



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOYCE HELLEN RIBEIRO DIONISIO

EFEITOS DO TRATAMENTO ISOLADO E COMBINADO
DE ASPIRINA E BENZNIDAZOL SOBRE LESÕES
NEURONAIIS MIOENTÉRICAS OBSERVADAS NO
MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS

Londrina

2020

JOYCE HELLEN RIBEIRO DIONISIO

EFEITOS DO TRATAMENTO ISOLADO E COMBINADO
DE ASPIRINA E BENZNIDAZOL SOBRE LESÕES
NEURONAIIS MIOENTÉRICAS OBSERVADAS NO
MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia
Experimental da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de
Almeida Araújo

Londrina

2020

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

D592e Dionisio, Joyce Hellen Ribeiro.
Efeitos do tratamento isolado e combinado de Aspirina e Benznidazol sobre lesões neuronais mioentéricas observadas no modelo murino da doença de Chagas / Joyce Hellen Ribeiro Dionisio. - Londrina, 2020.
68 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Doença de chagas - Tese. 2. Megacolon - Tese. 3. Neuroproteção - Tese. I. Araújo, Eduardo José de Almeida . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

JOYCE HELLEN RIBEIRO DIONISIO

EFEITOS DO TRATAMENTO ISOLADO E COMBINADO
DE ASPIRINA E BENZNIDAZOL SOBRE LESÕES
NEURONAS MIOENTÉRICAS OBSERVADAS NO
MODELO MURINO DA DOENÇA DE CHAGAS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado até aqui, me dando forças para continuar em cada situação enfrentada.

Agradeço minha família, em especial os meus pais, Vilson Dionisio e Lenir Ribeiro Dionisio, pelos ensinamentos, conselhos e apoio que me tornaram o que sou hoje. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui. Obrigada por sempre incentivarem meus estudos, mesmo que na vida não tivessem tido as mesmas oportunidades. Obrigada por cada coisa que abriram mão para eu estar onde estou hoje.

Agradeço meus irmãos Rogério e Josiane, meus sobrinhos Vinicius, Beatriz e Luiza e aos meus cunhados Silvia e Valdecir, por estarem sempre ao meu lado, me ensinando a me tornar uma pessoa melhor e apoiando os meus sonhos e incentivando a sonhar sempre mais.

Obrigada ao meu orientador Prof. Eduardo Araújo por todos os ensinamentos, paciência e compreensão durante o mestrado. Por ser um profissional admirável que tem me ajudado a crescer não apenas como profissional, mas também como ser humano.

Obrigada aos meus amigos do laboratório de neurociência entérica, Paulo, Camila Machado, Andreia, Beatriz, Geovane e Matheus por toda ajuda, conselhos e risadas. Por cada troca de conhecimento e experiência. Sem vocês este trabalho não seria mesmo. Agradeço em especial minhas amigas Camila Basso e Andreza por cada desabafo durante esse período, por sempre estarem dispostas a me ajudar, ensinar e aconselhar. Por cada almoço e café que tornaram a rotina mais alegre.

Agradeço ao Programa de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina e aos professores que contribuíram para meu crescimento profissional.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro possibilitando a realização desse trabalho.

Dionisio, Joyce Hellen Ribeiro. **Efeitos do tratamento isolado e combinado de Aspirina e Benznidazol sobre lesões neuronais mioentéricas observadas no modelo murino da doença de Chagas.** 2020. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

Resumo: A Doença de Chagas (DC) é a manifestação clínica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. As manifestações clínicas da DC são características da fase crônica. Dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, de 30-40% evoluem para a fase crônica, podendo apresentar manifestações cardíacas ou digestivas. O megaesôfago e o megacólon são as maiores causas de morbidade na forma clínica digestiva da DC crônica. A forma digestiva da DC é caracterizada por alterações na função motora, secretória e absorviva do trato gastrointestinal, resultante de lesões no plexo mioentérico, um dos principais componentes do Sistema Nervoso Entérico (SNE). Para que ocorram as lesões no plexo mioentérico e desenvolvimento das manifestações digestivas, estudos indicam a existência de mecanismos mistos, com participação direta do parasita e reações autoimunes. Existem no mercado dois fármacos para o tratamento da DC: Benznidazol (BZN) e Nifurtimox. O BZN é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da DC. Esse medicamento apresenta eficácia limitada dependendo da fase da doença, além de apresentar efeitos adversos, que muito frequentemente, levam à interrupção do tratamento pelo paciente. A ação desse fármaco está relacionada a danos em macromoléculas do parasito, como o DNA. Durante a fase crônica da DC, os danos teciduais observados no hospedeiro são decorrentes da resposta inflamatória, e não da presença do parasito nas lesões, sendo a utilização de anti-inflamatórios uma estratégia para controle das alterações crônicas na DC. Neste sentido, estudos têm demonstrado que a utilização de baixas doses de anti-inflamatórios, como a aspirina (ASA), tem apresentado bons resultados no controle do parasito, além de neuropreservação. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia do tratamento isolado e combinado do BZN e ASA sobre neurônios do plexo mioentérico de camundongos infectados com *T. cruzi*. Para isso, camundongos machos BALB/c foram distribuídos em cinco grupos (n=5): controle, infectado sem tratamento, infectado+ASA, infectado+BZN e infectado+ASA+BZN. Os camundongos foram infectados por via intraperitoneal, com 5×10^2 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (CEUA/UEL nº03/2019). Quarenta e oito horas após a infecção, os tratamentos foram iniciados e tiveram duração de trinta dias. A dose de ASA e BZN foi de 25mg/kg/dia via gavagem. A parasitemia foi avaliada em dias alternados a partir 2º dia pós infecção, por um período de 31 dias. Os animais foram submetidos a eutanásia 180 dias após a infecção e, durante esse período, a taxa de sobrevivência foi avaliada. Foram avaliados o comprimento e largura do cólon dos camundongos, para posterior cálculo da área do órgão. As amostras de cólon foram submetidas a técnica de imunofluorescência para marcação da população neuronal mioentérica geral (PGP9.5+), colinérgica (ChAT+) e nitrérgica (nNOS+). Contou-se o número total de células presentes em 32 imagens microscópicas advindas de cada animal. A área do cólon de todos os animais infectados pelo *T. cruzi* encontrava-se maior quando comparada a de camundongos não infectados. A parasitemia comprova a infecção pelo *T. cruzi*. A ASA administrada de forma isolada não foi capaz de controlar de forma eficiente a parasitemia, pois apresentou comportamento

semelhante aos animais infectados sem tratamento. O grupo infectado+BZN e infectado+ASA+BZN apresentaram parasitemia semelhante, com baixo pico parasitêmico ao 7º dia pós infecção. Os animais dos grupos infectados+BZN e infectados+ASA+BZN apresentaram taxa de sobrevivência semelhantes ao grupo sem infecção. A densidade populacional de neurônios gerais e colinérgicos estava diminuída nos animais infectados sem tratamento, mesmo após aplicar fator de correção devido ao aumento da área colônica. Essa mesma redução foi observada nos grupos infectados+ASA e infectados+BZN, quando comparados ao grupo controle. Os animais infectados+ASA+BZN apresentaram preservação para população neuronal geral e subpopulação colinérgica. A subpopulação nitrérgica apresentou redução numérica nos animais infectados sem tratamento e infectados+BZN, quando consideradas as amostras avaliadas. Os grupos infectados+ASA e infectados+ASA+BZN se mostrou preservada nessas amostras. Porém quando aplicamos o fator de correção para a área do órgão, observou-se que a subpopulação nitrérgica não foi alterada em nenhum dos grupos avaliados. Durante a infecção ocorreu alteração morfológica nos corpos celulares dos neurônios. A subpopulação neuronal nitrérgica dos camundongos pertencentes aos grupos infectados sem tratamento, infectados+ASA e infectados+ASA+BZN encontrava-se hipertrofiada quando comparada a do grupo controle. Já nos camundongos infectados tratados com BZN, observou-se atrofia do corpo celular. Em relação aos neurônios colinérgicos, somente o grupo infectado+ASA apresentou alteração morfométrica (hipertrofia) do corpo celular. A neuropreservação promovida pela combinação ASA+BZN se mostrou superior aos tratamentos administrados de forma isolada, também sendo capaz de promover sobrevivência dos camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de chagas, megacolon, neuroproteção.

Dionisio, Joyce Hellen Ribeiro. **Effects of the isolated and combined treatment using Aspirin and Benznidazole on myenteric neuronal lesions observed in the murine model of Chagas disease.** 2020. Master Thesis in Experimental Pathology. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

Abstract: Chagas' disease (CD) is the clinical manifestation caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The clinical manifestations of CD are characteristic of the chronic phase. Of the individuals infected with *T. cruzi*, 30-40% progress to the chronic phase, and may present cardiac or digestive manifestation. Megaesophagus and megacolon are the major causes of morbidity in the clinical digestive form of chronic CD. The digestive form of CD is characterized by changes in motor, secretory and absorptive function of the gastrointestinal tract, resulting from lesions in the myenteric plexus, one of the main components of the Enteric Nervous System (ENS). For lesions in the myenteric plexus to occur and the development of digestive manifestations, studies indicate the existence of mixed mechanisms, with direct participation of the parasite and autoimmune reactions. There are two drugs on the market for the treatment of CD: Benznidazole (BZN) and Nifurtimox. BZN is the drug of choice for the treatment of CD. This medication has limited efficacy depending on the stage of the disease, in addition to having adverse effects, which very often lead to interruption of treatment by the patient. The action of this drug is related to damage to macromolecules of the parasite, such as DNA. During the chronic phase of CD, the tissue damage observed in the host is due to the inflammatory response, rather than the presence of the parasite in the lesions, and the use of anti-inflammatory drugs is a strategy to control chronic changes in CD. In this sense, studies have shown that the use of low doses of anti-inflammatory drugs, such as aspirin (ASA), has shown good results in controlling the parasite, in addition to neuroprotection. The objective of this study was to evaluate the efficacy of the isolated and combined treatment of BZN and ASA on neurons of the myenteric plexus of mice infected with *T. cruzi*. For that, male BALB / c mice were divided into five groups (n = 5): control, infected without treatment, infected + ASA, infected + BZN and infected + ASA + BZN. The mice were infected intraperitoneally, with 5×10^2 blood trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* (CEUA / UEL nº03 / 2019). Forty-eight hours after infection, treatments were started and lasted for thirty days. The dose of ASA and BZN was 25mg / kg / day via gavage. Parasitemia was evaluated on alternate days from the 2nd day after infection, for a period of 31 days. The animals were euthanized 180 days after infection and, during this period, the survival rate was assessed. We evaluated the length and width of the colon of the mice were evaluated for later calculation of the organ area. Colon samples were subjected to the immunofluorescence technique for marking the general myenteric neuronal population (PGP9.5 +), cholinergic (ChAT +) and nitrergic (nNOS +). The total number of cells present in 32 microscopic images from each animal was counted. The colon area of all animals infected with *T. cruzi* was larger when compared to uninfected mice. Parasitemia proves *T. cruzi* infection. ASA administered in isolation was not able to efficiently control parasitemia, as it presented a similar behavior to infected animals without treatment. The infected + BZN and infected + ASA + BZN group presented similar parasitemia, with a low parasitic peak on the 7th day after infection. The animals in the infected + BZN and infected + ASA + BZN groups

had a survival rate similar to the group without infection. The population density of general and cholinergic neurons was decreased in infected animals without treatment, even after applying correction factor due to the increase in the colonic area. This same reduction was observed in the infected + ASA and infected + BZN groups, when compared to the control group. The infected animals + ASA + BZN showed preservation for the general neuronal population and cholinergic subpopulation. The nitrergic subpopulation showed a numerical reduction in infected animals without treatment and infected + BZN, when considering the evaluated samples. The infected + ASA and infected + ASA + BZN groups were preserved in these samples. However, when we applied the correction factor to the organ area, it was observed that the nitrergic subpopulation was not changed in any of the groups evaluated. During the infection, morphological changes occurred in the cell bodies of neurons. The neuronal nitrergic subpopulation of mice belonging to the infected groups without treatment, infected + ASA and infected + ASA + BZN was hypertrophied when compared to the control group. In infected mice treated with BZN, atrophy of the cell body was observed. Regarding cholinergic neurons, only the infected + ASA group presented a morphometric alteration (hypertrophy) of the cell body. The neuroprotection promoted by the combination ASA + BZN proved to be superior to the treatments administered in isolation, also being able to promote survival of the BALB / c mice infected with *T. cruzi*.

Key words: Chagas disease, megacolon, neuroprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático do ciclo de vida do <i>Trypanosoma Cruzi</i>	17
Figura 2 - Distribuição quantitativa de triatomíneos capturados em municípios brasileiros no período de 2007 a 2011	19
Figura 3 - Distribuição das espécies de triatomíneo capturados entre 2007 e 2011	20
Figura 4 - Imagem ilustrativa demonstrando os tipos de neurônios presentes no plexo mioentérico (PM) e submucoso (MS).....	23
Figura 5 - Localização dos plexos mioentérico e submucoso no trato gastrointestinal	24

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ASA	Aspirina
BZN	Benznidazol
ChAT	Enzima colina acetil transferase
DC	Doença de Chagas
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
PGP 9.5	Gene Produtor de Proteína 9.5
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substância P
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 Doença de Chagas.....	13
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3 Transmissão vetorial.....	18
1.4 Transmissão oral.....	20
1.5 Transmissão transfusional.....	20
1.6 Transmissão congênita.....	21
1.7 Sistema Nervoso Entérico.....	22
1.8 Neurotransmissores.....	25
1.9 Megacólon chagásico.....	27
1.10 Benzonidazol.....	28
1.11 Aspirina.....	30
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivo Específicos.....	31
3 REFERÊNCIAS.....	32
ORIGINAL PAPER.....	36
ANEXOS.....	66
ANEXO A -Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo 202/2018 processo nº2016.2018.11.....	67
ANEXO B -Author guidelines.....	68

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana foi descoberta e descrita em 1909 pelo médico e cientista Carlos Chagas. Na época, o médico residia na cidade de Lassance, interior de Minas Gerais, onde clinicava. Carlos Chagas não apenas descreveu a doença, como identificou o vetor, sugeriu melhorias nas casas para combate ao vetor, descreveu a morfologia e o ciclo de vida do agente etiológico, o *Trypanossoma cruzi* (*T. cruzi*). Em 1916, Carlos Chagas também sugeriu as alterações gastrointestinais como resultado da infecção causada pelo *T. cruzi* (GARCIA, 2009).

A DC é a manifestação clínica causada pelo protozoário *T. cruzi*. Atualmente é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma das 20 doenças tropicais negligenciadas (HOTEZ e colab, 2020). Estima-se que mundialmente exista cerca de 6-7 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, e 60 milhões de pessoas em área de risco, sendo essas áreas localizadas principalmente na América Latina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019; BRASIL, 2010). No Brasil, estima-se que haja cerca de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, distribuídas em todo território nacional, sendo o Pará, o Estado que apresentou o maior registro de casos agudos da Doença de Chagas, representando 85% dos casos, no período de 2008 a 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Diante disso, a DC no Brasil representa uma das quatro maiores causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias (BELLO CORASSA e colab., 2017).

Anos após sua descoberta, a DC foi se mostrando, cada vez mais, um sério problema de saúde pública, com reflexos na economia. A população mais atingida era a rural, então a partir de 1940, campanhas para o combate ao vetor começaram a ser desenvolvidas. A primeira campanha nacional visando a eliminação vetorial foi realizada no ano de 1950 em alguns municípios dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. A principal medida utilizada nessa campanha foi a aplicação de inseticidas nas moradias (BELLO CORASSA e colab., 2017). Anterior a essa campanha, já se preconizava como medida profilática melhorias nas habitações. Em 1975, foi estruturado um Programa Nacional de combate ao vetor, que conseguiu atingir a maior parte do território

nacional apenas em 1985. As campanhas de eliminação ao vetor ganharam maior impulso em 1991 com a criação da Iniciativa do Cone Sul (ICONSUR) (KROPF, 2017).

