóxido) e sua redução no correspondente derivado de amina (WILKINSON et al., 2011). A redução de um grupo nitro pela nitroreductase é fundamental para o mecanismo de ação de Nfx. Essa enzima catalisa a redução de 2 elétrons do composto, produzindo um intermediário nitroso, seguido de uma segunda redução de 2 elétrons para gerar uma hidroxilamina que diretamente gera danos às células ou produzir outros agentes citotóxicos (PATTERSON; WYLLIE, 2014). O parasito na presença de Nfx aumenta o consumo de oxigênio, H_2O_2 e a produção de radicais superóxidos (STOPPANI, 1999).

Os efeitos adversos mais frequentes descritos com uso de Nfx são anorexia, náusea, dor de cabeça e amnésia. Mas 30% dos pacientes também podem apresentar possíveis reações neurológicas como inquietação, desorientação, esquecimento, insônia, espasmos, parestesias, polineurites e convulsões (WEISS et al., 2011).

O Nfx mostrou maior toxicidade e efeitos adversos do que BZ, incluindo o aumento do estresse oxidativo no pâncreas (DE MECCA et al., 2007) e no coração de camundongos (DE MECCA et al., 2008). No contexto de danos ao coração causados pelo parasito durante uma infecção crônica, o tratamento com Nfx pode representar um risco aumentado de IC em relação ao tratamento com BZ. Por estas razões, Nfx não é o tratamento de escolha para DC na maioria dos casos em países endêmicos (BERMUDEZ et al., 2016).

A baixa eficácia de BZ, sobretudo na fase crônica da DC, os efeitos adversos graves e as implicações dos fenômenos autoimunes como fator chave para os danos do miocárdio durante a fase, incentivam a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e menos agressivas. As estratégias para superar essas limitações incluem a identificação de novos fármacos com perfís-alvo específicos, regimes de re-dosagem dos fármacos atuais, reposicionamento e terapia combinada (BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014). Entre essas estratégias, os regimes de reposição e reposicionamento dos medicamentos atuais, como monoterapia ou terapia combinada, são as intervenções mais rápidas para melhorar a terapia da DC (MARTINS et al., 2015). Alguns compostos com atividade anti-*T. cruzi* foram e continuam sendo avaliados (OLMO et al., 2014), materializando assim a busca por novos horizontes terapêuticos com objetivo de desenvolver e promover uma quimioterapia segura e eficiente para DC, tanto para a fase aguda ou crônica.

2.3 OUTRAS ABORDAGENS QUIMIOTERAPÊUTICAS PARA DOENÇA DE CHAGAS

2.3.1 Compostos De Amidina E Análogos

Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, abordou os efeitos de vários análogos da Amidina contra *T. cruzi*. Foram encontradas atividades *in vitro* e *in vivo* para arilimidamidas e diamidinas, usando modelos experimentais murino da infecção aguda por *T. cruzi* (DE SOUZA; OLIVEIRA; SOEIRO, 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2008; SOEIRO et al., 2013). A arilimidamida mais potente, DB766, exibe maior atividade tripanocida e excelente seletividade para tripomastigotas da corrente sanguínea e amastigotas intracelulares (cepa Y). O DB766 também exerce efeitos marcantes em cepas suscetíveis e naturalmente resistentes ao BZ e exibe maior atividade *in vitro* do que os fármacos de referência. Em ensaios *in vivo*, o DB766 reduz efetivamente a carga parasitária no sangue e no tecido cardíaco e tem eficácia semelhante ao BZ em modelo murino de infecção por *T. cruzi*. O DB766 melhora as alterações do ECG, reduz as lesões hepáticas e cardíacas induzidas por *T. cruzi* fornecendo 90 a 100% de proteção e reduz a mortalidade, semelhante ao BZ (BATISTA et al., 2010).

2.3.2 Inibidores Do Proteassoma De Cinetoplasto

Proteassoma são complexos intracelulares responsáveis pela maior parte da degradação de proteínas em vários organismos. Recentemente, foi descrito um inibidor seletivo do proteassoma de cinetoplastídeo (GNF6702) com eficácia *in vivo* sem precedentes contra DC, leishmaniose e doença do sono (KHARE et al., 2016). Este composto promoveu a cura de camundongos nos três modelos de infecção por um mecanismo não competitivo. É bem tolerado em camundongos e apresenta ótima propriedade farmacocinética (ROMANHA et al., 2010).

2.3.3 Inibidores Da Biossíntese De Ergosterol

A via biossintética do ergosterol é essencial para a sobrevivência do parasito. Posaconazol (SCH 56592) é um inibidor potente e seletivo do CYP51 de fungos. Possui potente atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* contra cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a nitrofuranos, nitroimidazóis e antifúngicos convencionais (LIENDO et al., 1999; MOLINA et al., 2000; URBINA et al., 1998). Mais importante ainda, o posaconazol foi mais ativo do que BZ, contra cepas resistentes de *T. cruzi* em modelos murino de DC aguda e crônica (MOLINA; SALVADOR; SANCHEZ-MONTALVA, 2015).

Ravuconazol é um derivado de triazol com potente atividade antifúngica de amplo espectro. Nos modelos murino de DC, ravuconazol apresentou alta atividade de cura parasitológica contra *T. cruzi* suscetível a nitrofurano/nitroimidazol (cepa CL) e parcialmente resistentes a BZ (cepa Y) (URBINA et al., 2003a). A meia-vida mais longa em humanos incentivou seu uso para quimioterapia em DC humana (SALES et al., 2017).

2.3.4 Inibidores Do Metabolismo Da Tripanotiona

A tripanotiona redutase (TR) desempenha um papel essencial no desenvolvimento de *T. cruzi* porque mantém o ambiente redutor intracelular (SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002). Os inibidores da via da TR receberam atenção de muitos grupos de pesquisa, e uma variedade de compostos foram identificados como inibidores da TR (GUTIERREZ-CORREA; FAIRLAMB;

STOPPANI, 2001; LI et al., 2001; RIVAROLA; PAGLINI-OLIVA, 2001). A tioridazina, um inibidor da TR *in vitro*, aumentou a sobrevivência, reduziu a parasitemia e a lesão cardíaca em modelo murino de infecção aguda embora a cura parasitológica não tenha sido observada (GUTIERREZ-CORREA; FAIRLAMB; STOPPANI, 2001; LO PRESTI et al., 2004; RIVAROLA et al., 1999). Inibidores do metabolismo da tripanotona, como a sulfoximina butionina, são candidatos com potencial terapêutico, isolados ou combinados com drogas que produzem radicais livres como Nfx e BZ (MAYA et al., 2010).

2.3.5 Inibidores De Cisteína Protease

A cruzipaina, também conhecida como cruzaina, é a principal cisteíno-protease (gp51/57) de *T. cruzi* e é expressa em todos os estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* (CAZZULO, 2002; URBINA; DOCAMPO, 2003). Inibidores de protease bloqueiam proliferação de amastigota, epimastigota e metaciclogênese *in vitro*, reduzindo significativamente parasitemia e aumentam a sobrevivência animal em modelo murino nas duas fases da DC. Na fase aguda da DC, tratamento de camundongos com inibidores irreversíveis da cruzaina reduziu o número de lesões cardíacas, amastigotas intracelulares e os níveis de infiltrados inflamatórios (ENGEL et al., 1998).

O K-777, que foi originalmente caracterizado pelo Centro Sandler de Pesquisa em Doenças Parasitárias Tropicais da Universidade da Califórnia, em São Francisco, foi o inibidor de cisteíno-protease mais promissor. É um vinil-sulfona que bloqueia efetivamente a atividade da cruzipaina, promove a melhora dos camundongos infectados com uma cepa letal de *T. cruzi* e elimina parasitemia em camundongos infectados cronicamente (KERR et al., 2009). Em modelo agudo de infecção em cães, não promoveu cura parasitológica, mas reduziu significativamente o dano cardíaco induzido pelo parasito (BARR et al., 2005). Por outro lado, Cz007 e Cz008 são vinil-sulfonas contendo nitrila com atividade de cisteína proteinase que mostrou ação anti-*T. cruzi in vivo* após administração oral em dose menor que a de BZ (NDAO et al., 2013).

2.3.6 Inibidores De Fosfolipídios

Fosfolipídios não são apenas componentes estruturais, mas participantes ativos em vários processos biológicos e são precursores de moléculas biologicamente ativas. Os alquil-lisofosfolípidos (ALP) são análogos sintéticos dos lisofosfolípidos que demonstraram ser eficazes *in vitro* e *in vivo* contra cepas de *T. cruzi* e tripanossomatídeos. A miltefosina, um de seus representantes, tem sido usada por via oral na leishmaniose visceral, com bons resultados. O ALP bloqueia seletivamente a biossíntese de fosfatidil-colina de *T. cruzi* através da transmetilação da via de *Greenberg*, em contraste com o hospedeiro vertebrado, onde a via de Kennedy da CDP-colina é predominante (URBINA, 2003).

2.3.7 Inibidores Do Metabolismo De Polifosfatos (Bisfosfonatos)

Os bisfosfonatos são utilizados para prevenir a reabsorção óssea em humanos. O risedronato, um potente bisfosfonato, possui atividade *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi*. Os bisfosfonatos inibem a enzima farnesil pirofosfato sintase de *T. cruzi* (GARZONI et al., 2004a). Modelo murino de DC aguda usando a cepa Y demonstrou que o tratamento com risedronato levou a redução da parasitemia e aumento da sobrevivência (GARZONI et al., 2004b). Outro estudo murino investigou o papel desse medicamento no desenvolvimento de CCC usando *T. cruzi* cepa Brasil e Tulahuen, e verificou uma redução significativa na mortalidade de camundongos infectados com a cepa Brasil, mas sem efeito na sobrevivência de camundongos infectados com a cepa Tulahuen (BOUZAHZAH et al., 2005).

2.3.8 Inibidores Da Síntese De Prostaglandinas

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo insaturado que se encontra na forma esterificada nos fosfolipídios de membranas. Vários fatores podem influenciar a liberação do AA da forma esterificada, como lesões celulares, anticorpos, entre outros (SCHAIBLE; SCHIMID, 1988). A cascata do ácido araquidônico é responsável pela bioformação de eicosanóides, como as prostaglandinas (PG), que são metabólitos endógenos que mediam diversos processos fisiopatológicos importantes como a resposta inflamatória. A inibição

seletiva de enzimas da cascata do AA representa um sítio de intervenção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como por exemplo, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como ASA, que atuam inibindo a COX ou prostaglandina endoperóxido-H sintase (PGHS), enzima envolvida na bioformação das PG. A biossíntese da prostaglandina E₂ (PGE₂) que é responsável por contrações musculares gastrointestinais, vasodilatação, estímulo de secreções intestinais, secreção do ácido gástrico, entre outros, ocorre principalmente nos macrófagos. A prostaglandina D₂, produzida nos mastócitos, tem como principais ações a modificação da liberação de hormônios hipotalâmicos, vasodilatação e relaxamento de músculos gastrointestinais (SILVA, 2010).

A tromboxana-sintase, enzima citocromo P450 dependente que biotransforma a PGH₂ em tromboxana A₂ (TXA₂), que pode causar vasoconstrição, agregação plaquetária e bronco-constricção e também representa um sítio de intervenção inibitória com aplicações terapêuticas úteis para o tratamento e prevenção do acidente trombo - isquêmico. No endotélio vascular são sintetizadas as prostaciclinas (PGI₂), que tem como principais ações a vasodilatação, inibição de agregação plaquetária e liberação de renina (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2002).

Prostaglandinas derivadas do hospedeiro e do parasito contribuem para a patogênese da DC. Devido a extrema importância dos eicosanoides na infecção por *T. cruzi*, seria relevante o uso de fármacos que fazem o bloqueio das enzimas COXs, com a administração de AINEs (ASHETON et al., 2007). ASA usada em baixas doses, preferencialmente inibe a COX-1 em plaquetas circulantes, atenuando a síntese de tromboxano e prevenindo a trombose, assim conferindo um papel cardioprotetivo (GROSSER et al., 2006). E ainda, na presença de ASA a COX-2 é acetilada e esta é capaz de converter o ácido araquidônico em 15R-HETE, o qual é o substrato para a produção de 15-epi-LXA₄, também chamada Lipoxina iniciada pela ASA (ATL). Lipoxinas e ATL possuem atividades anti-inflamatórias como pró-resolvinas, reduzem a parasitemia, mortalidade e alterações cardíacas *in vivo* (MOLINA- BERRÍOS et al., 2013) e pré-tratamento com ASA impede alterações comportamentais induzidas pela infecção aguda, mas acelera a mortalidade (SILVERO-ISIDRE et al., 2018).

Em nosso grupo de pesquisa, Malvezi e colaboradores mostraram que pré-tratamento com inibidor da COX-1 (ASA), causa redução acentuada da infecção por *T. cruzi* em macrófagos peritoneais e essa inibição foi associada ao aumento da

produção de IL-1 β e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (MALVEZI et al., 2014). Pré-tratamento de monócitos humano com ASA ou SQ 22536 (inibidor de adenilato-ciclase) induz inibição acentuada da infecção por *T. cruzi* e tratamento com SQ 22536 após ASA aumenta invasão e diminui na produção de NO (DE FREITAS et al., 2017). Tratamento com celecoxibe (inibidor seletivo da COX-2) ou SQ 22536 em populações de células mononucleares do sangue humano periférico enriquecido com células dendríticas, diminui o índice de internalização do parasito (LONIEN et al., 2017).