A ICONSUR foi um acordo entre países da América do Sul, como a Argentina, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru, visando o controle da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* e também de outras espécies de insetos vetores de importância local, evitando sua migração para outras regiões. A INCONSUR também preconizava a eliminação da transmissão via transfusão sanguínea, o que levou os países participantes a criarem uma legislação para regular a triagem de sangue destinados a transfusão. Desde a criação do INCOSUR houve declínio nas taxas de infecção pelo *T. cruzi* (Dias e colab., 2002).

Embora de origem na América Latina e fortemente relacionada ao contexto sociopolítico e econômico dessas regiões, a DC começou a emergir em países não endêmicos, como América do Norte e Europa, devido à migração de pessoas num mundo mais globalizado (DIAS, 2013). A DC também deixou de ser uma doença prevalente apenas nas áreas rurais, devido à migração de muitas pessoas para centros urbanos em busca de trabalho, o que mudou o padrão epidemiológico da doença, chegando a se concentrar nas áreas urbanas cerca de 70% das pessoas infectadas (FIOCRUZ, 2017).

A DC apresenta fases bem definidas: a fase aguda, fase intermediária e fase crônica. A fase aguda possui duração de aproximadamente dois a três meses, em pacientes humanos, e caracteriza-se por parasitemia e sintomas não específicos, como febre, mal-estar, linfocitose e astenia, comumente encontrados em outras doenças que dificultam seu diagnóstico. Durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* observa-se uma curva de parasitemia, que por consequência leva a um intenso processo inflamatório com lesões secundárias em diversos tecidos do hospedeiro (MONTGOMERY e colab., 2014). Normalmente, o parasito não circula no sangue do hospedeiro durante a fase intermediária e crônica. Por isso, assume-se que a maior parte das lesões teciduais observadas na DC ocorra na fase aguda da infecção. A fase indeterminada é assintomática, representando cerca de 70% dos indivíduos infectados com o *T. cruzi*. O paciente pode permanecer nessa fase durante décadas ou por toda a vida até que apresente as manifestações clínicas

(CAMPOS, e colab., 2016).

De acordo com Barrias e colab. (2013), 30 a 40% dos pacientes podem desenvolver uma forma crônica e sintomática da doença, que se desenvolve 10-20 anos após a infecção inicial, provocando lesões irreversíveis no coração, esôfago e intestino grosso com alterações na condução nervosa desses órgãos, caracterizando as formas clínicas: cardíaca, digestiva e neurológica.

A forma digestiva da DC é caracterizada por alterações na função motora, secretória e absorptiva do trato gastrointestinal. Ela é encontrada quase que exclusivamente em países ao sul da bacia amazônica (Brasil, Chile, Argentina e Bolívia) e raramente em países da América Central e do Norte (CAMPOS, e colab., 2016). Essa distribuição geográfica ocorre devido a diferenças nas cepas do parasito. As alterações nos órgãos do trato gastrointestinal que se manifestam durante a fase crônica são atribuídas a lesões no plexo mientérico, o qual é um dos componentes do sistema nervoso entérico, resultando em movimentos peristálticos incoordenados, hipertrofia muscular e dilatação de órgãos como esôfago e intestinos (JR e RASSI, 2012). O megaesôfago e o megacólon são as maiores causas de morbidade na forma clínica digestiva da DC crônica, sendo que para o desenvolvimento do megaesôfago é necessário uma redução de aproximadamente 85% do número de neurônios mioentéricos, e no megacólon, uma perda de 50% (MATSUDA e colab., 2009).

Como as manifestações gastrointestinais provocam baixas taxas de mortalidade em comparação com as manifestações cardíacas, elas acabam recebendo menor atenção por parte dos pesquisadores e até mesmo políticas públicas de saúde. No entanto, os pacientes que manifestam a forma digestiva da DC possuem altos índices de morbidade, o que pode resultar em uma qualidade de vida severamente prejudicada (PINAZO e colab., 2010). O tratamento da DC constitui-se basicamente em controlar a replicação do parasito, além do tratamento sintomatológico durante o curso da infecção (MAYA e colab., 2010).

1.2 *Trypanosoma Cruzi*

O protozoário *trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular obrigatório, hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

Possui um complexo ciclo de vida, envolvendo hospedeiro vertebrado, invertebrado e quatro diferentes estágios de desenvolvimento. Existem diferentes formas de vida do *T. cruzi*: tripomastigostas sanguíneas, amastigota, epimastigota e tripomastigota metacíclico (NAGAJYOTHI e colab., 2013). Esse parasita também apresenta diversos mecanismos de evasão da resposta imunológica, inata e adaptativo, envolvendo proteínas de superfície e enzimas antioxidantes, que são cruciais para a persistência da infecção e desenvolvimento da doença crônica (NEVES e colab., 2014)

O protozoário *Trypanosoma cruzi* possui diferentes cepas, que são classificadas em tipos I, II ou III de acordo com suas características genéticas, bioquímica, isoenzimático e imunológica. Essa população heterogênea apresenta subpopulações que circulam entre animais silvestres, domésticos, o homem e o inseto vetor. De acordo com o perfil isoenzimático, as cepas são classificadas em zimodemas (SANTOS e FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. SALVADOR, 2014). Um estudo realizado por Miles e colaboradores (1977), por intermédio da análise do perfil isoenzimático de diferentes isolados de cepas, permitiu a classificação em três zimodemas: Z1, Z2 e Z3. A partir desse estudo foi possível correlacionar a prevalência desses zimodemas nos diferentes reservatórios do parasita. Sendo Z1 e Z3 prevalentes no ambiente silvestre e Z2 no ambiente domiciliar (BARRETT e colab., 1980).

Os reservatórios do parasita são compostos por diferentes mamíferos que são essenciais para manutenção do ciclo doméstico e silvestre para sustentar os ciclos de transmissão. Cães e gatos estão entre os animais que compõem o reservatório doméstico. O reservatório silvestre é composto por animais como os marsupiais, desdentados e roedores. Animais que não se infectam com o parasita podem servir de fonte alimentar para alguns triatomíneos, como pombos e galinhas, facilitando sua instalação no ambiente domiciliar (SANTOS e FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. SALVADOR, 2014)

O ciclo do *T. cruzi* envolve a penetração de tripomastigotas metacíclicos, forma de vida presente nas fezes e urina do inseto vetor, através da mucosa ou pele de vertebrados. Na corrente sanguínea, as tripomastigotas sanguíneas

invadem células do hospedeiro. No citoplasma dessas células, o *T. cruzi* ganha uma forma arredondada e desprovida de flagelos, conhecida como amastigota, a qual se divide por fissão binária. Ao se multiplicarem, as amastigotas rompem a célula hospedeira, e se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneas, podendo infectar uma nova célula. As diferentes formas presentes no ciclo de vida estão associadas a mudanças na expressão gênica do parasita. Um novo ciclo se inicia quando o inseto vetor se alimenta de sangue contendo tripomastigotas sanguíneas (CARDOSO e colab., 2016).

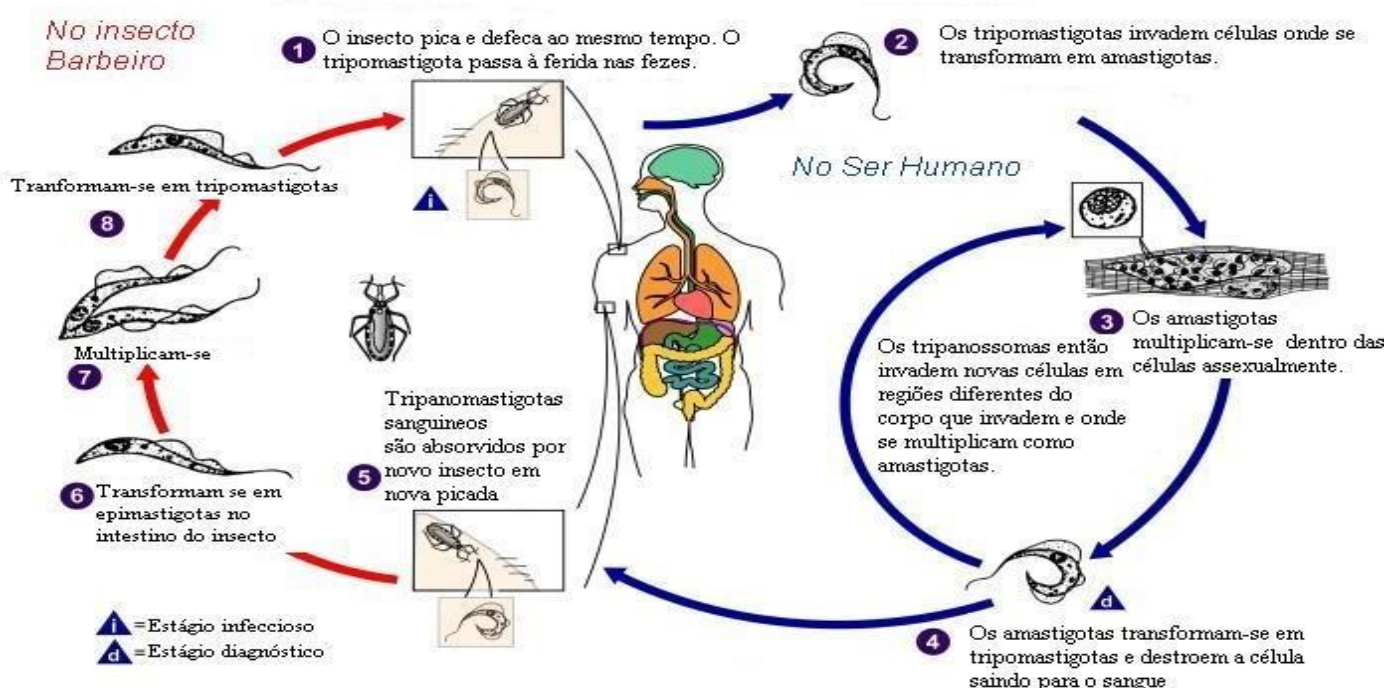


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma Cruzii*. Adaptado de: CDC Centers of Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>. Acesso em 15 de janeiro de 2019.

Para estabelecimento da infecção num hospedeiro vertebrado, mecanismos de evasão imune são necessários, como: escape do fagolisossomo, do sistema complemento, regulação negativa da atividade fagocítica, interferência na transcrição de citocinas secretadas pelos macrófagos, promoção de uma fraca ativação dos receptores do tipo Toll-like, favorecimento de citocinas pro-inflamatórias, anergia de célula T e estratégias

para proteger seus determinantes antigênicos (NAGAJYOTHI e colab., 2013). Além disso, o parasita pode interferir na homeostase do hospedeiro vertebrado em vários níveis, entre sistemas regulatórios, imune, endócrino e neurais (CARDOSO e colab., 2016). Um exemplo, interrupção da homeostase no timo, levando a atrofia desse órgão, como resultado da liberação de glicocorticoides endógenos através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NADY, FREI-DE-LIMA e MORROT, 2014).

Os mecanismos de transmissão da DC são classificados em primário, pela qual a transmissão ocorre por via vetorial, transfusões sanguíneas, oral e congênita; e secundário, pela qual a transmissão ocorre via transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (BELLO CORASSA e colab., 2017).

1.3 TRANSMISSÃO VETORIAL

A transmissão vetorial ocorre através de insetos da família Reduviidae, subfamília triatominae, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Existem cerca de 143 espécies de triatomíneos conhecidas que são divididas em 18 gêneros, distribuídos por todo continente Americano, principalmente na América Latina (RODRIGUES e BORGES-PEREIRA, 2010). No Brasil já foram identificadas 64 espécies de triatomíneos capturadas em regiões peridomicílio e intradomicílio (Figura 2). Os gêneros de maior importância para transmissão da DC são o *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, destacando-se as espécies: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius robustus*. A subfamília triatominae é potencialmente capaz de transmitir as 6 linhagens de *T. cruzi* já descritas (JURBERG e colab., 2014).

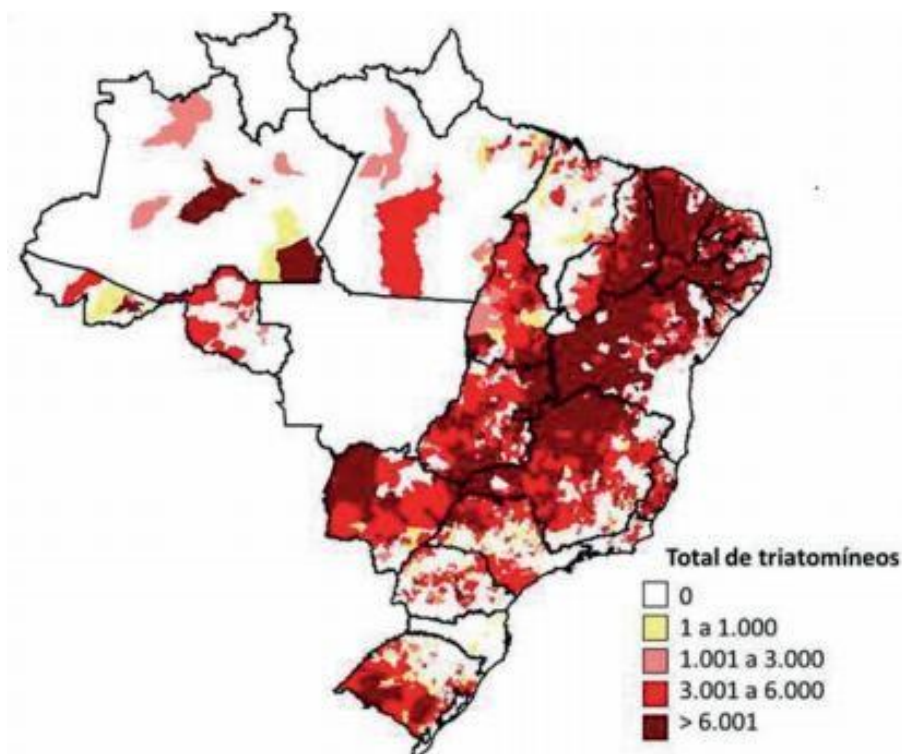


Figura 2. Distribuição quantitativa de triatomíneos capturados em municípios brasileiros no período de 2007 a 2011. Fonte: Boletim epidemiológico da Vigilância Sanitária, 2015.

Entre as espécies capturadas no Brasil, as de maior importância epidemiológica são: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma sordida* e *Triatoma vitticeps*, distribuídos em todo território nacional, como demonstrado na Figura 3 (BRASIL, 2015).

Inicialmente a via de transmissão vetorial era a principal forma de transmissão da DC conhecida e, por isso, a eliminação do vetor era o principal alvo das campanhas de controle da doença. Após anos da descoberta da DC e do início das campanhas, apenas em 2006 que o Brasil recebeu o certificado da Organização Panamericana de Saúde, como livre da transmissão via *Triatoma infestans* (KROPF, 2017).



Figura 3 - Distribuição das espécies de triatomíneo capturados entre 2007 e 2011.

Fonte: Boletim epidemiológico da Vigilância Sanitária, 2015.

1.4 TRANSMISSÃO ORAL

Desde a década de 90, é crescente o número de casos de DC por consumo de alimentos contaminados com o *T. cruzi*, por meio de restos de triatomíneos ou seus resíduos. Entre os alimentos constantemente citados como fonte desses surtos estão o açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu. O consumo de triatomíneos por animais silvestres também é de grande importância, por manter o ciclo silvestre de transmissão do *T. cruzi*. Além do consumo de alimentos contaminados, outros mecanismos de transmissão foram identificados, como por exemplo, o uso de utensílios contaminados (ANTUNES e colab., 2016).

O efeito da rota de transmissão com o desenvolvimento clínico da doença ainda não é compreendido, porém a transmissão oral tem sido responsável pelo aumento dos casos de DC aguda desde os anos 2000, apresentando sintomas

graves com alta taxa de mortalidade (LEWIS e colab., 2018). No Brasil os casos de DC via transmissão oral se concentra na região da bacia amazônica, e em menor proporções em outras regiões do país. Segundo o consenso de 2015, o Estado do Pará, no período de 2005 a 2012, apresentou 75,9% dos surtos registrados no país. Outras regiões também apresentaram surtos, porém isolados, como o registrado em 2005 em Santa Catarina, após o consumo de caldo de cana contaminado (DIAS, João Carlos Pinto e colab., 2016).

1.5 TRANSMISSÃO TRASFUSIONAL

A via de transmissão transfusional é reconhecida desde 1952 como rota de infecção da DC. Essa via, em países endêmicos, chega ser a segunda forma mais comum de se adquirir a doença. Com o surgimento de campanhas em combate ao HIV nos bancos de sangue, houve drástica redução na transmissão via transfusão sanguínea a partir de 1980 em países endêmicos, como resultado do estabelecimento de legislações, criadas de forma autônoma pelos diferentes países (ANGHEBEN e colab., 2015).

Essa via de transmissão ainda é de grande importância, diante a prevalência de indivíduos infectados com o *T. cruzi*, muitas vezes assintomáticos, que associada a migração de pessoas, levando o *T. cruzi* para áreas não endêmicas, sendo essa via uma das principais forma de transmissão em países da Europa, EUA e Canadá (PINTO DIAS, 2013)

1.6 TRANSMISSÃO CONGÊNITA

Estima-se que aproximadamente 15 mil recém nascidos, na América Latina, são infectados de forma congênita pelo *T. cruzi*, onde cerca de 2 milhões de mulheres em idade fértil são infectadas. A transmissão congênita pode ocorrer durante toda a vida fértil da mulher, e se repetir a cada gestação. Sendo essa via de transmissão de grande importância em áreas endêmicas, sendo esses casos tratados como prioridade pelos programas de controle da doença (MARTINS-MELO e colab., 2014).

Entre os casos de infecção congênita, cerca de 60 a 90% são assintomáticas, sem padrão clínico definido, sendo fundamental a triagem

sorológica em gestantes para diagnóstico precoce no recém-nascido. O tratamento precoce se mostra como a melhor forma de prevenção das manifestações crônicas da doença, que podem se manifestar anos após o nascimento (CARLIER e colab.,2015). Após diagnóstico da gestante, é necessário o acompanhamento parasitológico e sorológico da criança por 8 meses após o nascimento. Caso confirmado a infecção na criança, o tratamento com as drogas padrão como o Benznidazol e o Nifurtimox, tem se mostrado efetivo no primeiro ano de vida, prevenindo o desenvolvimento crônico (FUMADÓ e colab., 2014).

1.7 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O trato gastrointestinal é innervado por um sistema nervoso intrínseco: o sistema nervoso entérico (SNE). Esse sistema é responsável pelo controle da motilidade, secreção, absorção, controle local do fluxo sanguíneo e troca de fluidos entre o lúmen e compartimentos corporais (CONSTANTINESCU, 2016). Nos intestinos, o SNE controla as funções contráteis desses órgãos, quase que de forma independente do sistema nervoso central. Além da inervação intrínseca, realizada pelo SNE, o trato gastrointestinal também conta com inervação extrínseca: simpática e parassimpática (FURNESS, J. B., 2000; FURNESS, John B., 2012).

O SNE é encontrado em todo trato gastrointestinal, do esôfago ao reto, estendendo-se para o pâncreas e vesícula biliar. É composto principalmente neurônios e células gliais. As células precursoras do SNE originam-se da crista neural que migram para o tubo gastrointestinal durante o período embrionário. Em humanos, a migração celular ocorre da 4ª a 7ª semana intrauterina. Da 7ª a 10ª ocorre a formação dos gânglios entéricos. Vários fatores estão envolvidos na proliferação, diferenciação e sobrevivência dos componentes do SNE como fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), neurturina, neurotrofina-3 e Sonic hedgehog (NEZEME e SRINIVASAN, 2010).

Em humanos o SNE é composto por população neuronal de aproximadamente 600 milhões de neurônios, que podem ser classificados com base em suas propriedades eletrofisiológicas e histoquímicas em subpopulações funcionalmente distintas (GIORGIO e CAMILLERI, 2004). Já foram identificados cerca de 20 tipos de neurônios entéricos, entre eles os neurônios aferentes

primários intrínsecos, interneurônios, neurônios motores excitatórios e inibitórios, neurônios intestínofugais, neurônios secretomotores e vasodilatadores (Figura 4) (BREHMER e colab., 2005).

Os corpos celulares dos neurônios entéricos se localizam agrupados em gânglios interconectados por feixes de fibras nervosas, presentes em dois grandes plexos ganglionados que compõem o SNE: o mioentérico e o submucoso (BREHMER, Axel e colab., 1999). O plexo mioentérico está localizado entre a camada muscular longitudinal e a camada muscular circular. O plexo submucoso está localizado entre a muscular da mucosa e a muscular circular, demonstrado na Figura 5 (FURNESS, John B., 2006)

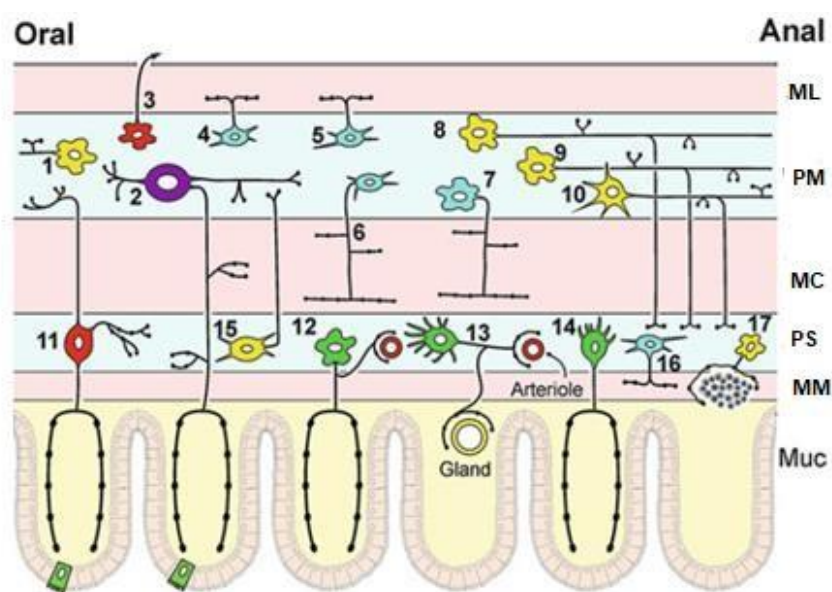


Figura 4. Imagem demonstrando os tipos de neurônios presentes no plexo mioentérico (PM) e submucoso (MS). (1) interneurônios ascendentes; (2) neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANS); (3) neurônios intestínofugais; (4) neurônios motores excitatório da muscular longitudinal (ML); (5) neurônio motor inibitório da muscular longitudinal; (6) neurônios motor excitatório da muscular circular (MC); (7) Neurônios motor inibitório da muscular circular; (8) interneurônios descendentes (reflexo local); (9) Interneurônios descendentes (reflexo secretomotor e motilidade); (10) interneurônios descendentes (complexo mioelétrico migratório); (11) IPANS submucosos; (12) neurônio vasodilatador/ secretomotor não colinérgico; (13) Neurônio secretomotor / vasodilatador colinérgico; (14) Neurônios secretomotores colinérgicos (não vasodilatadores); (15) neurônios uni-axonais projetando-se para o plexo

mioentérico; (16) neurônio motor da muscular da mucosa; (17) inervação dos fragmentos de Peyer. Adaptado Furness, 2006.

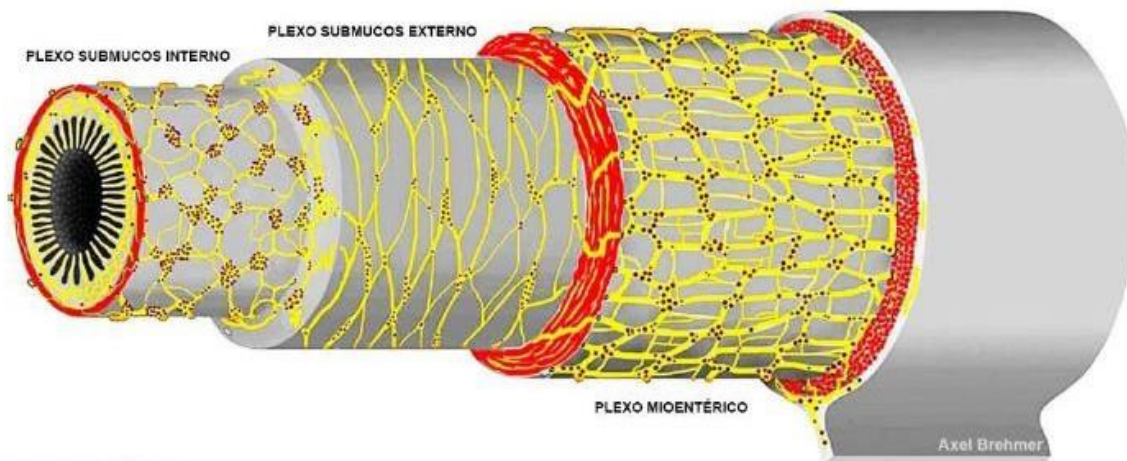


Figura 5 - Localização dos plexos mioentérico e submucoso no trato gastrointestinal (Adaptado de Furness, 2006).

O plexo mioentérico se estende ao longo do trato gastrointestinal, do esôfago ao reto, sendo responsável pelo controle da motilidade do trato gastrointestinal, e também pelo relaxamento e contração dos esfíncteres. Esse plexo é composto por gânglios que variam de tamanho e morfologia entre diferentes regiões do trato gastrointestinal da mesma espécie e de espécies diferentes (FURNESS, 2002). É constituído por: plexo primário, plexo secundário e plexo terciário. Sendo esses, diferentes quanto a sua composição e espessura das fibras nervosas que são responsáveis pela inervação das camadas musculares longitudinal e circular (LOMAX e FURNESS, 2000).

A maior parte dos neurônios do plexo mioentérico são colinérgicos ou nitrérgicos (BREHMER, A. e colab., 2005). Neurônios que não apresentam imunorreatividade a ChAT e Nnos representam uma população muito baixa, cerca de menos de 3% (BECK e colab., 2009). Os neurônios colinérgicos são neurônios motores excitatórios ou interneurônios. Já os neurônios nitrérgicos são, em sua grande maioria, neurônios motores inibitórios (MURPHY e colab., 2007).

O plexo submucoso se localiza nos intestinos delgado e grosso, e embora alguns gânglios sejam encontrados no esôfago e estômago, não é comparado

aos encontrados nos intestinos. Esse plexo se apresenta em forma de uma rede tridimensional, com fibras que cruzam entre si (BREHMER e colab., 2010). Os neurônios desse plexo inervam principalmente a mucosa, onde regulam a secreção de íons, iniciam vias sensoriais intrínsecas locais, medeiam o suprimento sanguíneo da mucosa (FURNESS, 2012).

O peristaltismo intestinal é um dos principais reflexos do sistema digestório. Essa atividade motora ocorre na direção oral-anal e é determinada por um estímulo que gera contração proximal da camada muscular, simultânea ao relaxamento da porção distal. Um exemplo de contrações peristálticas é o Complexo Motor Migratório (CMM) que ocorre em períodos de jejum ou interdigestivos com a função de limpeza do trato gastrointestinal, retirando restos alimentares e secretórios (FILHO e ZILBERSTEIN, 1998).

Danos no plexo mioentérico resulta em perda da coordenação contrátil no trato gastrointestinal, levando a retenção do conteúdo luminal, resultando em obstrução do órgão e distensão das fibras musculares, com consequente hipertrofia (CAMPOS e colab., 2016; SMITH, 1970).

1.8 NEUROTRANSMISSORES

Os neurotransmissores agem na membrana pós-sináptica de um neurônio ou em células musculares ou glandulares, aumentando ou diminuindo de forma transitória sua permeabilidade a íons como Na^+ , K^+ e Ca^{++} . O aumento da permeabilidade a íons pode levar a despolarização da membrana celular e geração de um potencial de ação. Na célula muscular, esse potencial de ação desencadeia a contração muscular. O SNE possui mais de 30 moléculas mensageiras sendo os principais neurotransmissores primários: a acetilcolina, taquicininas, óxido nítrico, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), trifosfato de adenosina (ATP) e serotonina (5-HT) (SPILLER e GRUNDY, 2004).

Os neurotransmissores, assim como, alguns receptores, enzimas e proteínas citoesquelética, são utilizados como marcadores moleculares, possibilitando a discriminação de classes funcionais de neurônios entéricos. Esses marcadores compõem o código químico de cada neurônios (WOOD, 2016).

A acetilcolina (Ach) é um neurotransmissor encontrado tanto no SNC como no SNE, e atua predominantemente na indução da contração do músculo

liso (ILNO e NOJYO, 2006). No SNE, a Ach é liberada por neurônios motores excitatórios e interneurônios descendentes desencadeando contrações no trato gastrointestinal (FURNESS, J. B., 2000). A sinalização da acetilcolina ocorre via receptores de superfície celular nicotínicos ou muscarínicos. Os potenciais pós-sinápticos gerados pela acetilcolina são variáveis de acordo com o receptor de superfície. Os receptores nicotínicos medeiam uma transmissão excitatória mais rápida, já os receptores muscarínicos medeiam uma resposta excitatória mais lenta. Ambas as classes de receptores são encontradas em células efectoras, como a célula muscular lisa e terminais nervosos. Esses receptores também são expressos nas células intersticiais de Cajal (ICC) e em células do sistema imunológico, como macrófagos (ILNO e NOJYO, 2006; HARRINGTON e colab., 2010)

Jabari e colab. (2014) demonstraram que pacientes com megacólon chagásico apresentam uma drástica perda dos neurônios colinérgicos, utilizando marcação imuno-histoquímica da enzima colina acetil transferase (ChAT), a qual participa da produção de acetilcolina e é expressa em neurônios motores excitatórios. Demonstraram ainda que essa desnervação não se restringia apenas as regiões de dilatações do colo. Em outro estudo também demonstraram que os paciente com megacólon chagásico também apresentam diminuição de fibras nervosas colinérgicas nas camadas musculares longitudinal e circular (JABARI e colab., 2011, 2012).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, que atua como neurotransmissor inibitório. No SNE, a alta difusibilidade do NO, faz com que a sinalização ocorra de forma direta a nível intracelular sem a necessidade de receptores transmembranosos (FILHO e ZILBERSTEIN, 1998). O NO atua na célula através da ativação da enzima guanilato ciclase que leva a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A GMPc possui importante papel para o desempenho da ação fisiológica do NO, promovendo diminuição da entrada de Ca^{++} para o citoplasma, e assim, relaxamento da célula muscular (DUSSE e colab. 2003). O óxido nítrico também atua como uma molécula pró-inflamatória em células do sistema imunológico, como o macrófago (FILHO e ZILBERSTEIN, 1998).