A inibição da síntese de prostaglandinas pela ASA pode aumentar a atividade antiparasitária de macrófagos e aumentar o efeito de Nfx e BZ. Os níveis de NO foram restaurados por ASA em células RAW infectadas com *T. cruzi*, contribuindo para a melhoria da atividade antiparasitária de macrófagos (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010). O NO gerado a partir do aminoácido L-arginina pela isoforma indutível da NO sintase (iNOS ou NOS2), é uma molécula antimicrobiana chave envolvida na morte de patógenos intracelulares devido aos efeitos microbicidas derivados de radicais livres tóxicos (peroxinitrito e superóxido) (DE GROOTE; FANG, 1995; FANG, 1997; NATHAN; SHILOH, 2000). Este processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais livres tóxicos (peroxinitrito e superóxido) gerados após a produção de NO, esses radicais são essenciais para proteção contra vários patógenos intracelulares, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários. Mais especificamente, foi demonstrado que NO protege contra infecção por *T. cruzi* e outros protozoários como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium sp* e *Schistosoma mansoni* (BRUNET, 2001).

Macrófagos de camundongos infectados por *T. cruzi* produzem altos níveis de NO para eliminar formas tripomastigotas em desenvolvimento (THOMSON et al., 1999). Níveis de NO e de seus metabólitos aumentam durante a invasão de cardiomiócitos por *T. cruzi* (CHANDRASEKAR et al., 2000), que expressam as principais isoformas de NO sintase (STAMLER; MEISSNER, 2001). Consistentemente, uma relação inversa foi observada entre a tripanossomíase e os níveis de NO, *in vivo* e *in vitro* (GOBERT et al., 1998). Além disso, a suscetibilidade a *T. cruzi* em camundongos deficientes de iNOS aumenta significativamente (HOLSCHER et al., 1998). O tratamento de camundongos infectados com inibidores de iNOS tem efeitos adversos, enquanto doadores de NO eliminam tripomastigotas (PETRAY et al., 1995). A molécula de NO pode afetar *T. cruzi* por modificação

química de proteínas contendo cisteína e/ou por ligação a metaloproteínas e podem ainda interferir sobre a atividade catalítica da cruzipaina, a principal proteinase cisteína do tipo papaína de *T. cruzi* (VENTURINI et al., 2000).

O tratamento da infecção chagásica com ASA aumenta o número de neurônios nitrérgicos, protege os neurônios mioentéricos do esôfago e do cólon da atrofia causada pela infecção e melhora o tempo de trânsito intestinal (MASSOCATTO et al., 2017; MASSOCATTO et al., 2015; ODA et al., 2017).

2.4 COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA PARA DOENÇA DE CHAGAS

Diferentes estratégias terapêuticas têm sido amplamente utilizadas para a descoberta de novos tratamentos para DC ou para potencializar a eficácia dos quimioterápicos já existentes. Das estratégias incluem: regimes de re-dosagem dos medicamentos atuais; introdução de terapia combinada; e identificação de novos alvos para quimioterapia. A combinação terapêutica tem merecido cada vez mais atenção como forma de aumentar a eficácia e a tolerância ao tratamento uma vez que administração de diferentes classes químicas podem reduzir as doses e/ou a duração do tratamento, resultando em menos efeitos adversos. Essa estratégia também pode reduzir os custos gerais, fornecendo uma opção mais econômica (MARTINS et al., 2015).

Estudos que investigaram interações entre inibidores da biossíntese de esteróis que atuam em diferentes etapas de sua via de biossíntese mostraram efeitos sinérgicos contra *T. cruzi* (MALDONADO et al., 1993; URBINA et al., 1988). Outros estudos que pesquisaram interações entre BZ e posaconazol demonstraram melhora na eficácia quimioterápica em infecção experimental (DINIZ et al., 2013).

Combinações de compostos nitroheterocíclicos (BZ) e inibidores do CYP51 (Cetoconazol), em doses sub-terapêutica, mostraram interação positiva quando os compostos foram avaliados em combinação quanto à sua eficácia e redução da dose de BZ (ARAÚJO et al., 2000). Combinação de BZ e itraconazol melhora em quatro vezes a progressão da doença em relação a tratamento de forma isolada, além disso, essa combinação levou a diminuição da cardiotoxicidade na DC experimental (MARTINS et al., 2015) e prolonga a meia-vida de BZ (DA SILVA et al., 2012).

BZ em combinação com posaconazol (derivado de azol) induz a cura

parasitológica superiores em comparação a tratamentos isolados e permitiu a redução do tempo de tratamento de camundongos infectados com *T. cruzi* (CENCIG et al., 2012; DINIZ et al., 2013). Combinação de BZ e diamidina DB289 geram 100% de proteção contra a mortalidade de camundongos, enquanto BZ de forma isolada forneceu apenas 78% de proteção (BATISTA et al., 2011).

O enalapril isolado ou em combinação com BZ não alterou o número de parasitos circulantes, mas reduziu o recrutamento de leucócitos cardíacos e o colágeno total no tecido cardíaco. Curiosamente, a terapia combinada também reduziu os níveis de quimiocinas, CK e CK-MB e proteínas C-reativa na fase crônica, demonstrando que a terapia combinada usada potencializa seus efeitos imunomoduladores, resultando em uma baixa produção de biomarcadores de lesões cardíacas (PENITENTE et al., 2015).

BZ combinado com clomipramina diminui danos e inflamações cardíacas durante a cardiomiopatia da fase crônica (GARCIA et al., 2016). A combinação BZ e quelante de ferro desferrioxamina diminui a parasitemia e mortalidade e aumenta níveis de hemoglobina, demonstrando que a modificação nas reservas de ferro aumenta a eficácia da BZ (FRANCISCO et al., 2008). Análise isobolográfica dos efeitos combinados de ASA, Nfx e BZ indicaram efeitos sinérgicos no controle da infecção de células RAW por *T. cruzi*, com índices combinatórios de 0,71 e 0,61, respectivamente (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2009).

O novo composto tetra-hidro- β -carbolina N-butil-1- (4-dimetilamino) fenil-1,2,3,4-tetra-hidro- β -carbolina-3-carboxamida foi superior entre seus pares na redução do número de células infectadas e o número de parasitos internalizados, com baixa citotoxicidade (VALDEZ et al., 2009). Após essa observação, o composto selecionado foi avaliado em combinação com BZ *in vitro* e *in vivo*, onde foi observado um efeito sinérgico, levando a uma redução nas taxas de parasitemia e mortalidade (VALDEZ et al., 2011). Um composto adicional testado com BZ foi o novo candidato a medicamento 2-metil-1,5-bis (4-nitrofenil) penta-1,4-dien-3-ona, que demonstrou atividade tripanocida *in vitro*. Em seguida, foi avaliado em combinação com BZ e cetoconazol demonstrando forte sinergismo (PERON et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia do tratamento combinado BZ+ASA na fase aguda e seus efeitos na fase crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com BZ, ASA e BZ+ASA sobre o curso da DC experimental, determinando carga parasitária no sangue e coração, parâmetros hematológicos e sobrevida durante as fases da infecção por *T. cruzi* (cepa Y, parcialmente resistente ao benznidazol);
- Avaliar os parâmetros cardiovasculares (pressão arterial média e frequência cardíaca) dos animais dos grupos controles e experimentais;
- Quantificar NO plasmático e cardíaco e avaliar os efeitos do tratamento sobre a lesão cardíaca dos animais dos grupos controles e experimentais.

4 ARTIGO

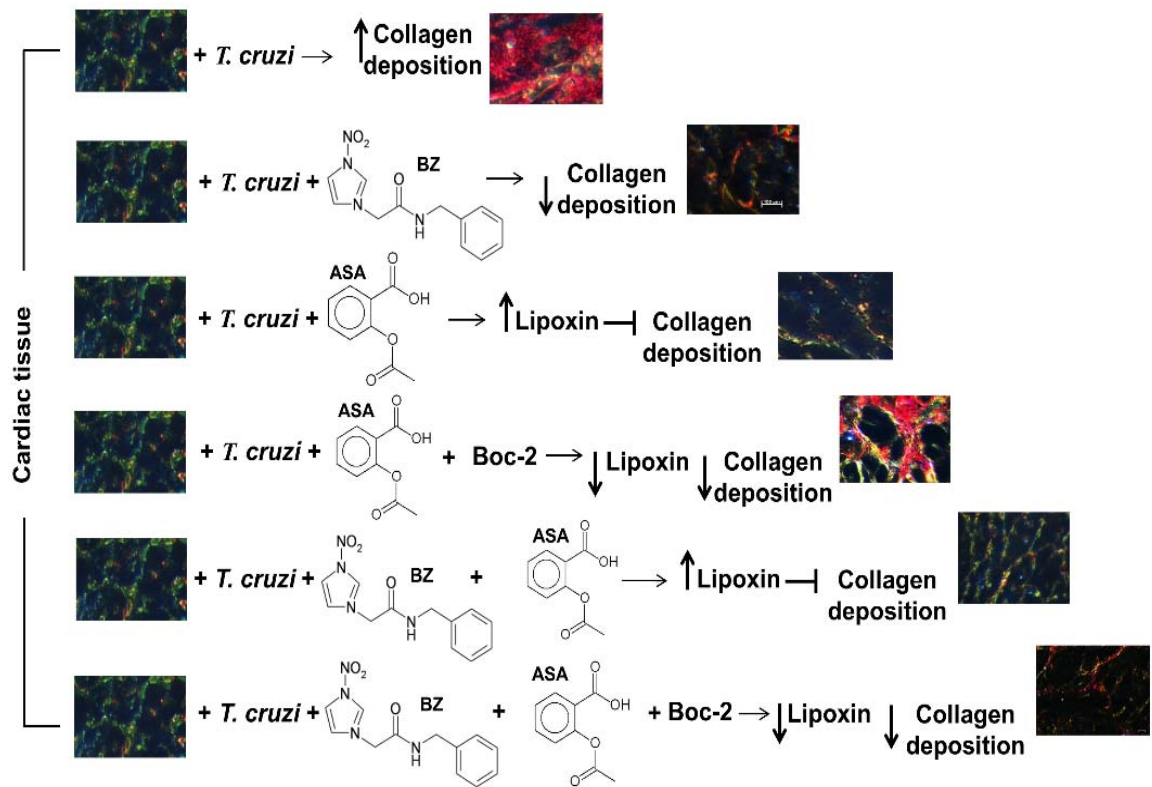
Combination Therapy Using Benznidazole and Aspirin During the Acute Phase of Experimental Chagas Disease Prevents Cardiovascular Dysfunction and Decreases Typical Cardiac Lesions of Chronic Phase

Rito Santo Pereira, † Aparecida Donizette Malvezi,† Maria Isabel Lovo-Martins,† Bruno Fernando Cruz Lucchetti,□ Jussevania Pereira Santos,‡ Eliandro Reis Tavares, ‡ Waldiceu Aparecido Verri Júnior,§ Eduardo José de Almeida Araújo,# Lucy Megumi Yamauchi Lioni, ‡ Sueli Fumie Yamada Ogatta, ‡ Marli Cardoso Martins Pinge and □ Phileno Pinge-Filho†*

†Laboratório de Imunopatologia Experimental, □Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular, ‡Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos §Laboratório de Pesquisa em Dor, Neuropatia e Inflamação, #Laboratório de Neurogastroenterologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP, 86057-970 Londrina, Paraná, Brazil

AUTHOR INFORMATION

*Corresponding author: Phileno Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br, Tel: + 55 43 3371-4978



ABSTRACT: Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is one of the main causes of death due to cardiomyopathy and heart failure in Latin American countries. The treatment of Chagas disease is directed at eliminating the parasite, decreasing the probability of cardiomyopathy, and disrupting the disease transmission cycle. Benznidazole (BZ) and nifurtimox (Nfx) are recognized as effective drugs for the treatment of Chagas disease by the World Health Organization, but both have high toxicity and limited efficacy, especially in the chronic disease phase. At low doses, aspirin (ASA) has been reported to protect against *T. cruzi* infection. We evaluated the effectiveness of BZ in combination with ASA at low doses during the acute disease phase and evaluated cardiovascular aspects and cardiac lesions in the chronic phase. ASA treatment prevented the cardiovascular dysfunction (hypertension and tachycardia) and typical cardiac lesions. Moreover, BZ+ASA-treated mice had a smaller cardiac fibrotic area than that in BZ-treated mice. These results were associated with an increase in the number of eosinophils and reticulocytes and level of nitric oxide in the plasma and cardiac tissue of ASA-treated mice relative to respective controls. These effects of ASA and BZ+ASA in chronically infected mice were inhibited by pretreatment with the LXA₄ receptor antagonist, Boc-2, indicating that the protective effects of ASA are mediated by ASA-triggered lipoxin. These results emphasize the importance of exploring new drug combinations for treatments of acute phase of Chagas disease that are beneficial for chronic patients.

KEYWORDS: aspirin, benznidazole, cardiovascular parameters, Chagas disease, lipoxin, therapy

INTRODUCTION

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is the main cause of death due to cardiomyopathy and heart failure in Latin American countries¹. Currently, the treatment for Chagas disease involves the administration of benznidazole (BZ) or nifurtimox (Nfx)². Both are very toxic and have limited efficacy, especially in the chronic phase of the disease³. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces the parasite load, but does not prevent chronic cardiac lesions⁴. Recently, a new strategy of combination drug therapy has emerged to improve BZ-based treatment⁵⁻⁷. This approach could improve BZ treatment efficacy and decrease drug resistance and toxicity⁸⁻⁹.

Studies have shown that eicosanoids produced during acute infection may act as immunomodulators that aid in the transition to and maintenance of the chronic phase of Chagas disease¹⁰. Treatment with aspirin (ASA), which is a non-selective and irreversible inhibitor of cyclooxygenases COX-1 and COX2, before *T. cruzi* infection¹¹ or during the chronic phase of Chagas disease¹²⁻¹³ alters the natural course of the disease, which suggests that ASA administration could serve as a new therapeutic approach for Chagas disease¹⁴⁻¹⁸.