Pacientes com megacólon chagásico apresentam uma maior sobrevivência da população neuronal imunorreativa a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS),

como demonstrado por Jabari e colab. (2011), na qual além dessa maior sobrevida, sua pesquisa também revelou um aumento no número dessa população neuronal.

1.9 MEGACÓLON CHAGÁSICO

Fatores relacionados ao parasita como tropismo tecidual, influência de forma decisiva a evolução clínica na DC. Outro fator importante está relacionado a resposta imunológica do paciente. Embora não totalmente elucidado a patogênese do desenvolvimento das alterações gastrointestinal, estudos indicam a existência de mecanismos mistos, com participação direta do parasita e reações autoimunes (PINAZO e colab., 2010). O desenvolvimento da disfunção peristáltica e megacólon é resultado da desnervação dos neurônios no sistema nervoso entérico no plexo miontérico (MATSUDA e colab., 2009). Além da perda neuronal, também ocorre decréscimo de outras populações celulares, como células da glia e células intersticiais de Cajal. Outra alteração encontrada é o espessamento das camadas musculares externa e mucosa, e proliferação de tecido conjuntivo (JABARI e colab., 2014).

Acredita-se que na fase aguda as lesões se iniciam com a invasão direta dos parasitas nos tecidos do sistema digestivo, resultando em ganglionites e lesão neuronais degenerativas. Na fase crônica, as lesões continuam a ocorrer como resultado de reações autoimunes (CUNHA-NETO e colab., 1996). Embora o megacólon chagásico apresente sintomas e achados radiológicos semelhantes ao megacólon congênito, os danos no sistema nervoso entérico ocorre tanto na inervação excitatória como na inibitória (JABARI e colab., 2014). Na fase crônica, estudos de imunohistoquímica revelam a ausência do parasito nas lesões. Em contraste, são encontrados epítomos de antígenos do parasito induzindo reação cruzada com epítomos nos tecidos do hospedeiro. Também são encontrados anticorpos contra o parasito mediando reatividade celular, além da presença de células T autorreativas. Sugerindo a existência de mimetismo molecular entre componentes do hospedeiro e o *T. cruzi* (DUTRA e colab., 2009).

A noção de que a DC possui componentes autoimunes foi primeiramente demonstrado por Cossio e colab. (1974), onde relataram a presença de anticorpos presentes do soro de pacientes chagásicos que reagem contra o tecido cardíaco e que eram ausentes em pacientes sem a doença, e com cardiomiopatia não

chagásica. Outro achado que corrobora com a hipótese da autoimune para o desenvolvimento das manifestações crônicas da DC, foi através da transferência de células T CD4+ de camundongos com miocardite chagásica para animais saudáveis, resultando em dano cardíaco (CUNHA-NETO e colab., 2004; KIERSZENBAUM, 1999).

A partir dessas descobertas, alguns autoanticorpos foram sendo identificados, como anticorpos contra o receptor muscarínico da acetilcolina e anti- F1-160. A interação do receptor com o anticorpo anti receptor de acetilcolina desencadeiam sinais intracelulares que alteram o comportamento fisiológico do alvo, induzindo dessensibilização e / ou regulação negativa dos receptores, podendo levar a um bloqueio progressivo desses receptores e desnervação simpática e parassimpática (STERIN-BORDA e BORDA, 2006).

A FL-160 é uma proteína associada ao flagelo, e o anticorpo anti-FL-160 reage de forma cruzada contra a proteína 48kDa, proteína expressa no sistema nervos central, periférico e no plexo miontérico (VAN VOORHIS e EISEN, 1989). Sendo esse antígeno candidato, como mecanismos para explicar a patogênese do desenvolvimento do megacólon e megaesôfago. Uma possível explicação seria a falta de mielinização no plexo miontérico, expondo seus antígenos as células imunes circulantes, deixando-os mais susceptíveis a destruição (DE BONA e colab., 2018). A citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, via receptor Fc, além da ativação de sistema complemento, contribui para o desenvolvimento das lesões teciduais que são observadas na doença, e também na progressão para as formas sintomáticas (SOARES e colab., 2001)

1.10 BENZNIDAZOL

O benznidazol (BZN), descoberto na década de 70, é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da DC. Sua patente foi transferida pela Roche para o governo brasileiro em 2004. Esse medicamento apresenta eficácia limitada dependendo da fase da doença, além de apresentar efeitos adversos, que muito frequentemente, levam à interrupção do tratamento pelo paciente (DAVANÇO, 2015). Esse fármaco apresenta atividade nucleofílica, onde o grupo nitro da molécula de BZN, é reduzido a grupo amino, através de nitroredutases. Esse grupo nitro possui ação tripanocida, através da formação de ligações

covalentes com macromoléculas do parasita, como o DNA nuclear e mitocondrial, lipídios e proteínas. Outros mecanismos de ação deste fármaco, é através do aumento da fagocitose, pelo aumento da produção de Interferon gama e através do bloqueio da enzima NADH-fumarato, bloqueando o crescimento do parasito (CASTRO e SOEIRO, 2017).

O BZN possui ação tripanocida comprovada, com índice de cura de 76-80% dos infectados, porém possui eficácia limitada na fase crônica. Esse medicamento é metabolizado no fígado pelo citocromo P450 redutase, onde gera produtos tóxicos (SALES JUNIOR e colab., 2017). O perfil tóxico do BZN leva a 20% dos pacientes a abandonarem o tratamento, devido a reações adversas de hipersensibilidade dermatológica, que variam de intensidade leve (90% dos pacientes), moderada (9% dos pacientes) e grave (1%). Outras manifestações são hematológicas, como a depressão de medula óssea, digestivos, articulares e neurológicos (HASSLOCHER-MORENO e colab., 2012). Apesar da sua toxicidade o BZN possui uma melhor tolerabilidade e maior eficácia quando comparado ao nifurtimux, outro fármaco com ação tripanocida (VINUESA e colab., 2017, CARDOSO, Clareci Silva e colab., 2018).

Estudos como o realizado por Garcia e colab. (2005) demonstram que o tratamento na fase crônica com BZN diminui a progressão da doença, em um modelo de insuficiência cardíaca, quando comparado a animais que não receberam o tratamento, porém o tratamento não impede o desenvolvimento da doença. O mesmo é observado no SNE, uso do BZN em modelo murino de DC, se mostra eficiente no controle do parasito, porém não é suficiente para que não haja o desenvolvimento das alterações crônicas. Esse modelo é utilizado para estudo das alterações crônicas da DC por fazer com que o animal evolua para fase crônica em um curto período de tempo, como demonstrado por MOREIRA e colab (2010), MOREIRA e colab. (2014) e CAÇADO (2002). O tratamento antiparasitário na fase crônica deve ser considerado de forma individualizada, considerando a faixa etária do paciente, o tempo em que ocorreu a fase aguda e a gravidade das manifestações clínicas que apresentadas paciente (DIAS, João Carlos Pinto e colab., 2016).

1.11 ASPIRINA

A aspirina (ASA) contém o ácido acetilsalicílico como substância ativa e atua como um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). A ação da aspirina na COX leva a formação de epímeros de lipoxinas (15-epi-lipoxina A4) através da acetilação de seu sítio ativo, direcionando o metabolismo do ácido araquidônico para produção de ácido 15 (R)-hidroxiexosicosatetraenóico, substrato para 5-lipoxigenase. As lipoxinas possuem atividade anti-inflamatória e pró-resolução, e são produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico pelas lipoxigenases (GONZÁLEZ-HERRERA, e colab., 2017). Entre as ações anti-inflamatórias das lipoxinas estão a inibição de formação do infiltrado neutrofílico, inibição do fator de transcrição NF- κ B e expressão de IL-10. O receptor de lipoxina FPR2/ALX é um receptor acoplado a proteína G, que pertence a família dos receptores FPR (formyl peptide receptor) expresso em diversos tecidos e tipos celulares, como macrófago e neutrófilo (SORDI, 2012).

Durante a fase aguda da DC, há um estado de imunossupressão evidenciado por uma baixa resposta humoral sobre antígenos parasitários específicos e não específicos, pela inibição da proliferação e apoptose de células T, além de liberação de mediadores inflamatórios como a prostaglandina, possibilitando que o *T. cruzi* possa evadir-se do sistema imune (MAYA e colab., 2010). Esse estado é mediado pela prostaglandina E2 (PGE2). As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico por meio da ação da COX. A PGE2 é um potente imunomodulador, com efeitos tanto estimuladores quanto inibidores (ABDALLA e colab. 2008).

Um estudo realizado por Molina-Berríos e colab. (2013), sugeriu que inibidores de COX são promissoras ferramentas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Neste sentido, Oda e colab. (2016) avaliaram o uso de baixas doses de ASA durante a fase aguda e crônica da infecção causada pelo *T. cruzi* em camundongos Swiss, demonstrando que o uso desse antiinflamatório reduziu a parasitemia, e o tratamento durante a fase aguda ou crônica reduziu a intensidade dos focos inflamatórios no cólon, além de apresentar efeito protetor aos neurônios mioentéricos e recuperar o trânsito gastrointestinal dos animais. Além disso, o uso da ASA se mostrou dose-dependente, uma vez que doses

baixas (25 a 50mg/kg) exerceram efeito protetor para o hospedeiro e doses acima de 50mg/kg aumentam a parasitemia e a taxa de mortalidade do hospedeiro (MOLINA-BERRÍOS e colab. 2013). O esôfago desses animais foi avaliado por Massocatto e colab. (2017), porém o tratamento não demonstrou efeito positivo sobre a parede esofágica e nem sobre os neurônios mioentéricos. **Objetivos**

Objetivo geral

Avaliar a eficácia do tratamento isolado e combinado de Benznidazol (BZN) e Aspirina (ASA) sobre a população neuronal do plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

Verificar o efeito do tratamento isolado e combinado de BZN e ASA sobre a sobrevivência de camundongos BALB/c infectados com o *T.cruzi*.

Analisar o efeito do tratamento combinado de BZN e ASA sobre as lesões no plexo mioentérico de camundongos BALB/c causadas pela infecção chagásica.

REFERENCIAS

- ABDALLA, G.K, FARIA, K.T, CASTRO, E.C.C, REIS, M.A, MICHELIN, M.A. ***Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in imune response during the acute phase of experimental infection.** Experimental parasitology. 2008; 118:514-521.
- ANTUNES, A. F, MADURO, S,G, PEREIRA, B.V, BARBOSA M.D, FERREIRA, J.M.**Doença Cardíaca Crônica após Tratamento da Doença de Chagas Aguda Oral.** Arq Bras Cardiol. 2016; 107 (2): 184-6.
- ANGHBEN, A.S, BOIX, L, BUONFRATE D, e colab. **Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries.** Blood Transfus. 2015;13(4):540-50.
- (ARQ e CIR, 2018) ARQ, Abcd e CIR, Bras. **Original Article RADIOLOGICAL STUDY OF MEGACOLON IN.** v. 31, n. 1, p. 5-8, 2018.
- BARRIAS, E.S.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. **Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.** Frontiers in Immunology, v. 4, p. PMC3730053, 2013.
- BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G. TEIXEIRA, R. & ALMEIDA DE SOUZA, J. A. **Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:84-89, 1980.
- BECK, Martin e colab. **ChAT and NOS in human myenteric neurons: Co-existence and co-absence.** Cell and Tissue Research, v. 338, n. 1, p. 37-51, 2009.
- BELLO CORASSA, Rafael e colab. **Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review.** Perspectives in Public Health, v. 137, n. 5, p. 289-295, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, p. 444, 2010.
- BREHMER, A. e colab. **Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut.** Histochemistry and Cell Biology, v. 123, n. 2, p. 131-138, 2005.
- BREHMER, Axel e SCHRÖDL, Falk e NEUHUBER, Winfried. **Morphological classifications of enteric neurons - 100 years after Dogiel.** Anatomy and Embryology, v. 200, n. 2, p. 125-135, 1999.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.
- CAMPOS, Camila França e colab. **Enteric neuronal damage, intramuscular denervation and smooth muscle phenotype changes as mechanisms of Chagasic megacolon: Evidence from a long-term murine model of**

trypanosoma cruzi infection. PLoS ONE, v. 11, n. 4, p. 1-18, 2016.

CARDOSO, Mariana S. e REIS-CUNHA, João Luís e BARTHOLOMEU, Daniella C. **Evasion of the immune response by trypanosoma cruzi during acute infection.** Frontiers in Immunology, v. 6, n. JAN, p. 1-15, 2016.

CONSTANTINESCU, Michael. **The enteric nervous system.** Neuro-Immuno-Gastroenterology, v. 366, n. 1, p. 23-38, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.012>>.

CUNHA-NETO, Edecio e colab. **Autoimmunity in Chagas' Disease.** Infection and Autoimmunity, 2nd edition, v. 98, n. 8, p. 449-466, 2004.

DA SILVEIRA, Alexandre Barcelos Morais e colab. **Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells.** Human Pathology, v. 38, n. 8, p. 1256-1264, 2007.

DAVANÇO, Marcelo. **Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada.** Aleph, 2015.

DE BONA, Elidiana e colab. **Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy?** Frontiers in Immunology, v. 9, n. AUG, p. 1-8, 2018.

DE GIORGIO, R. e CAMILLERI, M. **Human enteric neuropathies: Morphology and molecular pathology.** Neurogastroenterology and Motility, v. 16, n. 5, p. 515-531, 2004.

DIAS, J. C.P. e SILVEIRA, A. C. e SCHOFIELD, C. J. **The impact of Chagas disease control in Latin America - A review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DIAS, João Carlos Pinto e colab. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.** Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil, v. 25, n. spe, p. 7-86, 2016.

SANT'ANA DUSSE, Luci Maria e VIEIRA, Lauro Mello e CARVALHO, Maria das Graças. **Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v39n4/18548.pdf>>.

DUTRA, Walderez Ornelas e colab. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 208-218, 2009.

FUMADÓ, Victoria e colab. **Chagas pediátrico en zona no endémica.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v. 32, n. 5, p. 293-296, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.024>>.

FURNESS, J. B. **Types of neurons in the enteric nervous system.** Journal of the Autonomic Nervous System, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000a.

FURNESS, J. B. **Types of neurons in the enteric nervous system.** [S.l.]: International Brain Research Organisation, 2000b. v. 81. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-025501-9.50016-8>>.

FURNESS, John B. **The enteric nervous system and neurogastroenterology**. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>>.

FURNESS, John B. **The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections**. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, v. 130, n. 1-2, p. 1-5, 2006.

GARCIA, Simone e colab. **Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

HARRINGTON, Andrea M. e HUTSON, John M. e SOUTHWELL, Bridget R. **Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system**. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, v. 44, n. 4, p. 173-202, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.proghi.2009.10.001>>.

HASSLOCHER-MORENO, Alejandro M. e colab. **Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, n. 5, p. 1261-1266, 2012.

JABARI, Samir e colab. **Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures**. Histochemistry and Cell Biology, v. 142, n. 3, p. 235-244, 2014.

JABARI, Samir e colab. **Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon**. Histochemistry and Cell Biology, v. 135, n. 1, p. 47-57, 2011.

JABARI, Samir e colab. **Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon**. International Journal of Colorectal Disease, v. 27, n. 9, p. 1181-1189, 2012.

JR, Anis Rassi e RASSI, Anis. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease)**. Changes, v. 26, p. 275-291, 2012.

KIERSZENBAUM, Felipe. **Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis**. Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 2, p. 210-223, 1999.

MAGGI, Carlo Alberto. **Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system**. Regulatory Peptides, v. 93, n. 1-3, p. 53-64, 2000.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio e colab. **Systematic review: Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil: A systematic review and meta-analysis**. Tropical Medicine and International Health, v. 19, n. 8, p. 943-957, 2014.

MATSUDA, Nilce Mitiko e MILLER, Steven M. e EVORA, Paulo R.Barbosa. **The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease**. Clinics, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MOREIRA, N. M.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A.; et al. Neuronal

changes caused by trypanosoma cruzi: An experimental model. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 83, n. 2, p. 545-555, 2011.

MOREIRA, N. M.; ZANONI, J. N.; DE OLIVEIRA DALÁLIO, M. M.; et al. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 68-74, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.005>> .

NAGAJYOTHI, Fnu e colab. **disease**. v. 14, n. 5, p. 634-643, 2013.

ODA, Juliano Yasuo. **TRATAMENTO COM BAIXAS DOSES DE ASPIRINA NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA INFECÇÃO MURINA POR Trypanosoma cruzi PROMOVE NEUROPROTEÇÃO**. 2016.

PINAZO, María Jesús e colab. **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic**. Gastroenterologia y Hepatologia, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2010.

PINTO DIAS, João Carlos. **Human chagas disease and migration in the context of globalization: Some particular aspects**. Journal of Tropical Medicine, v. 2013, 2013.

SANTOS, Carlos Gustavo Silva Dos e FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. SALVADOR, BA, Brasil. **Caracterização molecular de cepas de Trypanosoma Cruzi isolada na zona urbana da cidade de Salvador/Ba**. 2014. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/11406>>.

SMITH, Barabara. **Progress report Disorders of the myenteric plexus**. Gut, v. 11, p. 271-274, 1970.

STERIN-BORDA, LEONOR e BORDA, ENRI. **Role of Neurotransmitter Autoantibodies in the Pathogenesis of Chagasic Peripheral Dysautonomia**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 917, n. 1, p. 273-280, 2006.

VAN VOORHIS, W. C. e EISEN, H. **FI-160. A surface antigen of Trypanosoma cruzi that mimics mammalian nervous tissue**. Journal of Experimental Medicine, v. 169, n. 3, p. 641-652, 1989.

VINUESA, Teresa e colab. **Benznidazole nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 5, p. 1469-1476, 2017.

WOOD, Jackie D. **Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility**. Digestive Diseases and Sciences, v. 61, n. 7, p. 1803-1816, 2016.

This paper will be submitted as an ORIGINAL ARTICLE to the **Neurogastroenterology & Motility Journal** (Impact factor: 3.179; qualis/CAPES A2)

COMBINED TREATMENT USING ASPIRIN AND BENZNIDAZOLE IS EFFECTIVE TO PREVENT MYENTERIC NEURONAL LOSS IN EXPERIMENTAL CHAGAS DISEASE

Running Title: Neuropreservation of aspirin and benznidazole in infection with *trypanosoma cruzi*

J. H.R. Dionisio¹; R. S. Pereira²; P.S Watanabe¹; J. D. Mendes¹; C.R Basso¹; C.C.A. Machado¹ P. Pinge-Filho²; E.J.A. Araújo¹

1. Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil
2. Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Address for correspondence

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo
Department of Histology, State University of Londrina
Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brazil
Tel: +55 (43) 3371 4327
ejaraujo@gmail.com

Resumo

Introdução: A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). As manifestações clínicas da DC surgem durante a fase crônica da doença e são representadas por alterações cardíacas e digestivas (megacólon e megaesôfago). O medicamento padrão utilizado para o tratamento da DC é o Benznidazol (BZN), porém não possui grande eficácia durante a fase crônica. Seu uso não impede o desenvolvimento das disfunções digestivas. Recentemente, estudos com baixas doses de Aspirina (ASA) têm apresentado bons resultados no controle da parasitemia do *T. cruzi* e proteção de neurônios entéricos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia do tratamento isolado e combinado do Benznidazol e Aspirina sobre o plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*. **Materiais métodos:** Camundongos machos BALB/c foram distribuídos em cinco grupos (n=5): controle, infectado sem tratamento; infectado+ASA, infectado+BZN e infectado+ASA+BZN (CEUA/UJEL nº 03/2019). Os camundongos foram infectados via intraperitoneal, com 5×10^2 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Quarenta e oito horas após a infecção, os tratamentos foram iniciados com duração de trinta dias. A dose de ASA e BZN foi de 25mg/kg/dia, via gavagem. A parasitemia dos animais foi analisada em dias alternados a partir do segundo dia pós-infecção durante 30 dias. A taxa de sobrevivência dos animais foi avaliada durante todo o experimento. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 180 dias após a infecção. O comprimento e largura do cólon foram medidos para cálculo da área do órgão. As amostras de cólon foram submetidas a técnica de imunofluorescência para marcação de neurônios gerais (PGP9.5+), colinérgicos (ChAT+) e nitrérgicos (nNOS+). **Resultados:** A parasitemia comprova a infecção dos animais pelo *T. cruzi*. Os animais infectados sem tratamento e infectados+ASA apresentaram alta taxa de mortalidade e intensa redução na densidade populacional de neurônios mioentéricos gerais e colinérgicos comparado ao controle. Todos os animais infectados, sem ou com tratamento, apresentaram aumento da área do cólon. O tratamento com a ASA de forma isolada não foi suficiente para controle da parasitemia, o que refletiu negativamente na taxa de sobrevivência dos animais e ainda redução das populações neuronais mioentéricas gerais e subpopulação colinérgica, além de apresentar alterações morfológicas (hipertrofia) sobre a subpopulação colinérgica e nitrérgica. O tratamento isolado com BZN promoveu diminuição na parasitemia e maior taxa de sobrevivência, porém não foi eficiente para neuroproteção. Os corpos celulares dos neurônios nitrérgicos tratados com BZN apresentaram atrofia. O tratamento combinado ASA+BZN promoveu redução na parasitemia, alta taxa de sobrevivência, e neuroproteção dos neurônios gerais e subpopulação colinérgica no cólon dos camundongos. Os neurônios nitrérgicos tratados ASA+BZN apresentaram hipertrofia. As demais populações não apresentaram alterações morfológicas significativas. A densidade populacional de neurônios nitrérgicos não foi alterada pela infecção e tratamentos. **Conclusão:** O tratamento combinado da ASA+BZN mostrou-se mais efetivo em promover neuroproteção do plexo mioentérico, do que quando administrados de forma isolada.

Palavras-chave: Doença de chagas, megacólon e neuroproteção

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) é a manifestação clínica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*)¹. Sua transmissão ocorre através do

contato com as fezes contaminadas do inseto triatomíneo, transmissão vetorial^{7,8} e oral^{9,10}, e também de forma congênita⁴⁰. A DC é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada², estima-se que mundialmente existam 7 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*⁴, e 60 milhões em área de risco, sendo essas áreas localizadas principalmente na América Latina³. No Brasil, existe cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, distribuídas em todo território nacional, representando uma das quatro maiores causas de morte provocada por doença parasitária^{5,6}.

A DC pode ser classificada em fase aguda, fase intermediária e fase crônica. A fase aguda possui duração de aproximadamente dois a três meses, em pacientes humanos, e caracteriza-se por sintomas não específicos. Durante a fase aguda é possível observar os parasitos circulantes na corrente sanguínea. Normalmente, o parasito não circula no sangue do hospedeiro durante a fase indeterminada e crônica. A fase indeterminada é assintomática e representa 70% dos casos de infecção pelo *T. cruzi*.

Dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, 30 a 40% podem desenvolver a forma crônica e sintomática da doença, caracterizada principalmente por alterações cardíacas e digestivas¹⁴. As formas clínicas da DC podem levar de 10-20 anos após a infecção inicial para se desenvolver, provocando lesões irreversíveis no coração, esôfago (megaesôfago) e intestino grosso (megacólon) com alteração na condução nervosa desses órgãos¹⁵.

O megacólon ocorre em cerca de 20% dos pacientes infectados cronicamente⁶⁵. O desenvolvimento do megacólon é decorrente de lesões no plexo mioentérico, que prejudicam a função motora, secretória e absorptiva do trato gastrointestinal¹⁶. Nos vertebrados, o plexo mioentérico é composto por neurônios excitatórios e inibitórios que se projetam para as camadas musculares longitudinal e circular⁶⁶. O neurônios excitatórios são colinérgicos, e possuem a enzima colina acetil transferase (ChAT) para síntese da acetilcolina⁵². Os neurônios inibitórios são nitrérgicos, possuem a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) para síntese do neurotransmissor óxido nítrico (NO)⁵⁶.

A manifestação gastrointestinais são encontradas quase que exclusivamente em países ao sul da bacia amazônica (Brasil, Chile, Argentina e Bolívia) e raramente em países da América Central e do Norte^{1,16}. Por

provocarem baixas taxas de mortalidade em comparação com as manifestações cardíacas, acabam recebendo pouca atenção por parte dos pesquisadores e até mesmo políticas públicas de saúde. No entanto, os pacientes que manifestam a forma digestiva da DC possuem altos índices de morbidade, o que resulta em uma qualidade de vida severamente prejudicada^{6,11}.

Embora não esteja totalmente elucidada a patogênese do desenvolvimento das alterações gastrointestinais, estudos indicam a existência de mecanismos mistos, com participação direta do parasita e reações autoimunes^{17,18,20,21,22,23}. Acredita-se que, na fase aguda, as lesões se iniciam com a invasão direta do protozoário nos tecidos do tubo digestório, resultando em ganglionite e lesão neuronais degenerativas²⁴. Na fase crônica, as lesões continuam a ocorrer como resultado de reações autoimunes^{21,25}.

O tratamento da DC constitui-se basicamente em controlar a replicação do parasito, além do tratamento sintomatológico durante o curso da infecção^{26,27}. O Benznidazol (BZN) (Rochagan®, Roche Pharmaceutical, patente doada ao Ministério da Saúde, Brasil) é medicamento padrão utilizado para o tratamento da DC^{28,29,30,31,32}. Estudos como o realizado por Garcia e colab.(2009)³⁴ demonstram que o tratamento na fase crônica com BZN não impede, mas diminui a progressão da DC em um modelo de insuficiência cardíaca.

O tratamento para DC com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como a aspirina (ASA), demonstrou exercer efeito protetor para o hospedeiro se for administrada em doses baixas (25 a 50mg/kg)^{35,36,41}. Oda e colab. (2016) utilizando camundongos *Swiss* como modelo experimental, demonstraram o efeito neuroprotetor de baixas doses de ASA, administrada na fase aguda ou crônica, sobre as lesões mioentéricas provocadas pela infecção causada pelo *T.cruzi*. A ASA contém o ácido acetilsalicílico como substância ativa e atua como inibidor das ciclooxigenases (COX-1/COX-2). A ação da aspirina na COX leva a formação de epímeros de lipoxinas. A lipoxinas possuem atividade anti-inflamatória e pró-resolução, e são produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pelas lipoxigenases^{37,38}.

Tendo em vista os mecanismos de ação do BZN e da ASA, López-Muñoz e colab. (2010)³⁹, demonstraram que a ASA aumenta a atividade tripanocida do BZN em um modelo *in vitro* de infecção por *T. cruzi*, sendo uma base

experimental de uma estratégia terapêutica potencialmente nova para o controle da DC. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento isolado e combinado de BZN e ASA sobre a população neuronal do plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina CEUA/UEL nº 03/2019. Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c machos de 8 a 12 semanas de idade, obtidos do Biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia – CEMIB/UNICAMP. Mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da UEL em gaiolas coletivas de polipropileno medindo 30 X 20 X 13 cm, contendo até 5 animais cada. Água e ração (NUVITAL, CR1, Colombo, PR) autoclavadas e fornecidos “*ad libitum*”.

2.1 Animais

Os camundongos BALB/c foram infectados por via intraperitoneal, com 5×10^2 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Cepa Y), obtidas por punção cardíaca de camundongos *Swiss* inoculados semanalmente pela via intraperitoneal com 2×10^5 formas sanguíneas, usadas para a manutenção de *T. cruzi* “*in vivo*”.

2.2 Grupos Experimentais

Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos, sendo eles: grupo controle - composto por camundongos não infectados e sem tratamento; grupo infectado - composto por camundongos infectados sem nenhum tratamento; grupo infectado+ASA – composto por animais infectados e que receberam somente o tratamento com a Aspirina; grupo infectado+BZN – composto por animais infectados e que receberam tratamento apenas com Benznidazol; grupo inectaso+ASA+BZN – composto por animais infectados e que receberam o tratamento combinado de Aspirina e Benznidazol. A administração dos medicamentos iniciou-se quarenta e oito horas após a infecção, via gavagem. A

dose de ASA de 25 mg/Kg/dia foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 10% do volume total da água autoclavada e 25 mg/Kg/dia de BZN em água autoclavada. O tratamento teve duração de trinta dias. O grupo sem infecção e sem tratamento (controle negativo) foram tratados com veículo (água autoclavada) pela mesma via.

2.3 Parasitemia e sobrevida dos animais

A avaliação da presença de parasitos circulantes foi realizada utilizando a técnica de Brener (1962) em dias alternados a partir do terceiro dia de infecção, pela contagem de 50 campos em microscópio óptico no aumento de 400x, do número de parasitos presentes em 5 µL de sangue heparinizado coletado da cauda dos camundongos. Os resultados foram expressos em número de parasitos/mL de sangue. Paralelamente, a taxa de sobrevida dos camundongos infectados tratados ou não foram avaliados durante os 180 dias pós-infecção.

2.4 Eutanásia e coleta do cólon

Após cento e oitenta dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia utilizando uma combinação de ketamina (15 mg/kg) e xilazina (35 mg/kg) por via intraperitoneal e, em seguida, realizado o deslocamento cervical. O cólon foi coletado e o comprimento e largura medidos para cálculo da área total, visando utilizá-la como fator de correção para a densidade populacional de neurônios mioentéricos.

2.5 Análise morfológica do plexo mioentérico

Os cólons foram lavados em solução de PBS 0,1M pH7,4, e fixados em paraformaldeído 4% tamponado com PBS visando a realização da técnica de imunofluorescência para evidenciação de neurônios mioentéricos. Fragmentos de 1 cm do cólon foram dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico e pinças de cirurgia oftálmica, visando retirada das camadas mucosa e submucosa, para exposição do plexo mioentérico na camada muscular.

Os preparados totais contendo apenas a camada muscular (e o plexo mioentérico) foram adicionados a uma solução composta por 9 mL de tampão acetato, 41 mL de tampão citrato em 500 mL de água destilada (pH 6,0) e 250

μL de Tween 20. O material foi aquecido em micro-ondas até atingirem a temperatura de 90°C . Essa etapa foi realizada visando a recuperação antigênica. Em temperatura ambiente ($24\text{-}26^{\circ}\text{C}$), os preparados totais foram lavados três vezes por 5 minutos sob agitação com PBS 0,1 M. Em seguida realizado o bloqueio antigênico, momento em que os preparados totais foram imersos em um eppendorf contendo $200\ \mu\text{L}$ de solução composta por PBS 0,1M, Triton 0,1% e BSA 3%, permanecendo sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após essa etapa, eles foram lavados novamente com PBS 0,1 M três vezes de 5 minutos sob agitação. Em seguida, os preparados totais foram incubados como anticorpo primário visando a marcação da população neuronal geral (anti-PGP9.5), população neuronal colinérgica (anti-ChAT) e neurônios nitrérgicos (anti-nNOS)(Tabela 1) em uma solução de PBS 0,1M, Triton 0,1% e BSA 3% por 48 horas a temperatura ambiente.

Em seguida, os preparados totais foram lavados três vezes por 5 minutos sob agitação com PBS 0,1 M e incubados com o anticorpo secundário (Tabela 2) em uma solução de PBS 0,1M, Triton 0,1% e BSA 3% por 2 horas a temperatura ambiente. A partir dessa etapa, os preparados totais foram manipulados na ausência de luz. Ao término do período de incubação, eles foram lavados com PBS 0,1 M três vezes de 5 minutos sob agitação para então serem montadas as lâminas utilizando anti-fade.