However, to the best of our knowledge, there are no experimental studies on the combination of ASA and BZ in vivo. Therefore, in this study, we evaluated the efficacy of the combination of BZ and ASA in mice chronically infected with a BZ-partially-resistant (Y) *T. cruzi* strain, to further support the clinical evaluation of combination therapies in the early stage of *T. cruzi* infection.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Animal handling and experimental procedures were carried out in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals proposed by the Brazilian National Council of Animal Experimentation (COBEA). The study protocol was approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of Londrina State University (Approval Number: CEUA n° 4628.2016.40). Every effort was made to minimize pain and suffering to the animals used in these experiments.

Animals

Six-to-eight-week-old, 20–25 g male BALB/c mice were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Research, University of Campinas (Campinas, Brazil). Swiss male mice were obtained from breeding colonies in the animal facility of the Center for Biological Sciences, Londrina State University (Paraná, Brazil). The mice were maintained in an animal house in the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, under a controlled environment temperature (21-23 °C) and with 12-h d/night cycle. The mice were fed a commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and sterilized water *ad libitum*. All the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and euthanized by cervical dislocation.

Compounds

Benznidazole (*N*-Benzyl-2-nitro-1*H*-imidazole-1-acetamide) tablet was purchased from Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE,

Brazil). ASA and Direct red 80 were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Boc-2 was purchased from MP Biomedicals (Solon, OH, USA). Benznidazole tablets were crushed and suspended in distilled water, whereas ASA was directly dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Labsynth, Diadema, São Paulo, Brazil), at a final DMSO concentration of less than 0.5% (v/v). Boc-2 was suspended in sterile saline.

Parasites and Infection Protocol

Trypanosoma cruzi strain Y of the *T. cruzi* I lineage¹⁹, was maintained by weekly intraperitoneal (i.p.) inoculation of blood trypomastigotes of *T. cruzi* into Swiss mice. When required for analysis, parasite-rich blood was collected from these inoculated Swiss mice and appropriately diluted with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). BALB/c mice were infected via an i.p. injection of 500 blood-derived trypomastigotes. The control group was injected with the same volume of sterile PBS (pH 7.2). Parasitemia was monitored by counting blood-borne trypomastigotes in 5 μ L of fresh blood collected from the tail vein²⁰. At 3 d post infection (dpi), direct microscopic visualization of circulating trypomastigotes in the peripheral blood of mice confirmed *T. cruzi* infection (Figure 1A).

Treatment Schemes

The mice were divided into the following 10 groups: uninfected (NI), uninfected treated with BZ (NI-BZ), uninfected treated with ASA (NI-ASA), uninfected treated with BZ+ASA (NI-BZ+ASA), infected untreated (I-NT), infected treated with BZ (I-BZ), infected treated with ASA (I-ASA), infected treated with BZ and ASA (I-BZ+ASA), infected treated with ASA and Boc-2 (I-ASA+Boc-2), and infected treated with BZ, ASA, and Boc-2 (I-BZ+ASA+Boc-2).

The treatments were initiated at 2 dpi; six mice per treatment group were administered 25 mg/kg BZ, ASA, or a combination of BZ and ASA by oral gavage once per day for 30 d (Figure 1A). The lipoxin LXA₄ receptor antagonist Boc-2 (10 μ M/kg/mouse)^{16, 21} was i.p. injected at 1 dpi every 48 h for 7 d, before aspirin-containing therapies (Figure 1A). The drugs were prepared as described above, and each mouse was administered 0.1 mL of each drug.

Non-invasive Cardiovascular Measurements

Heart rate (HR) and mean arterial blood pressure (MAP) of conscious mice in all treatment groups were measured using the CODA Mouse & Rat Tail-Cuff Blood Pressure System (KENT Scientific Co., CT, USA). The measurements were taken at 171, 173, 175, 177, and 180 dpi (Figure 1A), and the mean value was calculated for each mouse²².

Hematological Analysis

Whole blood was collected from mice under ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) anesthesia using intracardiac puncture, and aliquoted into tubes containing 1 mg/mL sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), as the anticoagulant. Platelets, leukocytes, reticulocytes, eosinophils, and neutrophils were counted using standard methods²³⁻²⁵. Hematocrits were determined by spinning down capillary tubes filled with blood using a microcentrifuge (Novatecnica, Piracicaba, São Paulo, Brazil). The total number of nucleated cells collected was quantified by manual hemocytometer count. All blood analyses and cell counts were performed at 180 dpi.

Quantification of Nitrite level in Plasma and Cardiac Tissue

At 180 dpi, the anesthetized mice were euthanized, and the heart tissue was sampled for immune and histopathological assays. The heart was halved; one half was fixed in 10% formaldehyde prepared in 0.1 M PBS (pH 7.3) for histopathological analysis and the other half was used for determination of nitrite levels and quantification of *T. cruzi* parasite load by qPCR. Nitrite level in the plasma and cardiac tissue was determined using the cadmium-cooper system followed by Griess reaction, as described previously²⁶ with some modifications proposed by Panis, et al.²⁷.

RT-qPCR

Real time qPCR (RT-qPCR) was performed to determine the tissue parasite burden in the control and *T. cruzi*-infected and treated mice. The heart tissue was weighed and washed with PBS. The genomic DNA was isolated using a lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2 mg/mL proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA), followed by phenol–chloroform extraction. The samples were mechanically homogenized (Ultra Stirrer; Scientific SDN BHD, Seri Kembangan, Malaysia), heated at 55°C for 12 h, and extracted twice with phenol:chloroform:isoamyl alcohol solution (25:24:1). Cold absolute ethanol (Merck)—two times the volume of the aqueous phase—was added into the extracted sample, which was stored at -20°C for 12 h. Thereafter, the sample was centrifuged for 10 min at 10 000 × g, washed with 70% ethanol, dried at room temperature, and resuspended in ultrapure water. Total DNA concentration was determined using a spectrophotometer (Synergy HT; Biotek, USA). The RT-qPCR assay was performed on the Rotor-Gene Q 5-Plex apparatus (Qiagen, Germany) using a 20-μL reaction mixture containing 100 ng total DNA, 1 μM TFZ-F (5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3') and TFZ-R (5'-CCAAGCGGATAGTTCAGG-3') oligonucleotides²⁸, and Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG with ROX reagent (Invitrogen Corporation, New York, USA), according to the manufacturer's recommendations. The amplification conditions were as follows: an initial step at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles at 95°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by dissociation curve construction, at 60–95°C (0.5°C/s). The cardiac tissue parasite burden was calculated using a standard curve constructed with DNA obtained from culture samples of *T. cruzi* epimastigotes.

Polarized Microscopy of Picrosirius Red-Stained Collagen

To examine cardiac fibrosis, the heart tissue samples were fixed with 10% buffered formalin solution, dehydrated, cleared, and embedded in Paraplast (Sigma, St. Louis, MO, USA). The embedded tissue blocks were cut into 3-μm-thick sections and stained with Direct red 80 (Sigma) to visualize collagen and section were chosen at random and evaluated at 400x magnification, resulting in the analysis of a total area of 74931 μm² of myocardium²⁹. Polarized micrographs were obtained using the Axio Zeiss Photon Microscope (Oberkochen, Germany). Collagen defined in the polarized micrographs was measured using Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

Statistical analysis

Data were assessed using the analysis of variance and differences between mean values were determined using Tukey or Dunnett's multiple comparison post-tests. A log-rank (Mantel–Cox) test was used to compare the survival curves.

Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software®, La Jolla, USA).

RESULTS

Untreated infected mice (I-NT) presented high parasitemia, which peaked at 9 dpi (Figure 1B). As expected, BZ treatment reduced parasitemia, whereas ASA reduced the load of parasites in the blood after 9 d, and parasitemia levels among the ASA, BZ alone, or BZ+ASA treatment and NT groups were not significantly different at 13–31 dpi (Figure 1B). Interestingly, the peak parasitemia level in mice treated with BZ or BZ+ASA (compared with that in the I-NT mice) was consistently lower than that in mice treated with ASA alone, confirming the efficiency of BZ therapy in the acute phase of infection. All mice treated with BZ alone or in combination with ASA survived for 31 d after infection and chronification. Mice untreated or treated with ASA alone presented 76% and 84% survival rate during the acute phase, respectively (Figure 1C). Parasites were not detected in the blood of untreated or treated chronically infected mice (data not shown).

By day 180 p.i., I-BZ+ASA group showed a significant reduction in cardiac parasite number shown by RT qPCR compared with either I-NT and I-BZ group (Figure 1F, Dunnett's multiple comparisons test: $p < 0.05$). The group of infected mice treated with BZ also presented a reduction in the parasite load in the cardiac tissue compared to the untreated group. Surprisingly, infected mice treated with ASA showed the lowest parasite load in cardiac tissue compared to the untreated group or treated with BZ but was not statistically distinguishable from BZ+ASA group (Figure 1F).

We treated the mice with an LXA₄ receptor antagonist (Boc-2) from 1 d post infection every 48 h for 7 d, before initiating the ASA treatment (Figure 1A). Then, the effects of ASA+Boc-2 or BZ+ASA+Boc-2 treatments were compared with those without Boc-2 pretreatment. We found that the protective effects of ASA and BZ+ASA (Figure 1B and 1C) in infected mice were inhibited by Boc-2 pretreatment, which was confirmed by an increase in parasitemia (Figure 1D), a decrease in mice survival rate (Figure 1E), and an increase in cardiac parasitism (Figure 1F).

The I-NT mice ($n = 6$ mice/group) exhibited tachycardia (Figure 2A) compared with NI mice (I-NT = 539 ± 1 bpm vs. NI = 503 ± 1 bpm, $p < 0.0001$). Benznidazole treatment increased the HR in NI mice (Figure 2A) compared with that in the NI group mice not treated with BZ (NI-BZ = 538 ± 3 bpm vs. NI = 503 ± 1 bpm, $p < 0.001$). However, both ASA alone and BZ+ASA combination treatments did not change the HR in these mice (Figure 2A). Treatment of infected mice with BZ increased the HR compared with that in NT and infected mice (I-BZ = 602 ± 6 bpm vs. I-NT = 539 ± 1 bpm, $p < 0.0001$). Aspirin treatment reduced the HR in infected mice compared with that in the I-NT (I-ASA = 490 ± 3 bpm vs. I-NT = 539 ± 1 bpm, $p < 0.0001$) and I-BZ (I-ASA = 490 ± 3 bpm vs. I-BZ = 602 ± 6 bpm, $p < 0.0001$) group mice. The BZ+ASA treatment exerted an intermediate effect with respect to increasing the HR in infected mice, which was similar to that in the I-NT group mice (Figure 2A).

The MAP in the I-NT mice was increased compared with that in the NI mice (117 ± 1 mmHg vs. 103 ± 1 mmHg, $p < 0.0001$) (Figure 2B), and treatment with BZ did not significantly change the MAP in these groups (103 ± 1 mmHg vs. 103 ± 1 mmHg, $p > 0.9999$). On the contrary, treatment of NI mice with ASA alone or BZ+ASA decreased the MAP compared with that in the NI and NI-BZ mice (NI-ASA = 95 ± 0.375 mmHg vs. NI = 103 ± 1 mmHg, $p < 0.0001$; NI-ASA vs. NI-BZ = 103 ± 1 mmHg, $p < 0.001$; NI-BZ+ASA = 96 ± 2 mmHg vs. NI, $p < 0.0001$; NI-BZ+ASA vs. NI-

BZ, $p < 0.01$; Figure 2B). Treatment of infected mice with BZ did not alter the MAP compared with that in the I-NT mice (116 ± 0.213 mmHg vs. 117 ± 1 mmHg, $p > 0.05$); however, ASA or BZ+ASA treatment of infected mice decreased the MAP compared with that in the I-NT or I-BZ mice (I-ASA = 104 ± 0.222 mmHg vs. I-NT = 117 ± 1 mmHg; I-ASA vs. I-BZ = 116 ± 0.213 mmHg; I-BZ+ASA = 100 ± 1 mmHg vs. I-NT; I-BZ+ASA vs. I-BZ, $p < 0.0001$; Figure 2B).

Infection and treatment significantly affected eosinophils and neutrophils, as indicated by a significant increase in these cell populations ($p < 0.05$) at 180 dpi in BZ- and BZ+ASA-treated mice compared with that in the NI mice (Figures 2D, 2E). Surprisingly, we observed a significant increase in reticulocytes (Figure 2C, $p < 0.001$) and eosinophils (Figure 2D, $p < 0.001$), but a reduction in neutrophils in the I-ASA mice (Figure 2E). No significant differences were observed in the hematocrit level, platelet and leukocyte counts at 180 dpi (data not shown).

Next, we evaluated the cardiovascular and hematological parameters in infected mice treated with Boc-2 before mono or combination therapy. As shown in Figure 2, the HR in the I-ASA mice decreased relative to that of the I-NT mice (I-ASA = 490 ± 3 bpm vs. I-NT = 539 ± 1 bpm, $p < 0.0001$). This effect was inhibited by Boc-2 pretreatment of mice (I-ASA = 490 ± 3 bpm vs. I-ASA + Boc-2 = 544 ± 5 bpm, $p < 0.0001$; Figure 2A). The ASA+BZ, ASA+Boc-2, and ASA+BZ+Boc-2 combination treatments did not change the HR compared with that of I-NT mice (Figure 2A). The MAP was elevated in I-NT mice and attenuated by treatment with ASA alone (117 ± 1 mmHg vs. 104 ± 0.2 mmHg, $p < 0.01$, respectively) or BZ+ASA (117 ± 1 mmHg vs. 100 ± 1 mmHg, $p < 0.05$, respectively; Figure 2B). Notably, Boc-2 pretreatment reversed the hypotensive effect of ASA alone and BZ+ASA treatments (Figure 2B).