Após finalizada as montagens das lâminas, em um fotomicroscópio de fluorescência, foram capturadas 32 imagens por animal valendo-se da objetiva de 20x. Com o auxílio do software Image Pro Plus, contou-se o número total de neurônios presentes nessas imagens, e os resultados foram expressos em $1\ \text{cm}^2$. Também foram mensurados a área do corpo celular de 100 neurônios por animal e os resultados expressos em μm^2 .

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os resultados foram expressos como a média \pm SEM. O tipo de distribuição foi analisado pelo teste de Shapiro-Wilk, demonstrando normalidade dos dados. ANOVA one-way,

seguida pelo teste Tukey's, foi realizada para comparar os grupos com distribuição normal. Para todos os testes o nível de significância foi de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos do tratamento combinado da ASA+BZN na infecção pelo *T.cruzi* e área do cólon dos animais infectados

A parasitemia de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y de *T.cruzi* comprova a infecção (Fig. 1A). Os grupos infectados sem tratamento e infectado+ASA apresentaram alta parasitemia, os quais se mostraram estatisticamente semelhantes. O mesmo foi observado em relação a baixa taxa de sobrevivência dos camundongos infectados sem tratamento e do grupo infectado+ASA, também não havendo diferença entre esses dois grupos (Fig.1B). Os camundongos do grupo infectado+BZN apresentaram baixa parasitemia quando comparados aos do grupo infectado sem tratamento ($p < 0,0001$). O grupo infectado+ASA+BZN também apresentou redução na parasitemia quando comparado ao grupo infectado sem tratamento ($p < 0,0001$). A taxa de sobrevivência nos grupos infectado+BZN e infectado+ASA+BZN se mostrou a mesma dos animais controle sem infecção, não havendo morte nesses grupos durante todo período experimental.

A área do cólon dos animais infectados pelo *T.cruzi*, tratados ou não, estava aumentada quando comparada ao cólon dos animais do grupo controle (Figura 2C; $p < 0,0001$). O grupo infectado sem tratamento apresentou aumento de 63,09% da área do cólon quando comparado ao controle. O grupo infectado+ASA apresentou aumento de 50,38%, em relação ao controle. O grupo infectado+BZN teve aumento de 66,30% quando comparado ao controle. O cólon dos camundongos infectados e tratados com a combinação de ASA+BZN apresentou aumento de 28,33% em relação ao controle.

3.3 Efeitos da associação ASA+BZN sobre a população geral de neurônios mioentéricos durante a infecção pelo *T.cruzi*

A densidade populacional de neurônios mioentéricos gerais (PGP9.5+) nas amostras dos cólons de camundongos infectados, tratados ou não, apresentou-se reduzida em comparação ao controle ($p < 0,0001$; Fig. 3A). Os animais infectados que não receberam tratamento apresentaram diminuição de 42,8% da população neuronal geral quando comparados camundongos controle ($p < 0,0001$; Fig. 3E). Os animais infectados tratados somente com a ASA ou BZN de forma isolada apresentaram uma de diminuição de 36,47% ($p < 0,0001$; Fig. 3F) e 29,12% ($p < 0,0001$; Fig.3G), respectivamente, em relação aos do grupo controle. Nos camundongos do grupo infectado+ASA+BZN não se houve perda de neurônios mioentéricos gerais quando comparados aos do grupo controle ($p > 0,05$; Fig. 3H).

Quando projetamos o número de neurônios encontrados nas amostras avaliadas para toda a área do cólon, para corrigir a variação provocada pela expansão da área colônica em animais infectados (Fig. 3C), confirmou-se a diminuição da população neuronal geral (31,35%) nos camundongos infectados e sem tratamento quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os camundongos dos grupos infectado+ASA e infectado+BZN apresentaram uma diminuição de 26,80% e 33,44%, respectivamente, em relação ao controle ($p < 0,0001$). Os camundongos infectado+ASA+BZN não apresentaram perda de neurônios mioentéricos gerais em relação ao controle ($p > 0,05$).

3.4 Efeitos do tratamento combinado da ASA+BZN sobre os neurônios mioentéricos colinérgicos e nitrérgicos

A análise quantitativa dos neurônios colinérgicos (ChAT+) nas amostras avaliadas revelou que camundongos infectados sem tratamento apresentaram uma redução em 50,61% quando comparados aos animais controle (Fig.4 A e 4E; $p < 0,0001$). Também observou-se redução desta subpopulação neuronal nos grupos infectado+ASA (44,46%) e infectado+BZN (38,47%) quando comparados ao controle ($p < 0,0001$; Figs. 4F e 4G). Os camundongos do grupo infectado+ASA+BZN apresentaram uma redução no número de neurônios colinérgicos de 16,97% (Fig. 4H), porém essa redução não apresentou diferença estatística comparado ao controle ($p > 0,05$).

Quando projetamos o número de neurônios encontrados nas amostras para a área total de cada cólon, confirmou-se que a subpopulação colinérgica dos camundongos infectados sem tratamento estava reduzida (33,68%) quando comparados ao do grupo controle ($p < 0,0001$; Fig. 4B). O grupo infectado+ASA apresentou uma diminuição de 35,97%, em relação ao controle ($p < 0,0001$). Os demais grupos, infectado+BZN e infectado+ASA+BZN, não apresentaram perda de neurônios colinérgicos em relação ao controle ($p > 0,05$; Fig 4G e 4H).

A análise quantitativa dos neurônios nitrérgicos nas amostras avaliadas revelou uma diminuição de 29,19% células no grupo infectado e sem tratamento em relação ao controle ($p < 0,0001$; Fig. 5A). O grupo infectado+BZN apresentou redução de 35,12% quando comparado ao controle ($p < 0,0001$; Fig. 5E). Tanto o grupo infectado+ASA (Fig. 5F) quanto o infectado+ASA+BZN não apresentou diminuição de densidade populacional dessas células quando comparados ao grupo controle (Fig. 5H). Quando projetamos o número de neurônios nitrérgicos encontrados considerando a área total do cólon de cada animal, todos os grupos não apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$; Fig.5B).

3.6 Efeitos do tratamento combinado ASA+BZN sobre os corpos celulares dos neurônios mioentéricos durante a infecção pelo *T.cruzi*.

Os corpos celulares de neurônios da população e da subpopulação nitrérgica nos grupos controle, infectado+ASA e infectado+ASA+BZN apresentaram hipertrofia comparado ao controle ($p < 0,0001$; Fig. 5C). O grupo infectado+BZN apresentou corpos celulares de neurônios nitrérgicos atrofiados em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

Na subpopulação colinérgica, hipertrofia foi observada somente no grupo infectado+ASA (Fig.4C) em relação ao controle. Os demais grupos, infectados sem tratamento, infectado+BZN e infectado+ASA+BZN não se observou diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, mostramos que a associação farmacológica da ASA e BZN apresentou efeito protetor superior sobre a população neuronal no plexo mioentérico dos camundongos BALB/c infectados pelo *T. cruzi*, quando

comparada aos fármacos administrados isoladamente. Além disso, a associação ASA+BZN foi capaz de diminuir a parasitemia, o que refletiu em uma menor taxa de mortalidade dos camundongos infectados.

O colón de todos os camundongos infectados sem e com tratamento apresentou-se aumentada em relação ao grupo controle. Alterações anatômicas no colón é um achado comum na DC^{45,46}, e ocorre como resultado da perda de neurônios mioentéricos e outras populações celulares do intestino, como as células da glia e células intersticiais de Cajal, que leva a uma atividade motora intestinal desordenada e constipação³³. Outra alteração descrita na literatura é o espessamento das camadas musculares, e proliferação de tecido conjuntivo⁴².

Na infecção experimental com *T. cruzi*, a análise da parasitemia é um dado comprobatório importante da infecção e das lesões que a seguem. No presente estudo, encontramos nos camundongos infectados sem tratamento, intensa diminuição da densidade populacional de neurônios no plexo mioentérico, o que está relacionado à intensa parasitemia que ocorre na fase aguda desencadeando o desenvolvimento das lesões observadas na fase crônica⁴⁴. Embora a patogênese das manifestações gastrointestinais na DC não esteja totalmente elucidada, estudos indicam a participação de mecanismos mistos, com envolvimento direto do parasito na fase aguda e manutenção da resposta inflamatória, e assim, continuidade no desenvolvimento das lesões teciduais ao longo do tempo por mecanismos autoimunes²¹. A redução da densidade populacional de neurônios mioentéricos gerais^{15,24} é um achado fisiopatológico bem estabelecido na infecção pelo *T. cruzi*, incluindo também perda de neurônios da subpopulação colinérgica^{51,52}, o que corrobora com os achados do presente estudo. Estudos, como o realizado por Moreira e colab. (2011)⁴², demonstram a relação entre a maior curva parasitêmica com intensos focos inflamatórios no colón do hospedeiro e conseqüente diminuição da densidade neuronal.

A resposta imune hospedeiro-parasito juntamente com a susceptibilidade genética do hospedeiro influenciam a patogenia da DC, produzindo uma doença altamente complexa⁷⁰. A infecção pelo *T. cruzi* envolve uma intensa resposta inflamatória, coordenada por mediadores inflamatórios, envolvidos na fase aguda e crônica da doença^{57,61}. Os metabólitos do AA, como as prostaglandinas,

tromboxano e leucotrienos, são descritos como fatores essenciais para o desenvolvimento da DC⁵⁷. A inflamação faz parte do processo fisiopatológico durante a infecção aguda, é protetora, mas quando excessiva ou prolongada prejudica o hospedeiro, danifica os tecidos e interfere na reparação tecidual^{57,60}. Durante o desenvolvimento da DC, espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser produzidas por estimulação de mediadores inflamatórios, provocando destruição tecidual causada pelo parasito, reações citotóxicas mediadas pelo sistema imunológico e danos secundários às mitocôndrias⁵⁹.

O BZN administrado de forma isolada se mostrou capaz de controlar a parasitemia nos camundongos, preservando a vida desses animais, porém ineficaz em promover proteção sobre os neurônios do plexo mioentérico. A ação tripanocida desse fármaco é através da formação de radicais livres e metabólitos nucleofílicos que lesionam o DNA, lipídeos e proteínas do parasito^{33,34}. Durante a fase aguda da infecção, fase em que há a presença do parasito circulante, o uso do BZN apresenta um índice de cura de 76-80% em humanos^{27,31}. Na fase crônica, a eficácia do BZN é limitada, visto que nessa fase estudos de imunohistoquímica revelam a ausência de *T. cruzi* nas lesões⁴⁶. As lesões, na fase crônica, são sustentadas por mecanismos autoimunes^{18,19,49} por intermédio de mimetismo molecular parasito-hospedeiro e pela presença de células T autorreativas, como já demonstrado em humanos e murinos^{21,22,47,48}.

No presente estudo, a ação da ASA administrada isoladamente foi ineficaz em controlar a parasitemia em camundongos BALB/c. Além disso, os camundongos infectados tratados somente com a ASA apresentaram alta mortalidade durante o experimento quando comparados aos dos grupos controle, infectado+BZN e Infectado+ASA+BZN, indicando que ASA isoladamente não protege camundongos BALB/c de lesões causadas pelo *T. cruzi*. Em relação à população neuronal do plexo mioentérico dos camundongos infectados, a ASA administrada isoladamente não foi capaz de exercer proteção contra os mecanismos de morte desencadeados pelo *T. cruzi*, já que foi observada uma intensa perda neuronal nesses animais, sobretudo de neurônios colinérgicos.

Estudos avaliando a ação da ASA durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, possuem diferentes resultados na literatura, variando de acordo com

espécie do hospedeiro^{41,42}, dose do medicamento administrado^{35,36}, tempo de infecção^{51,54} e cepa de *T. cruzi* inoculada. Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa³⁶ demonstrou que a ASA administrada durante a fase aguda ou crônica da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos *Swiss* promoveu controle da parasitemia e neuropreservação quando administrada em doses de 25- 50mg/kg, controlando a resposta inflamatória em uma intensidade não prejudicial ao hospedeiro. No entanto, o modelo experimental utilizado o camundongo *Swiss* possui menor susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi*, quando comparado a outros modelos murinos como o BALB/c⁶⁴. Em contraste, um estudo realizado por Mukhejee e colab. (2011) demonstra que o uso da ASA na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* promove aumento da parasitemia e mortalidade nos animais, por suprimir a produção de eicosanoides (tromboxano A₂) que controla a proliferação de parasitas e participam da liberação e sinalização de citocinas⁶⁸. A ineficiência da ASA em controlar a proliferação do parasita refletiu em uma alta na parasitemia no início da infecção, que associada a maior susceptibilidade do BALB/c levou a uma resposta inflamatória mais intensa e conseqüentemente maior perda neuronal, que pode ser observada na fase crônica.

O tratamento associado da ASA com o BZN se mostrou eficiente no controle da parasitemia, acompanhado de uma diminuição na baixa mortalidade. O efeito neuroprotetor evidenciado pela associação dos dois fármacos pode ser explicado pelo conjunto de seus mecanismos farmacológicos, os quais sugerimos que a diminuição da parasitemia tenha sido causada pela ação do BZN, enquanto a ASA foi eficaz no controle da resposta inflamatória, refletindo em um menor dano aos neurônios mioentéricos. O efeito protetor desta associação farmacológica se repete também sobre a população colinérgica. A drástica redução dos neurônios colinérgicos na infecção pelo *T. cruzi* é um evento importante para o desenvolvimento do megacolon^{43,52}. A diminuição dessa subpopulação neuronal resulta em perda da coordenação contrátil no trato gastrointestinal, retenção do conteúdo luminal, obstrução do órgão e distensão das fibras musculares, com conseqüente hipertrofia da musculatura, levando a formação do megacolon^{51,54}.

Em relação aos neurônios nitrérgicos avaliados nesse estudo, observou-se maior preservação frente à infecção, inclusive igualando-se ao observado no grupo controle. Essa subpopulação parece apresentar maior resistência aos mecanismos que levam a diminuição da densidade neuronal no plexo mioentérico durante a infecção pelo *T. cruzi*. O predomínio dos neurônios nitrérgicos durante na DC, fase aguda e crônica, já foi demonstrado em outros estudos⁵¹. Além da maior sobrevivência da subpopulação nitrérgica, Jabari e colab. (2011)⁵³ também demonstraram o aumento dessa população neuronal. O neurotransmissor primário dos neurônios nitrérgicos é o NO. Além do seu papel como neurotransmissor, o NO exerce importantes funções biológicas como na resposta inflamatória, vasodilatação e neuroproteção⁶⁹. O NO é capaz de induzir a produção de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, e também estimula a síntese de ferritina, que se liga aos íons de ferro, prevenindo a geração de superóxido, limitando a lesão oxidativa⁶⁷. Também protege a célula contra morte celular, por conferir citoproteção através da inibição da atividade da caspase pelas cisteínas, diminuindo o influxo de Ca^{2+} ^{62,63}. Todos esses mecanismos pontuados podem ter contribuído para maior sobrevivência da subpopulação neuronal nitrérgica nos camundongos infectados.

Os neurônios mioentéricos remanescentes durante a infecção pelo *T. cruzi* geralmente apresentam alteração morfológica nos corpos celulares, principalmente hipertrofia, tanto em humanos como em camundongos^{36,52}. Esse mesmo resultado foi encontrado nos camundongos infectados sem tratamento, infectados tratados com ASA e infectados tratados com ASA+BZN. A hipertrofia dos corpos celulares ocorre devido à plasticidade neuronal que permite que os neurônios consigam se adaptar a situações adversas que ocorrem em seu microambiente, permitindo sua sobrevivência⁵⁵.

A hipertrofia dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos sugere uma mudança estrutural que pode indicar aumento da expressão gênica para maior síntese proteica, podendo resultar em maior liberação de neurotransmissores, funcionando como mecanismo compensatório para se adaptar à perda de neurônios, e conseguir manter a homeostase do trânsito intestinal. A subpopulação nitrérgica nos camundongos infectados foi a que apresentou alteração morfológica mais intensa quando comparada à população colinérgica

nos mesmos grupos, indicando uma maior capacidade dos neurônios nitrérgicos em se adaptar a infecção. Como já citado, os neurônios nitrérgicos possuem mecanismos que promovem sua sobrevivência diante a infecção, entre eles enzimas antioxidantes que contribuem para menor perda dessa subpopulação neuronal em um ambiente pró-inflamatório. A adaptação dos neurônios nitrérgicos pode promover aumento da produção de NO levando ao relaxamento excessivo das camadas musculares, que podem resultar em perturbação da motilidade colônica, os quais são achados comuns na DC^{53,56}.

Diante disso, concluímos que a associação farmacológica da ASA+BZN foi capaz de promover controle da parasitemia, baixa taxa de mortalidade e neuroproteção no plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com o *T.cruzi*. Seu efeito se mostrou superior aos tratamentos administrados de forma isolada, o que pode indicar uma nova estratégia terapêutica.

REFERENCES

1. JR, Anis Rassi e RASSI, Anis. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease)**. *Changes*, v. 26, p. 275-291, 2012
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso** / Ministério da Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, p. 444, 2010.
3. Chagas disease. **World Health Organization**. Disponível em <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>
4. PINTO DIAS, João Carlos. **Human chagas disease and migration in the context of globalization: Some particular aspects**. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2013, 2013.
5. DIAS, J. C.P. e SILVEIRA, A. C. e SCHOFIELD, C. J. **The impact of Chagas disease control in Latin America - A review**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.
6. DIAS, João Carlos Pinto e colab. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015**. *Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, v. 25, n. spe, p. 7-86, 2016.
7. BELLO CORASSA, Rafael e colab. **Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review**. *Perspectives in Public Health*, v. 137, n. 5, p. 289-295, 2017.
8. PINTO DIAS, João Carlos. **Human chagas disease and migration in the context of globalization: Some particular aspects**. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2013, 2013.
9. . BELLO CORASSA, Rafael e colab. **Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review**. *Perspectives in Public Health*, v. 137, n. 5, p. 289-295, 2017
10. FUMADÓ, Victoria e colab. **Chagas pediátrico en zona no endémica**. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 32, n. 5, p. 293-296, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.04.024>>.
11. BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G. TEIXEIRA, R. & ALMEIDA DE SOUZA, J. A. **Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:84-89, 1980.
12. ANGHEN, A.S, BOIX, L, BUONFRATE D, e colab. **Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries**. *Blood Transfus.* 2015;13(4):540-50
13. MONTGOMERY, S.P.; STARR, M.C.; CANTEY, P.T.; EDWARDS, M.S.; MEYMANDI, S.K. Neglected parasitic infections in the United States: **Chagas disease**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90(5), p. 814-818, 2014.

14. PINAZO, María Jesús e colab. **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic.** Gastroenterologia y Hepatologia, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2010.
15. CAMPOS, Camila França e colab. **Enteric neuronal damage, intramuscular denervation and smooth muscle phenotype changes as mechanisms of Chagasic megacolon: Evidence from a long-term murine model of tripanosoma cruzi infection.** PLoS ONE, v. 11, n. 4, p. 1-18, 2016.
16. BARRIAS, E.S.; CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W. **Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.** Frontiers in Immunology, v. 4, p. PMC3730053, 2013.
17. SCARES, Milena B.P. e PONTES-DE-CARVALHO, Lain e RIBEIRO-DOS-SANTOS, Ricardo. **The pathogenesis of Chagas' disease: When autoimmune and parasite-specific immune responses meet.** Anais da Academia Brasileira de Ciencias, v. 73, n. 4, p. 546-559, 2001.
18. VAZQUEZ, Bruna Perez e colab. **Inflammatory responses and intestinal injury development during acute Trypanosoma cruzi infection are associated with the parasite load.** Parasites and Vectors, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2015.
19. GOMES, J. A.S. e colab. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.** Infection and Immunity, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.
20. DE BONA, Elidiana e colab. **Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy?** Frontiers in Immunology, v. 9, n. AUG, p. 1-8, 2018.
21. CUNHA-NETO, Edecio e colab. **Autoimmunity in Chagas' Disease.** Infection and Autoimmunity, 2nd edition, v. 98, n. 8, p. 449-466, 2004.
22. KIERSZENBAUM, Felipe. **Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis.** Clinical Microbiology Reviews, v. 12, n. 2, p. 210-223, 1999.
23. HARRINGTON, Andrea M. e HUTSON, John M. e SOUTHWELL, Bridget R. **Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system.** Progress in Histochemistry and Cytochemistry, v. 44, n. 4, p. 173-202, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.proghi.2009.10.001>>.
24. PINAZO, María Jesús e colab. **Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic.** Gastroenterologia y Hepatologia, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2010.
25. DUTRA, Walderez Ornelas e colab. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n.

SUPPL. 1, p. 208-218, 2009.

26. MAYA, J.D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; LOPEZ-MUÑOS, R.; MORELLO, A. Chagas disease: presente status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, p. 323-331, 2010.

27. OLIVEIRA, M.F.; NAGAO-DIAS, A.T.; DE PONTES, V.M.O.; JÚNIOR, A.S.S.; COELHO, H.L.L.; COELHO, I.C.B. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no

28. HASSLOCHER-MORENO, Alejandro M. e colab. **Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, n. 5, p. 1261-1266, 2012.

29. VINUESA, Teresa e colab. **Benznidazole nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 5, p. 1469-1476, 2017

30. URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

31. CARDOSO, Clareci Silva e colab. **Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study**. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 11, p. 1-12, 2018.

32. SALES JUNIOR, Policarpo Ademar et al. **Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review**. Am J Trop Med Hyg., v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017

33. DAVANÇO, Marcelo. **Farmacocinética do Benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. Aleph, 2015.

34. GARCIA, S.; RAMOS, C.O.; SENRA, J.F.V.; VILASBOAS, F.; RODRIGUES, M.M.; DE CARVALHO, A.C.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. **Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, p. 1521-1528, 2009.

35. MOLINA-BÉRRIOS, 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 15-epi-Lipoxin A4-Mediated effect**. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 7(4), p. 2173, 2013.

36. 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.A. **Myenteric neuroprotective role of aspirin in acute and chronic experimental infections with Trypanosoma cruzi**. Neurogastroenterology & Motility, v. 29(10), p. 1-13, 2017.

37. GONZÁLEZ-HERRERA, F.; CRAMER, A.; PIMENTEL, P.; CASTILHO, C.; LIEMPI, A.; KEMMERLING, U.; MACHADO, F.; MAYA, J.D. **Simvastatin attenuates endothelial activation through 15-epi-lipoxin A4 production in murine chronic chagas cardiomyopathy.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.61, p. 1-11, 2017
38. MASSOCATTO, C.L.; MOREIRA, N. M.; MUNIZ, E.; PINGE-FILHO, P.; ROSSI, R. M.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. **Aspirin prevents atrophy of esophageal nitrergic myenteric neurons in a mouse model of chronic Chagas disease.** *International Society for Diseases of the Esophagus*, v. 30(2), p. 1-8, 2017
39. LOPEZ-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*, v. 124, p. 167-171, 2010.
40. MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio e colab. **Systematic review: Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil: A systematic review and meta-analysis.** *Tropical Medicine and International Health*, v. 19, n. 8, p. 943-957, 2014
41. SOUZA, Noemi D.DE e colab. **Effect of acetylsalicylic acid on total myenteric neurons in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi.** *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 91, n. 2, p. e20180389, 2019.
42. MOREIRA, N. M.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A.; et al. **Neuronal changes caused by trypanosoma cruzi: An experimental model.** *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 83, n. 2, p. 545-555, 2011.
43. MATSUDA, Nilce Mitiko e MILLER, Steven M. e EVORA, Paulo R.Barbosa. **The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease.** *Clinics*, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.
44. BRENER Z. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi.** *Rev Inst Med Trop* 4: 389-396, 1962
45. COURA, J. R. e colab. **Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma cronica, da doenca de Chagas, em uma area de campo com transmissao interrompida. I. Avaliacao preliminar.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, n. 2, p. 139-144, 1997.
46. CÔBO, Eliângela De Castro e colab. **Research on Trypanosoma cruzi and analysis of inflammatory infiltrate in esophagus and colon from chronic chagasic patients with and without mega.** *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 2012
47. STERIN-BORDA, LEONOR e BORDA, ENRI. **Role of Neurotransmitter Autoantibodies in the Pathogenesis of Chagasic Peripheral Dysautonomia.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 917, n. 1, p. 273-280, 2006.

48. VAN VOORHIS, W. C. e EISEN, H. **FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue.** Journal of Experimental Medicine, v. 169, n. 3, p. 641-652, 1989
49. DUTRA, Walderez Ornelas e colab. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 208-218, 2009.
50. ABDALLA, G.K, FARIA, K.T, CASTRO, E.C.C, REIS, M.A, MICHELIN, M.A. ***Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection.** Experimental parasitology. 2008; 118:514-521.
51. JABARI, Samir e colab. **Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon.** International Journal of Colorectal Disease, v. 27, n. 9, p. 1181-1189, 2012.
52. JABARI, Samir e colab. **Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures.** Histochemistry and Cell Biology, v. 142, n. 3, p. 235-244, 2014.
53. JABARI, Samir e colab. **Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon.** Histochemistry and Cell Biology, v. 135, n. 1, p. 47-57, 2011.
54. MOREIRA, N. M.; ZANONI, J. N.; DE OLIVEIRA DALÁLIO, M. M.; et al. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 68-74, 2014. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.005>>.
55. SCHÄFER, Karl Herbert e VAN GINNEKEN, Chris e COPRAY, Sjef. **Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system.** Anatomical Record, v. 292, n. 12, p. 1940-1952, 2009.
56. TAKAHASHI. T. **Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract.** J Gastroenterol. 2003;38:421 - 430.
57. GUPTA, Shivali e WEN, Jian-Jun e GARG, Nisha Jain. **Oxidative Stress in Chagas Disease.** Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, v. 2009, p. 1-8, 2009.
58. LÓPEZ-MUÑOZ, Rodrigo A. e colab. **Inflammatory and pro-resolving lipids in trypanosomatid infections: A key to understanding parasite control.** Frontiers in Microbiology, v. 9, n. AUG, p. 1-16, 2018.
59. LOPEZ, Marcos e TANOWITZ, Herbert B. e GARG, Nisha J. **Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress.** Current Clinical Microbiology Reports, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2018.
60. GOES, Grazielle R. e colab. ***Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 4, p. 1-25, 2016.

61. GUERRERO, N. A., CAMACHO, M., VILA, L., Iniguez, M. A., CHILLON-MARINAS, C., CUERVO, H., et al. (2015). **Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 signaling through prostaglandin receptor EP-2 favor the development of myocarditis during acute *Trypanosomacruzi* infection.** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0004025. doi: 10.1371/journal.pntd.0004025
62. CALABRESE, Vittorio e colab. **Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 10, p. 766-775, 2007.
63. KNIGHT, Jasper e CASELDINE, Chris e BOYKOFF, Maxwell. **Forum review: Forum review.** *Geographical Journal*, v. 176, n. 3, p. 267-269, 2010.
64. ARAÚJO-JORGE, Tania C e CASTRO, Solange L De. **Modelos Animais para o Estudo In Vivo da doença de Chagas e seus Aspectos Histopatológicos.** 2000.
65. Köberle F (1968) **Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis.** *Adv Parasitol* 6:63-116
66. FURNESS, J. B. **Types of neurons in the enteric nervous system.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000a.
67. SANT'ANA DUSSE, Luci Maria e VIEIRA, Lauro Mello e CARVALHO, Maria das Graças. **Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n4/18548.pdf>>.
68. MUKHERJEE, Shankar e colab. **Aspirin treatment of mice infected with *trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of chagas disease.** *PLoS ONE*, v. 6, n. 2, 2011.
69. MASSOCATTO, Miss Cristina Lorena e colab. **Aspirin prevents atrophy of esophageal nitrergic myenteric neurons in a mouse model of chronic Chagas disease.** *Diseases of the Esophagus*, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2017.

Tabela 1: Anticorpos primário e secundário utilizados na técnica de imunofluorescência.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Fabricante
Anti-nNOS	Cabra	1:250	ABCAM
Anti-ChAT	Cabra	1:500	Millipore
Anti-PGP9.5	Coelho	1:1000	ABCAM
Anti-IgG de Coelho 488 (verde)	Burro	1:500	Invitogen
Anti-IgG de cabra 568 (vermelho)	Burro	1:500	Invitogen

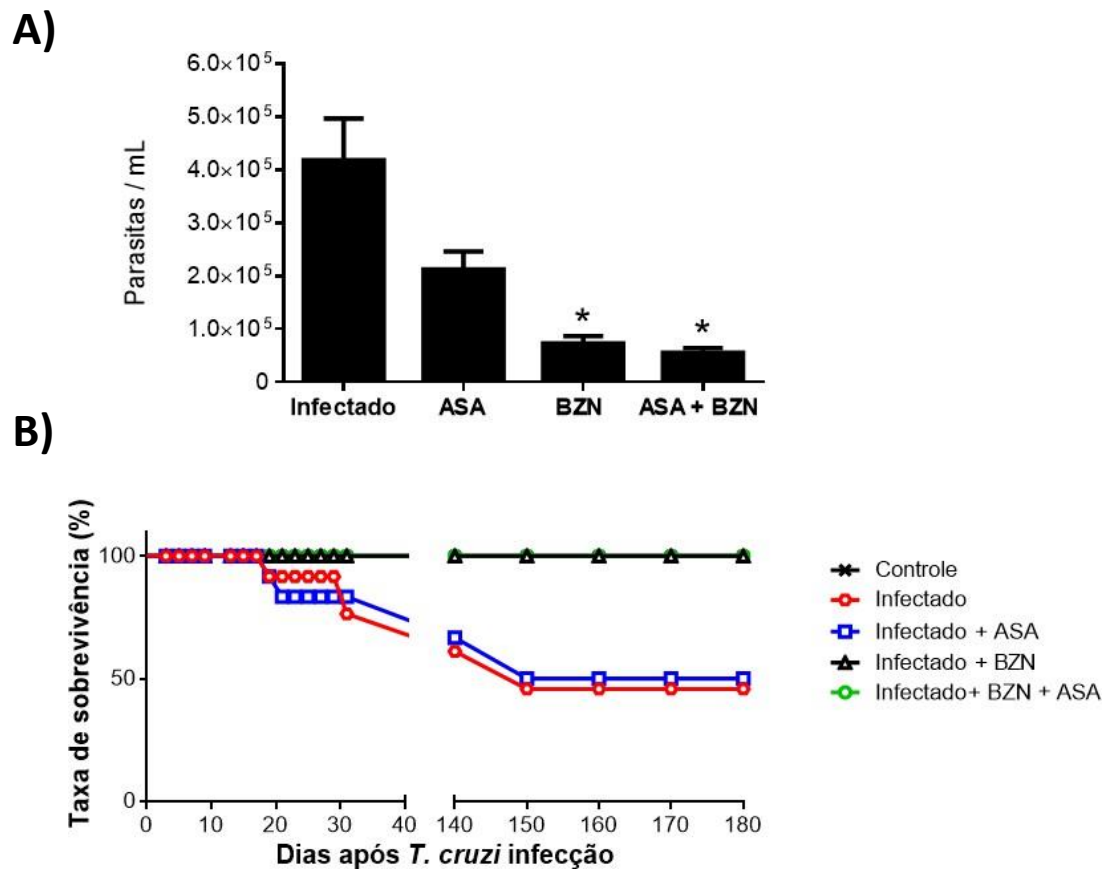


Figura 1- Parasitemia e sobrevivência dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* (CEPA Y). (A) parasitemia dos camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* (Cepa Y). (B) taxa de sobrevivência dos animais avaliados todos os dias no decorrer de todo o experimento. A análise estatística foi realizada através dos testes One-way ANOVA seguido do teste de Turkey's, considerando o nível de significância de 5%. Para comparação da curva de sobrevivência foi utilizado o teste de Longrank, considerando o nível de significância de 5%.