Hematological evaluation revealed that pretreatment with Boc-2 did not alter the platelet and leukocyte counts, and hematocrit level (data not shown), but it reversed the increase in reticulocytes (Figure 2C) and eosinophils provoked by ASA (Figure 2D). Furthermore, it reduced the effect of ASA on neutrophil count (Figure 2E).

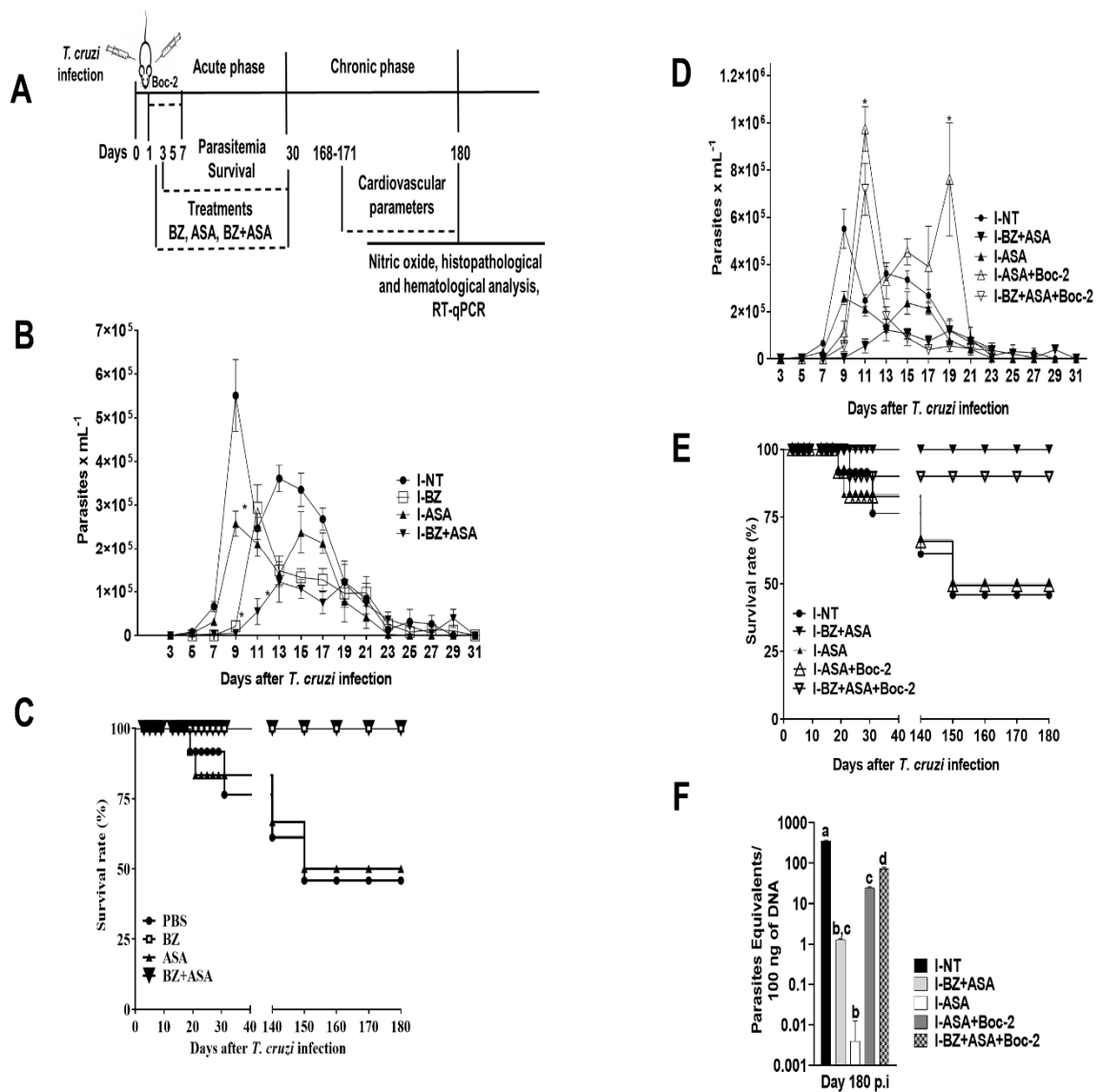


Figure 1. Infection course and response to treatment in BALB/c mice infected with 500 trypomastigotes of *T. cruzi*. (A) The mice were treated daily with 25 mg/kg benznidazole (BZ), aspirin (ASA) or a combination of BZ and ASA by oral gavage at 2 d post infection for 30 d. Antagonist Boc-2 (10 μ M/kg) was intraperitoneally injected from 1 d post infection every 48 h for 7 d before ASA treatment. Cardiovascular parameters (heart rate (HR) and mean arterial pressures (MAP) were measured using CODA (Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System) between 171 and 180 d post infection. At 180 d post infection, nitrite level in the plasma and cardiac tissue was quantified. *Trypanosoma cruzi* parasite load in the heart of treated and untreated mice was quantified by RT-qPCR. (B and D) Parasitemia level in the acute phase of infection, (C and E) mice survival rate, and (F) cardiac parasite load measured by RT-qPCR. * $p < 0.05$ was used to compare the results against the untreated infected group (I-NT). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$, two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons post-test).

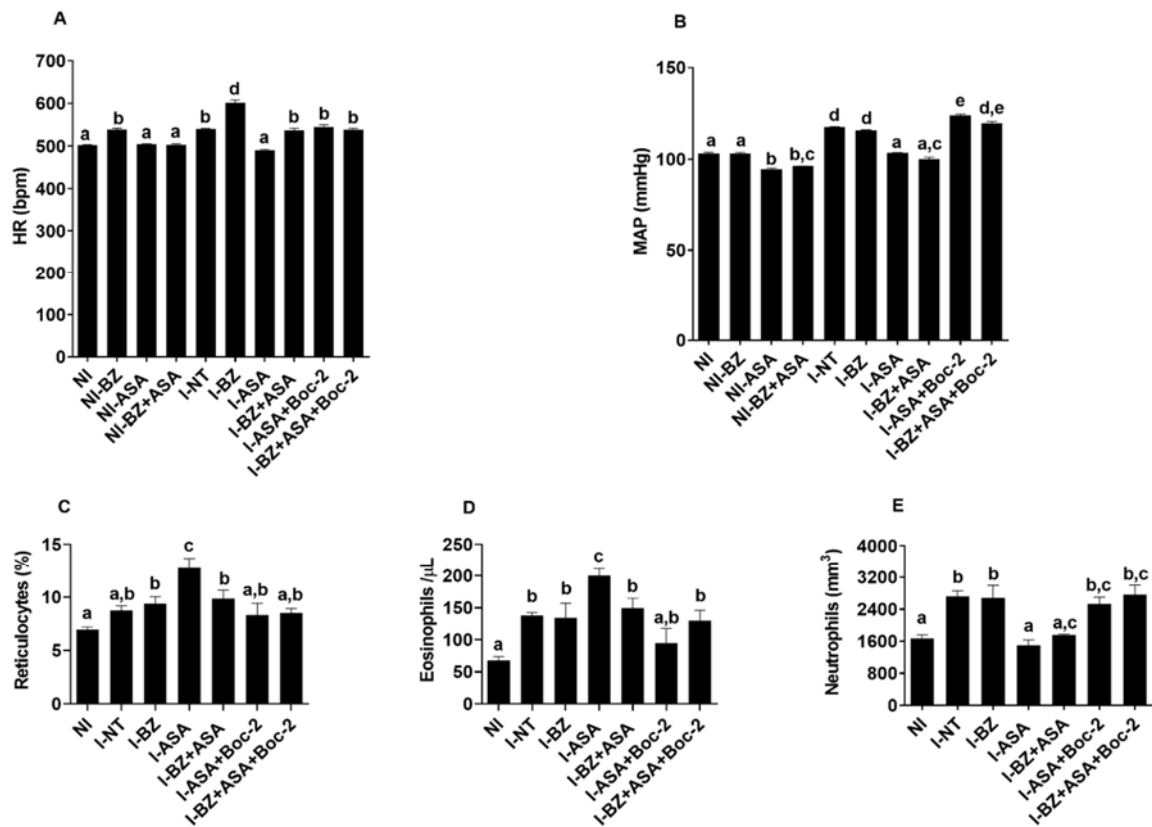


Figure 2. Cardiovascular and hematological parameters in mice chronically infected with *T. cruzi* in response to treatment with benznidazole (BZ) or combination treatment with aspirin (ASA) in the acute phase of infection. Antagonist Boc-2 (10 $\mu\text{M}/\text{kg}$) was intraperitoneally injected from 1 d post infection every 48 h for 7 d before ASA treatment. (A) Heart rate (HR) and (B) mean arterial pressure (MAP) in response to different treatments in uninfected and infected mice. The HR and MAP were measured using CODA (Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System). Hematological parameters in uninfected (NI) and *T. cruzi*-infected mice untreated or treated with BZ, ASA, and BZ+ASA at 180 d post infection: (C) reticulocytes, (D) eosinophils and (E) neutrophils. Means depicted by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, two-way ANOVA with Tukey post-test).

The effects of the combination treatment in infected mice were evaluated and compared with those in infected mice treated with BZ or ASA alone and NI mice. The fibrotic area in the heart of infected mice was larger than that in NI mice (Figure 3). Benznidazole treatment reduced the fibrotic area in infected mice, whereas ASA treatment decreased typical cardiac tissue injuries that are associated with chronic *T. cruzi* infection, which were similar to that in the heart muscle of NI mice. Moreover, the BZ+ASA-treated mice had smaller fibrotic areas than those in BZ-treated mice.

At 180 dpi, mice treated previously with Boc-2 showed more fibrotic area in the heart of infected mice than treated only with ASA (Figure 3). In this sense, we identified that the intensity of heart damage was consistent with increased levels of neutrophils (Figure 2E).

As expected, *T. cruzi* infection triggered an elevation in circulating NO (Figure 4A) and NO in heart tissue (Figure 4B). Notably, compared to the untreated infected mice, BZ treated mice was not statistically distinguishable in both plasma and cardiac

tissue (Figure 4A and Figure 4B, $p > 0.05$). On the other hand, a significant increase in circulating NO as in cardiac tissue was observed in ASA-treated mice compared to the untreated infected or BZ-treated infected mice (Figure 4A and Figure 4B, $p < 0.05$). Similarly, significantly NO increased was observed in plasma as in the heart in BZ + ASA treated mice compared to that in the mice untreated infected or BZ treated infected. Moreover, Boc-2 diminished NO levels in plasma and tissue cardiac when was combined with ASA or BZ (Figure 4A and 4B, respectively).

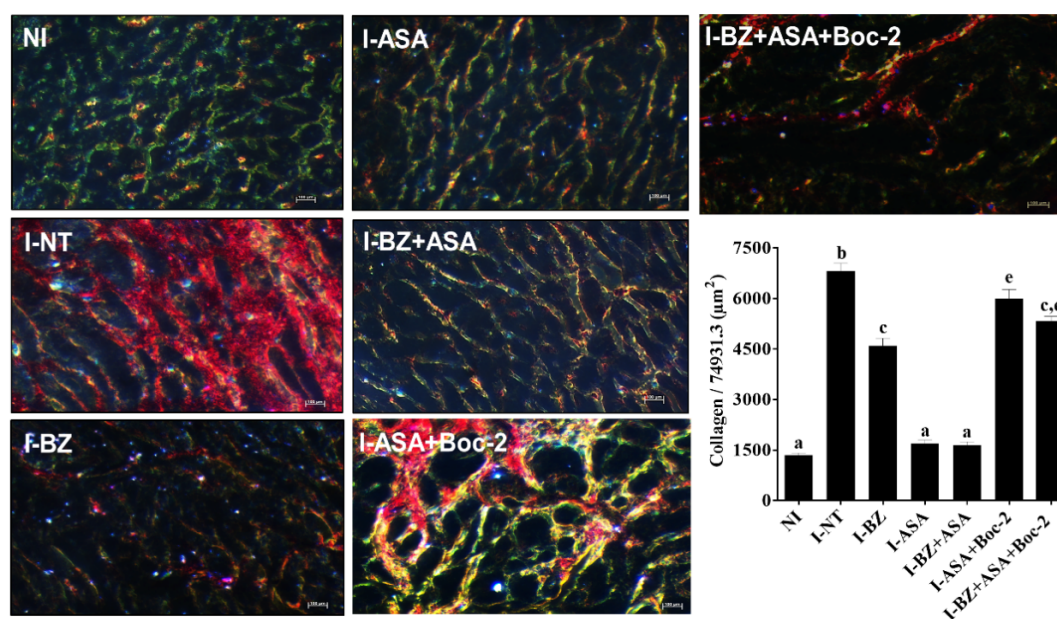


Figure 3. Effect of benznidazole+aspirin (BZ+ASA) combination treatment on chronic cardiac lesions. BALB/c mice were inoculated with 500 trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* Y strain by intraperitoneal injection and treated with daily doses of 25 mg/kg BZ or ASA alone or in combination for 30 consecutive days and euthanized at 180 d post infection. The antagonist Boc-2 (10 µM/kg) was administered via intraperitoneal injection from 1 d post infection every 48 h for 7 d, before ASA treatment. After 180 d post injection, the mice were euthanized. Uninfected control (NI) group mice were also evaluated. Fibrotic areas in the heart muscle of treated and uninfected mice can be observed in histological sections of the hearts imaged at 400× magnification that are representative of picrosirius red-staining patterns. I-NT= infected and untreated; I-BZ = infected treated with BZ; I-ASA = infected treated with ASA; I-BZ+ASA = infected treated with BZ/ASA. Means depicted with different letters are significantly different ($p < 0.05$, two-way ANOVA with Tukey post-test).

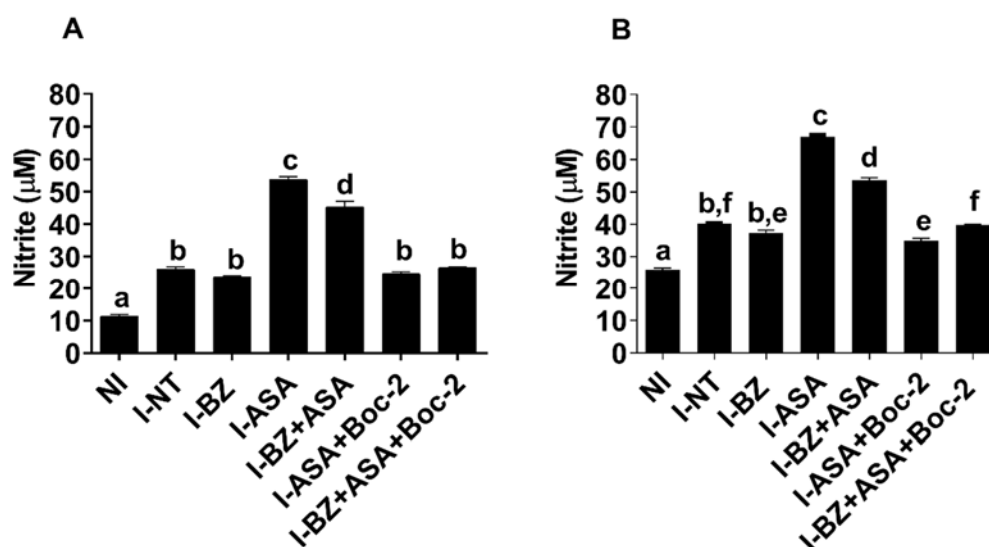


Figure 4. Nitrite level in response to treatment with benznidazole (BZ) or combined treatment with aspirin (ASA) in mice infected with *T. cruzi*. The antagonist Boc-2 (10 µM/kg) was administered via intraperitoneal injection from 1 d post infection every 48 h for 7 d, before ASA treatment. After 180 d post injection, the mice were euthanized. Uninfected control (NI) group mice were also evaluated. NO was determined by measuring nitrite levels in plasma (A) and cardiac tissue (B) using the cadmium-cooper system followed by Griess reaction. The results are expressed as means \pm SEM from 5 animals per group and are representative of 2 independent experiments. Means not sharing a letter are significantly different ($p < 0.05$, 2-way ANOVA with Tukey post-test).

DISCUSSION

Treatment of chronic *T. cruzi* infection is challenging because of several limitations of the available drugs, such as BZ and Nfx, including low efficacy and toxicity. Recent studies have shown that new treatment strategies, including combinations of drugs with different mechanisms of action, may improve therapeutic efficacy and reduce adverse effects^{6-8, 30-33} Moreover, *T. cruzi* infection is restricted to selected tissues, where very low levels of intracellular parasitic forms hinder the direct action of BZ on the parasite³⁴⁻³⁵.

The results of the present study showed that the administration of 25 mg/kg/d BZ during the acute disease phase was effective in alleviating the symptoms of *T. cruzi* infection in susceptible mice^{7, 36}. This was reflected in the rate of survival, decreased in the parasitemia during the acute phase and reduction of cardiac parasitism and heart damage in chronic infected mice compared to that in the untreated group after monotherapy with BZ. Cardiovascular parameters as HR and MAP were described in Swiss mice, when we investigated the effect of treadmill training on the acute phase of *T. cruzi* infection²². However, our data show that in the chronic phase, the animals presented hypertension and tachycardia compared to the uninfected animals, and that the treatment during the acute phase, specifically with BZ, elevate the heart rate and did not changed the high blood pressure found in the animals.

Treatment with BZ did not alter reticulocyte, eosinophil, and neutrophil counts, and plasma and cardiac nitrite levels compared with those in the NI mice. However, we observed a decrease in parasite load in the cardiac tissue in mice treated with BZ.

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate hematological and cardiovascular parameters such as HR and MAP in chronically infected BALB/c mice treated with BZ, and the results reinforce the toxicity and efficacy of BZ ³⁵.

The acute phase of Chagas disease is characterized by immunosuppression induced by *T. cruzi* parasite to evade the host immune response. This immunosuppressive state is mediated in part by prostaglandins ³⁷⁻³⁸, nitric oxide (NO) and cytokines ^{37, 39}. In fact, increased circulating levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), thromboxane A₂ (TXA₂), and prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) have been reported in mice infected with *T. cruzi* ⁴⁰, and during the acute phase, macrophages and spleen cells from *T. cruzi*-infected mice produce high levels of PGE₂ and NO ^{37, 41}. Thus, the inhibition of the host cyclooxygenase (COX) enzyme occurred naturally as a therapeutic potential in Chagas disease^{10, 14-16}. It has been previously reported that COX-2 acetylation by ASA modifies its activity, promoting the synthesis of 15-epi-LXA₄, a lipid involved in the resolution of inflammation acts as an anti-inflammatory molecule in the acute phase of the *T. cruzi* infection ³⁶. Therefore, we verified if the effects observed in our experimental model were mediated by LXA₄.

In the present study, the administration of ASA at a low dose (25 mg/kg) in the acute phase of infection decreased cardiac parasitism and heart damage in chronically infected mice compared with those in the IN or BZ-treated mice. However, the ASA group could not be distinguished from the BZ+ASA group. In addition, ASA treatment decreased the HR and hypertension in infected animals. These findings help better understand the relationship between chagasic heart and cardiovascular functions.

In the present study, in mice treated with ASA, there was an increase in the percentage of reticulocytes. This can be partially explained by the upregulation of nitric oxide production and the consequent increase in oxidative stress during bone marrow activity ⁴². The increase in eosinophil count with ASA treatment further explains the decrease in parasites in the heart of chronically infected mice ⁴³⁻⁴⁵.

We also found that ASA exhibited therapeutic effect at 25 mg/kg/d concentration and that this effect was inhibited by pretreatment with Boc-2. Moreover, the number of neutrophils increased with Boc-2 pretreatment, which was associated with higher fibrosis in the cardiac tissue. In fact, neutrophils may regulate *T. cruzi* experimental infection and determine susceptibility and resistance to infection ⁴⁶. Furthermore, neutrophils and monocytes contribute to inflammation and fibrosis associated with Chagas cardiomyopathy via the production of metalloproteinases and cytokines, respectively ⁴⁷. This phenomenon possibly correlates with the increased level of 15-epi-LXA₄—known as “aspirin-triggered lipoxin”—upon treatment with low dose ASA, which is consistent with the results of Molina-Berríos et al.³⁶.

The results of the present study indicate that early therapeutic interventions with ASA in acute phases could be crucial for defining the course of incipient pathological process in *T. cruzi* infection, which might help predict future damage to the heart in chronically infected animals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Andréia Carla Eugénio Pupim by technical support in histological analyses. The present study was supported by grants from Fundação Araucária - chamada de projeto 09/2016 Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada - Conv. 001/2017 - Protocolo 47.396 - SIT. 31675, Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES. PPF, MCMP, MILM, WAVJ, LMYL, SFYO are research fellows of CNPq. BFCL and ERT are research

fellows of CAPES. RSP was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique.

REFERENCES

1. Garcia, S.; Ramos, C. O.; Senra, J. F.; Vilas-Boas, F.; Rodrigues, M. M.; Campos-de-Carvalho, A. C.; Ribeiro-Dos-Santos, R.; Soares, M. B., Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49* (4), 1521-8. DOI: 10.1128/AAC.49.4.1521-1528.2005.
2. Silva, A. C. C.; Brelaz-de-Castro, M. C. A.; Leite, A. C. L.; Pereira, V. R. A.; Hernandez, M. Z., Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 873. DOI: 10.3389/fphar.2019.00873.
3. Morilla, M. J.; Romero, E. L., Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine (Lond)* **2015**, *10* (3), 465-81. DOI: 10.2217/nnm.14.185.
4. Caldas, I. S.; Talvani, A.; Caldas, S.; Carneiro, C. M.; de Lana, M.; da Matta Guedes, P. M.; Bahia, M. T., Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res* **2008**, *103* (2), 413-21. DOI: 10.1007/s00436-008-0992-6.
5. Puente, V.; Demaria, A.; Frank, F. M.; Batlle, A.; Lombardo, M. E., Anti-parasitic effect of vitamin C alone and in combination with benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, *12* (9), e0006764. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006764.
6. Diniz Lde, F.; Urbina, J. A.; de Andrade, I. M.; Mazzeti, A. L.; Martins, T. A.; Caldas, I. S.; Talvani, A.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T., Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (8), e2367. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002367.
7. Cevey, A. C.; Mirkin, G. A.; Penas, F. N.; Goren, N. B., Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2016**, *6* (1), 12-22. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2015.12.001.
8. Batista, D. d. G. J.; Batista, M. M.; de Oliveira, G. M.; Britto, C. C.; Rodrigues, A. C. M.; Stephens, C. E.; Boykin, D. W.; Soeiro, M. d. N. C., Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* in vivo. *PloS one* **2011**, *6* (7), e22155.
9. Ribeiro, I.; Sevcsik, A. M.; Alves, F.; Diap, G.; Don, R.; Harhay, M. O.; Chang, S.; Pecoul, B., New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, *3* (7), e484. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000484.
10. Machado, F. S.; Mukherjee, S.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B.; Ashton, A. W., Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* **2011**, *76*, 1-31. DOI: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3.
11. Silvero-Isidre, A.; Morinigo-Guayuan, S.; Meza-Ojeda, A.; Mongelos-Cardozo, M.; Centurion-Wenninger, C.; Figueredo-Thiel, S.; Sanchez, D. F.; Acosta, N., Protective effect of aspirin treatment on mouse behavior in the acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* **2018**, *117* (1), 189-200. DOI: 10.1007/s00436-017-5693-6.

12. Massocatto, C. L.; Martins Moreira, N.; Muniz, E.; Marques de Araujo, S.; Pinge-Filho, P.; Rossi, R. M.; de Almeida Araujo, E. J.; de Mello Goncales Sant'ana, D., Treatment with low doses of aspirin during chronic phase of experimental Chagas' disease increases oesophageal nitrergic neuronal subpopulation in mice. *Int J Exp Pathol* **2017**, *98* (6), 356-362. DOI: 10.1111/iep.12259.
13. Massocatto, C. L.; Moreira, N. M.; Muniz, E.; Pinge-Filho, P.; Rossi, R. M.; Araujo, E. J.; Sant'Ana, D. M., Aspirin prevents atrophy of esophageal nitrergic myenteric neurons in a mouse model of chronic Chagas disease. *Dis Esophagus* **2017**, *30* (2), 1-8. DOI: 10.1111/dote.12449.
14. Mukherjee, S.; Machado, F. S.; Huang, H.; Oz, H. S.; Jelicks, L. A.; Prado, C. M.; Koba, W.; Fine, E. J.; Zhao, D.; Factor, S. M.; Collado, J. E.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B.; Ashton, A. W., Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One* **2011**, *6* (2), e16959. DOI: 10.1371/journal.pone.0016959.
15. Hideko Tatakihara, V. L.; Cecchini, R.; Borges, C. L.; Malvezi, A. D.; Graca-de Souza, V. K.; Yamada-Ogatta, S. F.; Rizzo, L. V.; Pinge-Filho, P., Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2008**, *52* (1), 47-58. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x.
16. Malvezi, A. D.; da Silva, R. V.; Panis, C.; Yamauchi, L. M.; Lovo-Martins, M. I.; Zanluqui, N. G.; Tatakihara, V. L.; Rizzo, L. V.; Verri, W. A., Jr.; Martins-Pinge, M. C.; Yamada-Ogatta, S. F.; Pinge-Filho, P., Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Mediators Inflamm* **2014**, *2014*, 580919. DOI: 10.1155/2014/580919.
17. Malvezi, A. D.; Panis, C.; da Silva, R. V.; de Freitas, R. C.; Lovo-Martins, M. I.; Tatakihara, V. L.; Zanluqui, N. G.; Neto, E. C.; Goldenberg, S.; Bordignon, J.; Yamada-Ogatta, S. F.; Martins-Pinge, M. C.; Cecchini, R.; Pinge-Filho, P., Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry into cardiac cells and promotes differential modulation of the inflammatory response. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58* (10), 6157-64. DOI: 10.1128/AAC.02752-14.
18. Carvalho de Freitas, R.; Lonien, S. C. H.; Malvezi, A. D.; Silveira, G. F.; Wowk, P. F.; da Silva, R. V.; Yamauchi, L. M.; Yamada-Ogatta, S. F.; Rizzo, L. V.; Bordignon, J.; Pinge-Filho, P., *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of infection of human monocytes by aspirin. *Exp Parasitol* **2017**, *182*, 26-33. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.09.019.
19. Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; Second Satellite, M., A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2009**, *104* (7), 1051-4. DOI: 10.1590/s0074-02762009000700021.
20. Brener, Z., Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1962**, *4*, 389-96.
21. Pamplona, F. A.; Menezes-de-Lima, O., Jr.; Takahashi, R. N., Aspirin-triggered lipoxin induces CB1-dependent catalepsy in mice. *Neurosci Lett* **2010**, *470* (1), 33-7. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.12.050.
22. Lucchetti, B. F. C.; Zanluqui, N. G.; de Ataide Raquel, H.; Lovo-Martins, M. I.; Tatakihara, V. L. H.; de Oliveira Belem, M.; Michelini, L. C.; de Almeida Araujo, E. J.; Pinge-Filho, P.; Martins-Pinge, M. C., Moderate Treadmill Exercise Training Improves

Cardiovascular and Nitroergic Response and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *Front Physiol* **2017**, *8*, 315. DOI: 10.3389/fphys.2017.00315.

23. Marcondes, M. C.; Borelli, P.; Yoshida, N.; Russo, M., Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* **2000**, *2* (4), 347-52.

24. Lovo-Martins, M. I.; Malvezi, A. D.; da Silva, R. V.; Zanluqui, N. G.; Tatakahara, V. L. H.; Camara, N. O. S.; de Oliveira, A. P. L.; Peron, J. P. S.; Martins-Pinge, M. C.; Fritsche, K. L.; Pinge-Filho, P., Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from *Trypanosoma cruzi*. *Nutr Res* **2017**, *41*, 73-85. DOI: 10.1016/j.nutres.2017.04.007.

25. da Silva, R. V.; Malvezi, A. D.; da Silva Augusto, L.; Kian, D.; Tatakahara, V. L. H.; Yamauchi, L. M.; Yamada-Ogatta, S. F.; Rizzo, L. V.; Schenkman, S.; Pinge-Filho, P., Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *PloS one* **2013**, *8* (7), e68299.

26. Navarro-Gonzalvez, J. A.; Garcia-Benayas, C.; Arenas, J., Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* **1998**, *44* (3), 679-81.

27. Panis, C.; Mazzuco, T. L.; Costa, C. Z.; Victorino, V. J.; Tatakahara, V. L.; Yamauchi, L. M.; Yamada-Ogatta, S. F.; Cecchini, R.; Rizzo, L. V.; Pinge-Filho, P., *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* **2011**, *127* (1), 58-65. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.06.030.

28. Cummings, K. L.; Tarleton, R. L., Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* **2003**, *129* (1), 53-9. DOI: 10.1016/s0166-6851(03)00093-8.

29. Martins, T. A. F.; de Figueiredo Diniz, L.; Mazzeti, A. L.; do Nascimento, Á. F. d. S.; Caldas, S.; Caldas, I. S.; de Andrade, I. M.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T., Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. *PloS one* **2015**, *10* (6), e0128707.

30. Araujo, M. S.; Martins-Filho, O. A.; Pereira, M. E.; Brener, Z., A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* **2000**, *45* (6), 819-24. DOI: 10.1093/jac/45.6.819.

31. Assiria Fontes Martins, T.; de Figueiredo Diniz, L.; Mazzeti, A. L.; da Silva do Nascimento, A. F.; Caldas, S.; Caldas, I. S.; de Andrade, I. M.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T., Benznidazole/itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. *PLoS One* **2015**, *10* (6), e0128707. DOI: 10.1371/journal.pone.0128707.

32. Penitente, A. R.; Leite, A. L.; de Paula Costa, G.; Shrestha, D.; Horta, A. L.; Natali, A. J.; Neves, C. A.; Talvani, A., Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* **2015**, *93* (5), 976-82. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0237.

33. Guedes-da-Silva, F. H.; Batista, D.; Da Silva, C. F.; Pavao, B. P.; Batista, M. M.; Moreira, O. C.; Souza, L. R. Q.; Britto, C.; Rachakonda, G.; Villalta, F.; Lepesheva, G. I.; Soeiro, M. N. C., Successful Aspects of the Coadministration of Sterol 14alpha-Demethylase Inhibitor VFV and Benznidazole in Experimental Mouse

Models of Chagas Disease Caused by the Drug-Resistant Strain of *Trypanosoma cruzi*. *ACS Infect Dis* **2019**, *5* (3), 365-371. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00253.

34. Urbina, J. A.; Docampo, R., Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* **2003**, *19* (11), 495-501.

35. Perin, L.; Moreira da Silva, R.; Fonseca, K. D.; Cardoso, J. M.; Mathias, F. A.; Reis, L. E.; Molina, I.; Correa-Oliveira, R.; Vieira, P. M.; Carneiro, C. M., Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Benznidazole after Oral Administration in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**, *61* (4). DOI: 10.1128/AAC.02410-16.

36. Molina-Berrios, A.; Campos-Estrada, C.; Henriquez, N.; Faundez, M.; Torres, G.; Castillo, C.; Escanilla, S.; Kemmerling, U.; Morello, A.; Lopez-Munoz, R. A.; Maya, J. D., Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A(4)-mediated effect. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (4), e2173. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002173.

37. Pinge-Filho, P.; Tadokoro, C. E.; Abrahamsohn, I. A., Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* **1999**, *193* (1), 90-8.

38. Michelin, M. A.; Silva, J. S.; Cunha, F. Q., Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* **2005**, *111* (2), 71-9. DOI: 10.1016/j.exppara.2005.05.001.

39. Abrahamsohn, I. A.; Coffman, R. L., Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **1995**, *155* (8), 3955-63.

40. Cardoni, R. L.; Antunez, M. I., Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators Inflamm* **2004**, *13* (4), 235-40. DOI: 10.1080/09637480400003022.

41. Borges, M. M.; Kloetzel, J. K.; Andrade, H. F., Jr.; Tadokoro, C. E.; Pinge-Filho, P.; Abrahamsohn, I., Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett* **1998**, *63* (1), 1-8.

42. Malvezi, A. D.; Cecchini, R.; de Souza, F.; Tadokoro, C. E.; Rizzo, L. V.; Pinge-Filho, P., Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2004**, *41* (1), 69-77. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.01.005.

43. Molina, H. A.; Kierszenbaum, F.; Hamann, K. J.; Gleich, G. J., Toxic effects produced or mediated by human eosinophil granule components on *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* **1988**, *38* (2), 327-34. DOI: 10.4269/ajtmh.1988.38.327.

44. Nakhle, M. C.; de Menezes Mda, C.; Irulegui, I., Eosinophil levels in the acute phase of experimental Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1989**, *31* (6), 384-91. DOI: 10.1590/s0036-46651989000600004.

45. Nascentes, G. A.; Meira, W. S.; Lages-Silva, E.; Ramirez, L. E., Immunization of mice with a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from a bat: predictive factors for involvement of eosinophiles in tissue damage. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2010**, *10* (10), 989-97. DOI: 10.1089/vbz.2009.0185.

46. Luna-Gomes, T.; Filardy, A. A.; Rocha, J. D. B.; Decote-Ricardo, D.; LaRocque-de-Freitas, I. F.; Morrot, A.; Bozza, P. T.; Castro-Faria-Neto, H. C.; DosReis, G. A.; Nunes, M. P., Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e90582.

47. Medeiros, N. I.; Fares, R. C.; Franco, E. P.; Sousa, G. R.; Mattos, R. T.; Chaves, A. T.; Nunes, M. D.; Dutra, W. O.; Correa-Oliveira, R.; Rocha, M. O.;

Gomes, J. A., Differential Expression of Matrix Metalloproteinases 2, 9 and Cytokines by Neutrophils and Monocytes in the Clinical Forms of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* **2017**, *11* (1), e0005284. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005284.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados reforçam que intervenções terapêuticas precoces como associação de BZ+ASA administradas durante fase aguda podem ser cruciais na definição do curso do processo patológico nos camundongos infectados por *T. cruzi*. O tratamento combinado evitou a disfunção cardiovascular (hipertensão e taquicardia) e lesões cardíacas típicas e, estes resultados foram associados ao aumento no nível de óxido nítrico no plasma e tecido cardíaco. Os efeitos da ASA e BZ+ASA em camundongos infectados cronicamente foram inibidos pelo pré-tratamento com antagonista do receptor LXA₄, Boc-2, indicando que os efeitos protetores da ASA foram mediados pela lipoxina desencadeada por ASA. Esses resultados enfatizam a importância de explorar novas combinações de medicamentos para tratamento da fase aguda da doença de Chagas que são benéficas para pacientes crônicos.

REFERÊNCIAS

- AGB. **Support for Neglected Tropical Diseases 2015**. Available from: <http://www.bayer.com/en/chagas-and-african-sleepingsickness.aspx>. [cited 2019 July 18].
- ALONSO-PADILLA, J.; RODRIGUEZ, A. High throughput screening for anti-*Trypanosoma cruzi* drug discovery. **PLoS Negl Trop Dis**, 8(12):e3259, 2014.
- 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**, 03541, 2017.
- ANTINORI, S.; GRANDE, R.; BIANCO, R.; TRAVERSI, L.; COGLIATI, C.; TORZILLO, D.; REPETTO, E.; CORBELLINO, M.; MILAZZO, L.; GALLI, M.; GALIMBERTI, L. High frequency of adverse reactions and discontinuation with benznidazole treatment for chronic Chagas disease in Milan, Italy. **Clin Infect Dis**, 60:1873–5, 2015.
- APT, W. Treatment of Chagas disease. **American Trypanosomiasis Chagas Disease**, 31, 751-62, 2017.
- ARAÚJO, M. S.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E.; BRENER, Z. A. Combination of benznidazol and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45(6):819-824, 2000.
- ASHETON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUSTEIN, V. L.; DERSRUISSEAU, M. S. Tromboxane A2 is a key regulator of phatogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, 204: 929-940, 2007.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. DE F.; MOSQUEIRA, V. C. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opin Investig Drugs**, 23:1225–37, 2014.
- BARBOSA, M. P.; CARMO, A. A.; ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L. Ventricular arrhythmias in Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 48(1):4-10, 2015.
- BARR, S. C.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A.; BENET, L.; MCKERROW, J. H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, 49: 5160–5161, 2005.
- BATISTA, D. DE G. J.; BATISTA, D. D. G. J.; BATISTA, M.; OLIVEIRA, G. M. D.; BRITTO, C. C.; RODRIGUES, A. C. M.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. DE N. C. Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* in vivo. **PLoS One**, 6(7):e22155, 2011.
- BATISTA, D. G.; BATISTA, M. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; DO AMARAL, P. B.; LANNES-VIEIRA, J.; BRITTO, C. C.; JUNQUEIRA, A.; LIMA, M. M.; ROMANHA, A.

J.; SALES JUNIOR, P. A.; STEPHENS, C. E.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for CD treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, 54: 2940–2952, 2010.

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A.; RIBEIRO, A. L. Chagas cardiomyopathy: Clinical presentation and Management in the Americas. **Cardiology Clinics**, 35(1):31-47, 2017.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop**, 156:1-16, 2016.

BESTETTI, R. B. Chagas heart failure in patients from Latin America. **Journal of Cardiac Failure Reviews**, 2(2):90-94, 2016.

BESTETTI, R. Cardiomiopatia chagásica crônica: diagnóstico e tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, 26(4):246-252, 2016.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50(2):67-74, 2008.

BOTONI, F. A.; POOLE-WILSON, P. A.; RIBEIRO, A. L.; OKONKO, D. O.; OLIVEIRA, B. M.; PINTO, A. S.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. JR.; REIS, A. M.; DANTAS, J. B.; FERREIRA, C. S.; TAVARES, W. C. JR.; ROCHA, M. O. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. **American Heart Journal**, 153(4):544 e1-544e8, 2007.

BOUZAHZAH, B.; JELICKS, L. A.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Risedronate in the treatment of murine CD. **Parasitol Res**, 96: 184–187, 2005.

BRAGA, C.; GUIMARÃES, L.; AMARAL, R.; BONANI, A.; MOREIRA, N.; GOMES, M.; GUILHERME, A. L. F.; FONTES, C. E.; DE ARAÚJO, S. M. Megacólon de Doença de Chagas: Uma Abordagem Interdisciplinar [Megacolon of Chagas disease: Na interdisciplinary approach]. **Revista de Saúde e Biologia**, 8(1):36-43, 2013.

CAMPOS, G. M.; VITTINGHOFF, E.; RABL, C.; TAKATA, M.; GADENSTATTER, M.; LIN, F.; CIOVICA, R. Endoscopic and surgical treatments for achalasia: a systematic review and meta-analysis. **Ann Surg**, 249: 45-57, 2009.

CAMPOS, M. C. O.; LEON, L. L.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 193:17-19, 2014.

CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; LUQUETTI, A. O.; BUEKENS, P. Congenital Chagas disease: an update. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 110, 363–368, 2015.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, 25(8): 471-479, 2006.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the

chemotherapy of CD. **Curr Top Med Chem**, 2: 1261–1267, 2002.

CDC. Infectious Disease Laboratory – Formulary: **U.S. Department of Health & Human Services**. 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/laboratory/drugservice/formulary.html> [updated May 18, 2018; cited Oct 15, 2019].

CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. **Int J Antimicrob Agents**, 40:527-32, 2012.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; FREEMAN, G. L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **Clin. Exp. Immunol.** 121 (1), 112-119, 2000.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, vol. 20(1) 22–35, 2015.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 Suppl 1, 31-40, 2009.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, 683230, 2014.

CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; MCDONALD, M. C.; DUGO, L.; DI PAOLA, R.; SERRAINO, I.; BRITTI, D.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Beneficial effects of GW274150, a novel, potent and selective inhibitor of iNOS activity, in a rodent model of collagen-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, 453: 119-129, 2002.

DA SILVA, R. M.; OLIVEIRA, L. T.; SILVA BARCELLOS, N. M.; DE SOUZA, J.; LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrob Agents Chemother**, 56: 3344–8, 2012.

DE FREITAS, R. C.; HEIM LONIEN, S. C.; MALVEZI, A. D.; SILVEIRA, G. F.; WOWK, P. F.; DA SILVA, R. V.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; BORDIGNON, J.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of infection of human monocytes by aspirin. **Experimental Parasitology**, 2017, doi: 10.1016/j.exppara.2017.09.019.

DE GROOTE, M. A.; FANG, F. C. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. **Clin Infect Dis**, 21 (Suppl. 2): S162-165. 1995.

DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C.; CASTRO, C. R. D.; CASTRO, J. A. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(6): 549–553, 2008.

DE MECCA, M. M.; FANELLI, S. L.; BARTEL, L. C.; DE CASTRO, C. R.; DÍAZ, E.G.; CASTRO, J. A. Nifurtimox nitroreductase activity in different cellular fractions from

male rat pancreas. Biochemical and ultrastructural alterations. **Life Sci**, 81 (2), 144–152, 2007.

DE OLIVEIRA, A. P.; BERNARDO, C. R.; CAMARGO, A. V.; RONCHI, L. S.; BORIM, A. A.; DE MATTOS, C. C.; DE CAMPOS JR, E.; CASTIGLIONI, L.; NETINHO, J. G.; CAVASINI, C. E.; BESTETTI, R. B.; DE MATTOS, L. C. Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease: Involvement of the CCR5 59029 A/G polymorphism. **PLoS One**, 10(11):e0141847, 2015.

DE OLIVEIRA, F. L.; ARAUJO-JORGE, T. C.; DE SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA, G. M.; DEGRAVE, W. M.; FEIGE, J. J.; BAILLY, S.; WAGHABI, M. C. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 6(6): e1696, 2012.

DE SOUZA, A. P.; TANOWITZ, H. B.; CHANDRA, M.; SHTUTIN, V.; WEISS, L. M.; MORRIS, S. A.; FACTOR, S. M.; HUANG, H.; WITTNER, M.; SHIRANI, J.; JELICKS, L. A. Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. **Parasitol Res**, 92 (6):496–501, 2004.

DE SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, G. M.; SOEIRO, M. N. C. Electrocardiographic finding in acutely and chronically *Trypanosoma cruzi* infected mice treated by a phenyl-substituted analogue of Furamidine DB569. **Drug Target Insights**, 2: 61–69. 2007.

DE TORANZO, D. E. G.; CASTRO, J. A.; DE CAZZULO, F. B. M.; CAZZULLO, J. J. Interaction on Benznidazole reative metabolites with nuclear and Kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, 44, 880-881, 1988.

DIAS, J. C. P., et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, 25(núm. esp.): 7-86, 2016.

DINIZ, L. DE F.; URBINA, J. A.; DE ANDRADE, I. M.; MAZZETI, A. L.; MARTINS, T. A.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Negl Trop Dis**, 7(8):e236. 2013.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis**, 6, 223-238, 1984.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, 188: 725–734. 1998.

EPELMAN, S.; LIU, P. P.; MANN, D. L. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. **Nat Rev Immunol**, F15(2):117-29, 2015.

FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity: **J Clin Invest**, 99: 2818-2825, 1997.

FARES, R. C. G.; Gomes, J. DE A. S.; GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.;

SARAIVA, R. M.; MEDEIROS, N. I.; OLIVEIRA-PRADO, R.; SANGENIS, L. H. C.; CHAMBELA, M. DA C.; DE ARAÚJO, F. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DAMÁSIO, M. P.; VALENTE, V. A.; FERREIRA, K. S.; SOUSA, G. R.; ROCHA, M. O. DA C.; CORREA-OLIVEIRA, R. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Differentially Expressed in Patients with Indeterminate and Cardiac Clinical Forms of Chagas Disease. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3600-3608, 2013.

FRANCISCO, A. F.; VIEIRA, P. M. A.; ARANTES, J. M.; PEDROSA, M. L.; MARTINS, H. R.; SILVA, M.; VELOSO, V. M.; DE LANA, M.; BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Trypanosoma cruzi: Effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. **Experimental Parasitology**, 120, 314–319, 2008.

GARCÍA, M. C.; PONCE, N. E.; SANMARCO, L. M.; MANZO, R. H.; JIMENEZ-KAIRUZ, A. F.; AOKI, M. P. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental Chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother**, 60:3700–3708, 2016.

GARZONI, L. R.; CALDERA, A.; MEIRELLES, M. DE N. L.; DE CASTRO, S. L.; DOCAMPO, R.; MEINTS, G. A.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents**, 23: 273–285, 2004a.

GARZONI, L. R.; WAGHABI, M. C.; BAPTISTA, M. M.; DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N.; BRITTO, C. C.; DOCAMPO, R.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute CD. **Int J Antimicrob Agents**, 23: 286–290, 2004b.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacol Ther**, 133(3):257-79, 2012.

GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. P.; LARRIPA, I. B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. **Mutat. Res**, 224 (2), 263–267, 1989.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, 116:4–15, 2006.

GU, Z.; KAUL, M.; YAN, B.; KRIDEL, S. J.; CUI, J.; STRONGIN, A.; SMITH, J. W.; LIDDINGTON, R. C.; LIPTON, S. A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science**, 297: 1186-1190, 2002.

GUTIERREZ, F. R. S.; LALU, M. M.; MARIANO, F. S.; MILANEZI, C. M.; CENA, J.; GERLACH, R. F.; SANTOS, J. E.; TORRES-DUENAS, D.; CUNHA, F. Q.; SCHULZ, R.; SILVA, J. S. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Infect Dis**, 197: 1468-1476, 2008.

GOBERT, A. P.; SEMBALLA, S.; DAULOUEDE, S.; LESTHELLE, S.; TAXILE, M.;

VEYRET, B; VINCEDEAU, P. Murine macrophages use oxygen- and nitric oxide-dependent mechanisms to synthesize S-nitroso-albumin and to kill extracellular trypanosomes. **Infect. Immun**, 66, 4068-4072, 1998.

GUTIERREZ-CORREA, J.; FAIRLAMB, A. H.; STOPPANI, A. O. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase generated phenothiazine cationic radicals. **Free Radic Res**, 34:363–378, 2001.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect. Immun.**, 66, 1208-1215, 1998.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q. X.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 6, 480–498, 2007.

KAWAGUCHI, W. H.; CERQUEIRA L. B.; FACHI, M. M.; CAMPOS, M. L REASON, I. J. M.; PONTAROL, R. Efficacy and Safety of Chagas Disease Drug Therapy and Treatment Perspectives. **Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges**, 2018. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74845>.

KERR, I. D.; LEE, J. H.; FARADY, C. J.; MARION, R.; RICKERT, M.; SAJID, M.; PANDEY, K. C.; CAFFREY, C. R.; LEGAC, J.; HANSE, E.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; ROSENTHAL, P. J.; BRINEN, L. S. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, 284(38):25697-25703, 2009.

KHARE, S.; NAGLE, A. S.; BIGGART, A.; LAI, Y. H.; LIANG, F.; DAVIS, L. C.; BARNES, S. W.; MATHISON, C. J.; MYBURGH, E.; GAO, M. Y.; GILLESPIE, JR.; LIU, X.; TAN, J. L.; STINSON, M.; RIVERA, I. C.; BALLARD, J.; YEH, V.; GROESSL, T.; FEDERE, G.; KOH, H. X.; VENABLE, J. D.; BURSULAYA, B.; SHAPIRO, M.; MISHRA, P. K.; SPRAGGON, G.; BROCK, A.; MOTTRAM, J. C.; BUCKNER, F. S.; RAO, S. P.; WEN, B. G.; WALKER, JR.; TUNTLAND, T.; MOLTENI, V.; GLYNNE, R. J.; SUPEK, F. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, CD and sleeping sickness. **Nature**, 537: 229–233, 2016.

KINOSHITA-YANAGA, A. T.; TOLEDO, M. J. DE O.; DE ARAÚJO, S. M.; VIER, B. P.; GOMES, M. L. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the Polymerase Chain Reaction: case report. **Rev. Inst. Med. trop**, 51(5):295-298, 2009.

KÖEBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of american trypanosomiasis. **Adv. Parasit**, 6: 63-113, 1968.

KUN, H.; MOORE, A.; MASCOLA, L.; STEURER, F.; LAWRENCE, G.; KUBAK, B.; RADHAKRISHNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; MATTHEW KUEHNERT, M. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clin. Infect. Dis**, 48, 1534–1540, 2009.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of

zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v.61, n.2, p.205-209, 2010.

LEON, J. S.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. **Circulation**, 107(17):2264-2269, 2003.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **Expert Opin Drug Discov**, 8(12):1479–1489, 2013.

LI, Z.; FENNIE, M. W.; GANEM, B.; HANCOCK, M. T.; KOBASLIJA, M.; RATTENDI, D.; BACCHI, C. J.; O'SULLIVAN, M. C. Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. **Bioorg Med Chem Lett**, 11: 251–254, 2001.

LIENDO, A.; VISBAL, G.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; URBINA, J. A. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, 104: 81–91, 1999.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes Antiasmáticos Modernos: Antagonista de Receptores de Leucotrienos Cisteínicos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 825-834, 2002.

LO PRESTI, M. S.; RIVAROLA, H. W.; BUSTAMANTE, J. M.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Int J Antimicrob Agents**, 23: 634–636, 2004.

LONIEN, S. C. H.; MALVEZI, A. D.; SUZUKAWA, H. T.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; BORDIGNON, J.; PINGE-FILHO, P. Response to *Trypanosoma cruzi* by Human Blood Cells Enriched with Dendritic Cells Is Controlled by Cyclooxygenase-2 Pathway. **Front. Microbiol**, 8:2020, 2017.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. D. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, 124 167–171. 2010.

MALDONADO, R. A, MOLINA, J. T.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. **Antimicrob Agents Chemother**, 37: 1353–9, 1993.

MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M.; LOVO-MARTINS, M. I.; ZANLUQUI, N. G.; TATAKIHARA, V. L.; RIZZO, L. V.; VERRI, W. A. JR.; MARTINS-PINGE, M. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; PINGE-FILHO, P. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Mediators Inflamm**, 580919, 2014.

MANARIN, R. M. C. L.; BOTTASSO, E.; SERRA, E.; REVELLI, C. J. S. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology International**, 62(1):79-8, 2013.

MARTINS, T. A. F.; DINIZ, L. DE F.; MAZZETI, A. L.; DA SILVA, Á. F. N.; CALDAS, I. S.; DE ANDRADE, I. M.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M. T. Benznidazole/Itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in experimental Chagas disease. **PLoS One**, 10(6):e0128707, 2015.

MASSOCATTO, C. L.; MOREIRA, N. M.; MUNIZ, E.; DE ARAÚJO, S. M.; PINGE-FILHO, P.; ROSSI, R. M.; ARAÚJO, E. J. DE A.; SANT'ANA, D. DE. M. G. Treatment with low doses of aspirin during chronic phase of experimental Chagas' disease increases oesophageal nitrergic neuronal subpopulation in mice. **Int. J. Exp. Path**, 98, 356–362, 2017.

MASSOCATTO, C. L.; MOREIRA, N. M.; MUNIZ, E.; PINGE-FILHO, P.; ROSSI, R. M.; ARAÚJO, E. J. DE A.; SANT'ANA, D. DE. M. G. Aspirin prevents atrophy of esophageal nitrergic myenteric neurons in a mouse model of chronic Chagas disease. **Diseases of the Esophagus**, 1;30(2):1-8, 2015.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, (São Paulo, Brazil). 64(12):1219-1224, 2009.

MAYA, J. D.; RODRIGUEZ, A.; PINO, L.; PABON, A.; FERREIRA, J.; PAVANI, M.; REPETTO, Y.; MORELLO, A. Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazol upon trypanothionine and metallothionine proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Res**, 37(1): 61-69, 2004.

MAYA, J.; CASSELS, B.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol**, 146: 601–620, 2010.

MAYA, J.; CASSELS, B.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol**, 146:601-20, 2006.

MENEGHELI, U. Clinical treatment of the digestive form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94(1):341-342, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso brasileiro em doença de Chagas [Brazilian consensus on Chagas' disease]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(3):7-29, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica [Epidemiological Surveillance Guide]. **Série A Normas e Manuais Técnicos**, 7:819, 2009.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SANCHEZ-MONTALVA, A. The use of posaconazole against Chagas disease. **Curr Opin Infect Dis**, 28:397–407, 2015.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; TREVIÑO, B.; SERRE, N.; SAO AVILÉS, A.; ALMIRANTE, B. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two diferente manufacturers. **Antimicrob Agents Chemother**, 59:6125–6131, 2015.

MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; LOEBENBERG, D.; URBINA, J. A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. **Antimicrob Agents Chemother**, 44: 150–155, 2000.

MOLINA-BERRÍOS, A.; CAMPOS-ESTRADA, C.; HENRIQUEZ, N.; FAÚNDEZ, M.; TORRES, G.; CASTILLO, C.; ESCANILLA, S.; KEMMERLING, U.; MORELLO, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. A.; MAYA, J. D. Protective Role of Acetylsalicylic Acid in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection: Evidence of a 15-epi-Lipoxin A4-Mediated Effect. **PLoS Negl Trop Dis**, 7(4): e2173, 2013.

MORA, G. Chagas cardiomyopathy. **Journal of Cardiology Practice**, 14(31):1-7. 2016.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEON, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys**, 218, 585-591, 1982.

MUKHERJEE, S.; MACHADO, F. S.; HUANG, H.; OZ, H. S.; JELICKS, L. A.; PRADO, C. M.; KOBAYASHI, W.; FINE, E. J.; DAZHI ZHAO, D.; FACTOR, S. M.; COLLADO, J. E.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHTON, A. W. Aspirin Treatment of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* and Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **PLoS ONE**, 6(2): e16959, 2011.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 8841-8848, 2000.

NDAO, M.; BEAULIEU, C.; BLACK, W. C.; ISABEL, E.; VASQUEZ-CAMARGO, F.; NATH-CHOWDHURY, M.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; METHOT, N.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58(2):1167-1178, 2013.

NETTO, J. C. DE A.; DE MELLO, J. Y.; BARBOSA, W. Doença de Chagas, correlação sorológica e eletrocardiográfica em grupo de indivíduos idosos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, vol. IV — n.2, 1970.

NOYA, B. A.; DIAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; MUNOZ-CALDERON, A.; NOYA, O. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 110, 377–386, 2015.

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, 62 (9):767–776, 2013.

ODA, J. Y.; BELÉM, M. O.; CARLOS, T. M.; GOUVEIA, R.; LUCHETTI, B. F. C.; MOREIRA, N. M.; MASSOCATTO, C. L.; ARAÚJO, S. M.; SANT'ANA, D. M. G.; BUTTOW, N. C.; PINGE-FILHO, P.; ARAÚJO, E. J. DE A. Myenteric

neuroprotective role of aspirin in acute and chronic experimental infections with *Trypanosoma cruzi*. **Neurogastroenterology & Motility**, 29:e13102, 2017.

OLIVEIRA, M.; DIAS, A.; PONTES, V.; SOUZA JÚNIOR, A.; COELHO, H.; COELHO, I. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil [Etiologic treatment of Chagas' disease in Brazil]. **Revista de Patologia Tropical**, 37(3): 207-228, 2008.

OLMO, F.; ROTGER, C.; RAMIREZ-MACIAS, I.; MARTINEZ, L.; MARIN, C.; CARRERAS, L.; URBANOVÁ, K.; VEJA, M.; CHAVES-LEMAUR, G.; SAMPEDRO, A.; ROSALES, M. J.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; COSTA, A. Synthesis and biological evaluation of N,N'-squaramides with high in vivo efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. **J Med Chem**, 57:98799, 2014.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; VAN DAMME, J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. **Trends Immunol**, 22(10):571-9, 2001.

PAHO (Pan American Health Organization). GUIDELINES FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CHAGAS DISEASES. ISBN: 978-92-75-12043-9. 2019. (Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y) acesso em 30/11/2019.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, 30(6):289-298, 2014.

PENITENTE, A. R.; LEITE, A. L. J.; COSTA, G. DE P.; SHRESTHA, D.; HORTA, A. L.; NATALI, A. J.; NEVES, C. A.; TALVANI, A. Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 93(5), pp. 976–982, 2015.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of chagas disease: implications for global health. **Trends Parasitol**, 31(11):595–603, 2015.

PÉREZ-AYALA, A.; PÉREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F. F.; MONGE-MAILLO, B.; FARO, M. V.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Gastro-intestinal Chagas disease in migrants to Spain: prevalence and methods for early diagnosis. **Ann Trop Med Parasitol**, 105: 25–29, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, 391: 82–94, 2018

PERON, F.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; DINIZ, U. D.; RODRIGUES-FILHO, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Effects of (1E,4E)-2-methyl-1,5-bis(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and its combinational effect with benznidazole, ketoconazole, or fluconazole. **BioMed Research International**, 1-11, 2017.

PETRAY, P.; CASTANOS-VELEZ, E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A.; ROTTENBERG, M. E. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, 47, 121-126, 1995.

PINTO, A. Y.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. DA C, FERREIRA JR, A. G.; COURA JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Para, Amapa and Maranhao observed between 1988 and 2005. **Rev Soc Bras Med Trop**, Nov-Dec;41(6):602-14, 2008.

PITT, B.; REMME, W.; ZANNAD, F.; NEATON, J.; MARTINEZ, F.; RONIKER, B.; BITTMAN, R.; HURLEY, S. B. S.; KLEIMAN, J.; GATLIN, M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, 348(14):1309-1321, 2003.

POLYAKOVA, V.; LOEFFLER, I.; HEIN, S.; MIYAGAWA, S.; PIOTROWSKA, I.; DAMMER, S.; RISTELI, J.; SCHAPER, J.; KOSTIN, S. Fibrosis in endstage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. **Int J Cardiol**, 151(1):18-33, 2011.

PRIOTTI, J.; FERREIRA, M. J. G.; LAMAS, M. C.; LEONARDI, D.; SALOMON, C. J.; NUNES, T. G. First solid-state NMR spectroscopy evaluation of complexes of benzimidazole with cyclodextrin derivatives. **Carbohydrate Polymers**, 131:90-97, 2015.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. Chagas disease. **The Lancet**, 375:1388-1402, 2010.

REGUEIRO, A; GARCIA-ALVAREZ, A; SITGES, M; ORTIZ-PÉREZ, J. T; DE CARALT, M. T; PINAZO, M. J; POSADA, E; HERAS, M; GASCÓN, J; SANZ, G. Myocardial involvement in Chagas disease: insights from cardiac magnetic resonance. **Int J Cardiol**, 165:107–112, 2013.

REPETTO, E. C.; ZACHARIAN, R.; KUMAR, A.; ANGHEBEN, A.; GOBBI, F.; ANSELMINI, M.; AL ROUSAN, A.; TORRICO, C.; RUIZ, R.; LEDEZMA, G.; BUONINSEGNA, M. C.; KHOGALI, M.; VAN DEN BERGH, R.; DE MAIO, G.; EGIDI, A. M.; MACCAGNO, B.; GARELLI, S. Neglect of a neglected disease in Italy: the challenge of access-to-care for Chagas disease in Bergamo area. **PLoS Negl Trop Dis**, 9:e0004103, 2015.

RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews. Cardiology**, 9(10):576-589, 2012.

RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. **Le Progress Med**, 101, 282, 1973.

RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; SULIGOY, M.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. Thioridazine treatment modifies the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Ann Trop Med Parasitol**, 93: 695–702, 1999.

RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental CD evolution. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, 2: 43–52, 2001.

ROMANHA, A. J.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for CD. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 105: 233–238, 2010.

ROSSI, M.; RAMOS, S.; BESTETTI, R. Chagas' heart disease: clinical pathological correlation. **Front Biosci**, 8:e94–e109, 2003.

SANTOS, E. C.; NOVAES, R. N.; CUPERTINO, M. C.; BASTOS, D. S. S.; KLEIN, R. C.; SILVA, E. A. M.; FIETTO, J. L. R.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T.; OLIVEIRA, L. L. Concomitant Benzimidazole and Suramin Chemotherapy in Mice Infected with a Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, 59:599–6006, 2015.

SCHAIBLE, H. G.; SCHIMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. **Journal of Physiology**, v. 403, p. 91-104, 1988.

SHI, C. S.; SHI, G. Y.; HSIAO, S. M.; KAO, Y. C.; KUO, K. L.; MA, C. Y.; KUO, C. H.; CHANG, B. I.; CHANG, C. F.; LIN CH, WONG CH, WU HL. Lectinlike domain of thrombomodulin binds to its specific ligand Lewis Y antigen and neutralizes lipopolysaccharide-induced inflammatory response. **Blood**, 112: 3661-3670, 2008.

SILVA, C. F.; BATISTA, M. M.; BATISTA, D. G. J.; DE SOUZA, E. M.; DA SILVA, P. B.; DE OLIVEIRA, G. M.; MEUSER, A. S.; SHAREEF, A. R.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, 52: 3307–3314, 2008.

SILVA, C. F.; MEUSER, M. B.; DE SOUZA, E. M.; MEIRELLES, M. N.; STEPHENS, C. E.; SOM, P.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, 51: 3803–3809, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**, 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVERO-ISIDRE, A.; MORÍNIGO-GUAYUÁN, S.; MEZA-OJEDA, A.; MONGELÓS-CARDOZO, M.; CENTURIÓN-WENNINGER, C.; FIGUEREDO-THIEL, S.; F. SANCHEZ, D.; ACOSTA, N. Protective effect of aspirin treatment on mouse behavior in the acute phase of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, 117:189–200, 2018.

SOEIRO, M. N.; WERBOVETZ, K.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D.; WANG, M. Z.; HEMPHILL, A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. **Parasitology**, 140: 929–951, 2013.

SOUZA, D. H.; VAZ, M. D.; FONSECA, C. R.; LUQUETTI, A.; REZENDE FILHO, J.; OLIVEIRA, E. C. Current epidemiological profile of Chagasic megaesophagus in Central Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 46(3):316–321, 2013.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, 81, 209-237, 2001.

STOPPANI, A. O. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicina (B. Aires)**, 59 (Suppl. 2), 147–165, 1999.

TANOWITZ, H. B.; MACHADO, F. S.; SPRAY, D. C.; FRIEDMAN, J. M.; WEISS, O. S.; LORA, J. N.; NAGAJYOTHI, J.; MORAES, D. N.; GARG, N. J.; NUNES, M. C. P.; RIBEIRO, A. L. P. Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, Early online, 1–17, 2015.

THOMSON, L.; GADELHA, F. R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A. E.; RADI, R. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 98, 81-91, 1999.

TROCHINE, A.; CREEK, D. J.; FARAL-TELLO, P.; BARRETT, M. P.; ROBELLO, C. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8:e2844, 2014.

TURRENS, J. F.; WATTS, B. P. JR.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Mol Biochem Parasitol**, 82: 125–129, 1996.

URBINA, J. A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 149–156, 2015.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, 115:55-68, 2009.

URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; LARRALDE, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R. Synergistic effects of ketoconazole and SF-86327 on the proliferation of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Ann N Y Acad Sci**, 544: 357–8, 1988.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L. M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. **Antimicrob Agents Chemother**, 42: 1771–1777, 1998.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R.; ROMANHA, A. J. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of CD. **Int J Antimicrob Agents**, 21: 27–38, 2003a.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental CD using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Int J Antimicrob Agents**, 21: 39–48, 2003b.

URBINA, J. Ergosterol biosynthesis and drug development for CD. **Mem Inst**

Oswaldo Cruz, 104 (Suppl I): 311–318, 2009.

VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**. 110(1):7-14, 2009.

VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; DIAS FILHO, B. P.; KANESHIMA, E. N.; YAMADA-OGATTA, S. F.; YAMAUCHI, L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56(1):507-512, 2011.

VENTURINI, G.; SALVATI, L.; MUOLO, M.; COLASANTI, M.; GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 270, 437-441, 2000.

WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Cutting-edge methodologies applied to the challenges of chagas disease. **Adv Parasitol**, 75:xxi-xxvi, 2011.

WHO, World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert Committee. WHO technical report series, 905. Geneva: **World Health Organization**, 2002.

WHO, World Health Organization. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. 2019. Available from: <http://www.who.int/chagas/disease/en/> [Accessed: Oct 15, 2019].

WILKINSON, S. R.; BOT, C.; KELLY, J. M.; HALL, B. S. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: Current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 11(16):2072-2084, 2011.

WILLIAMS-BLANGERO, S; MAGALHAES, T; RAINWATER, E; BLANGERO, J; CORRÉA-OLIVEIRA, R; VANDEBERG, J. L. Electrocardiographic characteristics in a population with high rates of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg**, 77:495–499, 2007.

YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, 47, 540–544, 2007.

ZACKS, M. A.; WEN, J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N.; An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An Acad Bras Cienc**, 77 (4), 2005.

ANEXOS

ANEXO A
PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 85/2016

Londrina, 05 de Maio de 2016.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "**Eficácia da terapia combinada de benzonidazol e aspirina no modelo murino de doença de chagas aguda e crônica**", protocolo CEUA nº **4628.2016.40**, sob a responsabilidade de **Phileno Pinge Filho**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **03/05/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar a eficácia do tratamento combinado de Benzonidazol (BZ) e Aspirina (ASA) sobre a fase aguda e crônica da doença de Chagas experimental. Nos estudos de fase aguda, 48 h após a infecção os animais (n = 10/grupo) serão submetidos aos seguintes tratamentos: Grupo ASA, os animais receberão por via oral 25 mg/Kg de ASA; Grupo BZ, os animais receberão ¼ BZ; 25 mg/Kg/dia; Grupo BZ+ASA (os animais receberão ¼ BZ; 25 mg/Kg/dia juntamente com 25 mg/Kg de ASA). A ASA e o BZ serão diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 10% em solução salina. Grupo controle, os animais serão tratados com veículo (10% de DMSO em salina) pela mesma via. Para os estudos de fase crônica, os grupos controles e experimentais citados acima receberão os mesmos tratamentos iniciando 90 dias após a infecção. GI 2.

Vigência do Projeto	02/05/2016 a 02/05/2020
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico
Nº de animais	240
Peso/Idade	20g / 8-12 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Instituto Carlos Chagas / FIOCRUZ
Amostras a serem coletadas	Sangue, coração

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


 Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
OF. CIRC. CEUA Nº 208/2018
Londrina, 06 de dezembro de 2018.
Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "**Manutenção do *Trypanosoma cruzi* (cepas Y, G E CL), agente causador da Doença de Chagas**" protocolo CEUA nº 20779.2018.59 sob a responsabilidade de **Phileno Pingue Filho**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **06/12/2018**.

Este projeto tem por objetivo a utilização de animais para a manutenção do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, para a realização de ensaios de indução da infecção em modelos murinos e ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*. Grau de invasividade=1

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	07/01/2019 a 07/01/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo Heterogênico/ Swiss
Nº de animais	360
Peso/ Idade	20g/ 7 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Phileno Pingue Filho

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Patológicas/Imunologia/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB

C/C para a Chefia do Depto de Ciências Patológicas/Imunologia/CCB

C/C para a Direção de Centro do CCB