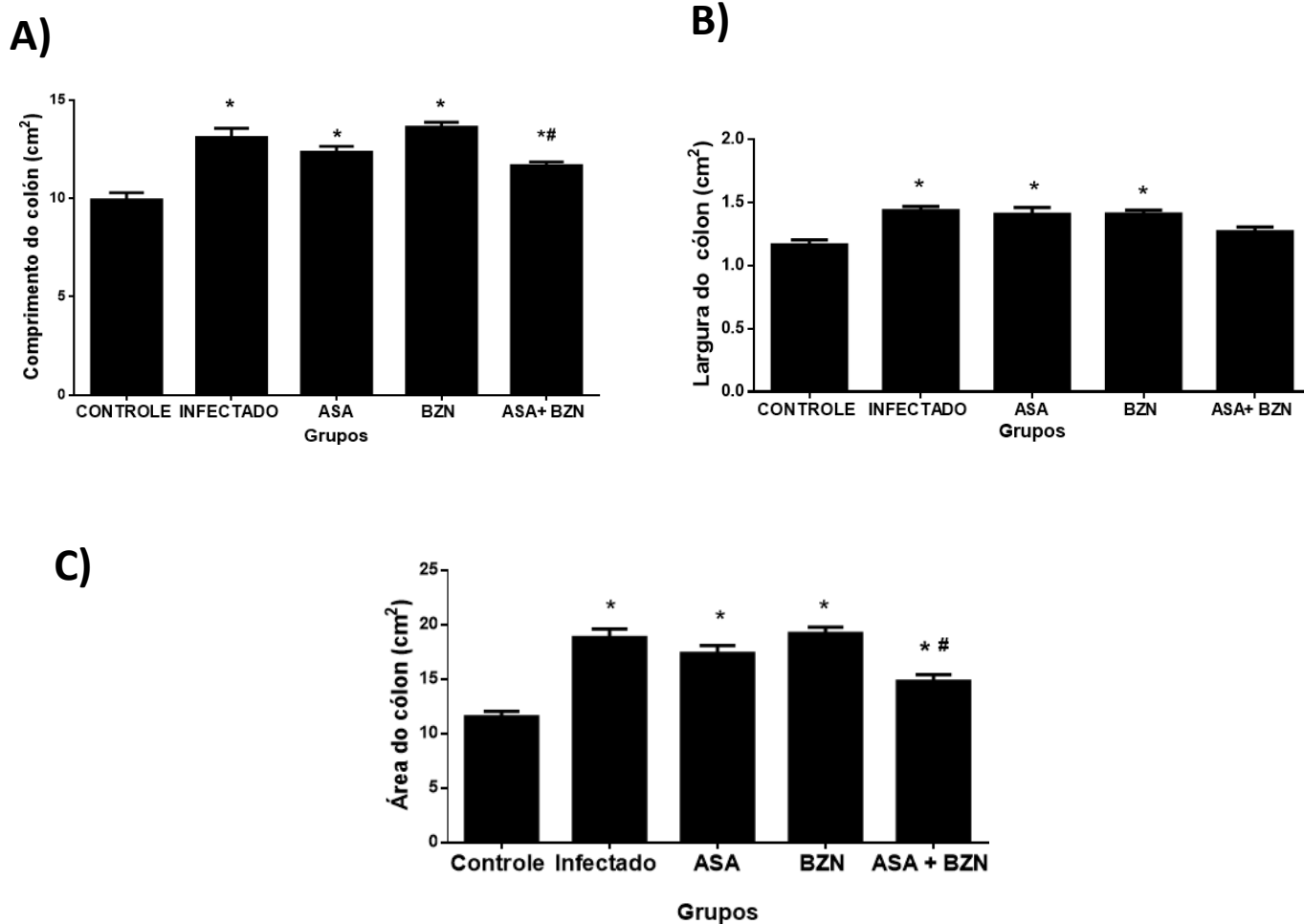
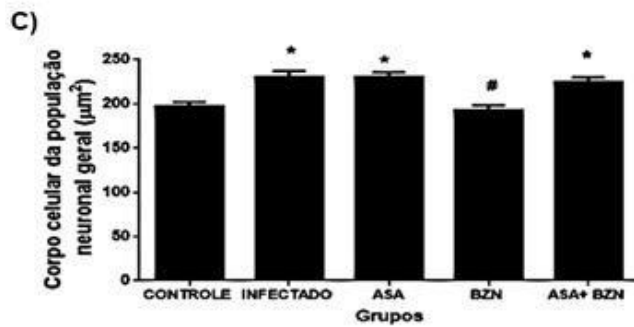
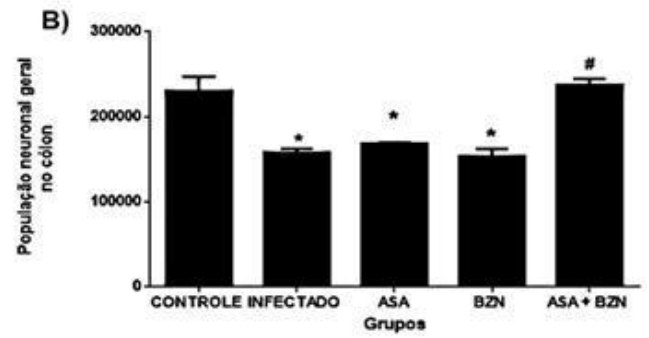
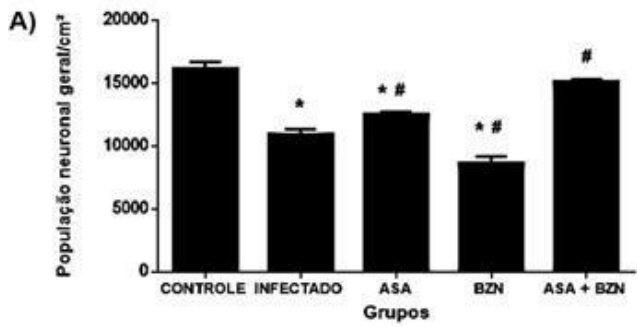
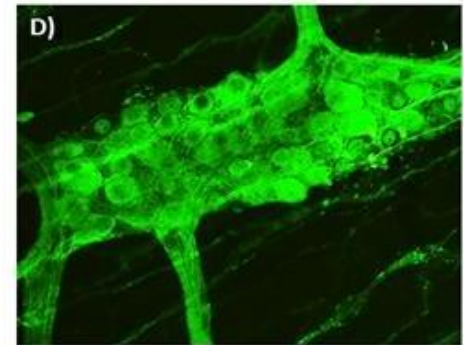


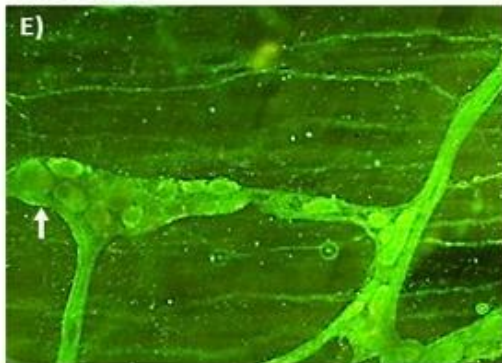
Figura 2- Área do cólon dos camundongos controle e infectados pelo *T. cruzi*: (A) comprimento do cólon. (B) largura do cólon. (C) Área do órgão. Todos os cólons dos camundongos que foram infectados pelo *T. cruzi* apresentaram aumento em seu comprimento, largura e área comparado aos animais controle. A análise estatística foi realizada através dos testes One-way ANOVA seguido do teste de Turkey's, considerando o nível de significância de 5%.



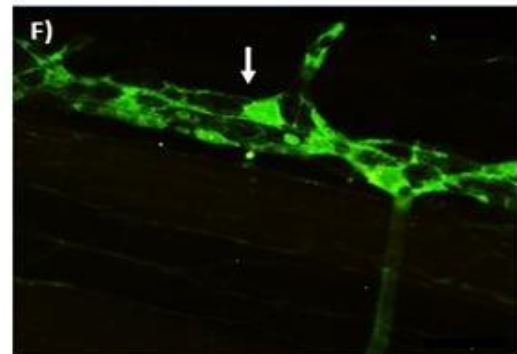
Controle



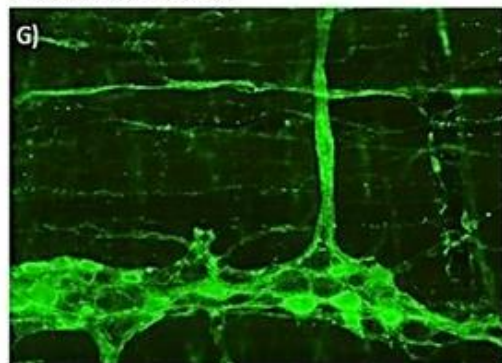
Infectado



Infectado+ASA



Infectado+BZN



Infectado+ASA+BZN

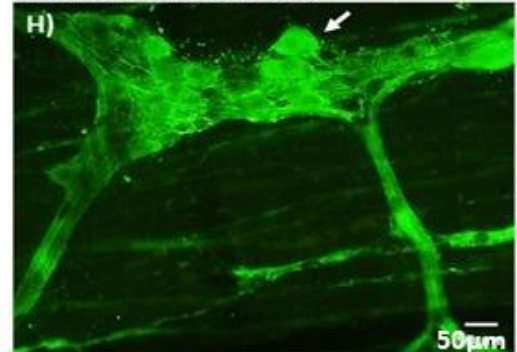
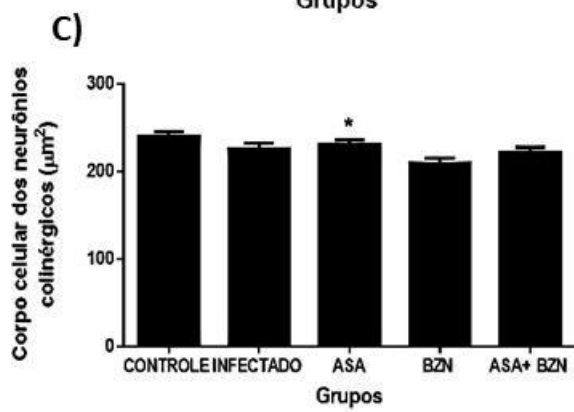
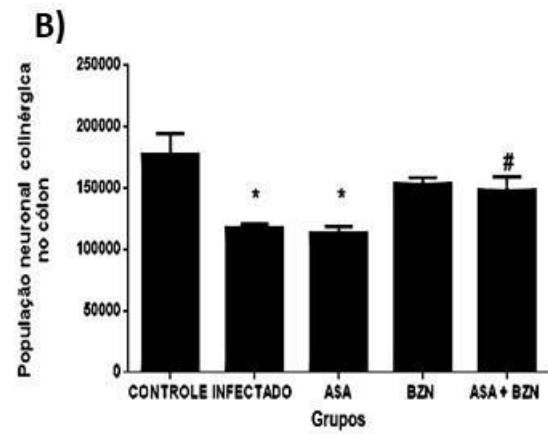
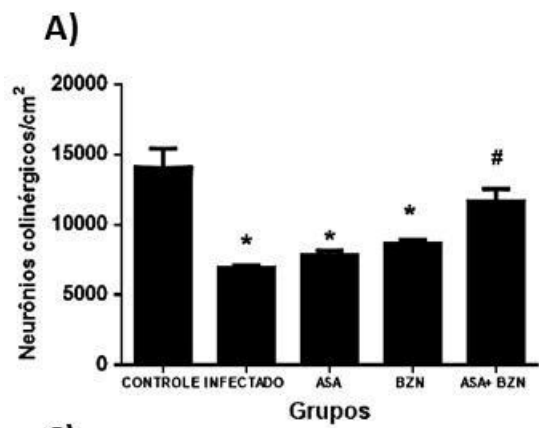
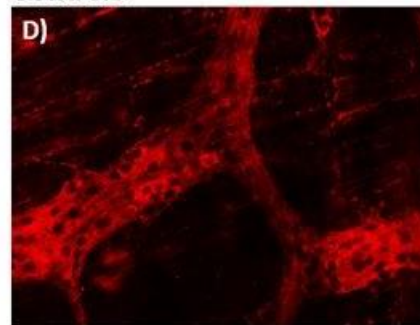


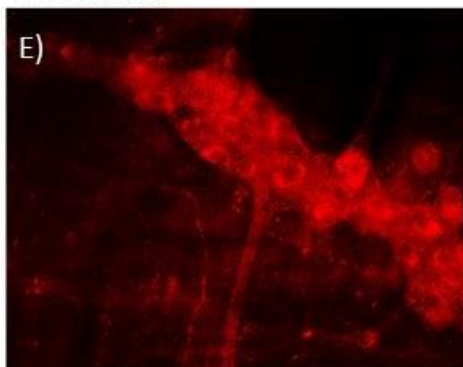
Figura 3 - Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios gerais no plexo mioentérico. A população neuronal geral no plexo mioentérico foi marcada com PGP 9.5. (A) número de corpos celulares obtidas por (cm²). Contou-se o número total de corpos celulares advindas de 32 imagens de cada animal. (B) Número de neurônios gerais no cólon dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Considerando o aumento da área do cólon dos animais infectados, foi aplicado um fator de correção para avaliar os resultados projetando para todo cólon. Todos os grupos avaliados foram comparados com o controle sem infecção (* para resultado estatisticamente significativo) e com o grupo infectados sem tratamento (# para resultado estatístico significativo). (C) Morfometria de corpos celulares dos neurônios gerais. Ponta da seta, neurônios hipertrofiados comparados ao controle. A análise estatística foi realizada através dos testes One-way ANOVA seguido do teste de Turkey's. Para todos os testes o nível de significância foi de 5%.



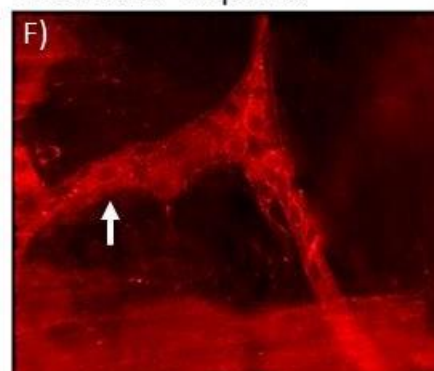
Controle



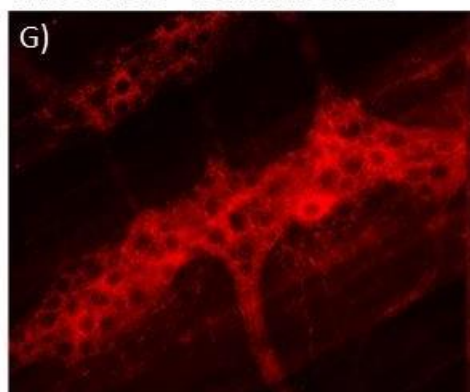
Infectado



Infectado+Aspirina



Infectado+Benznidazol



Infectado+ASA+BZN

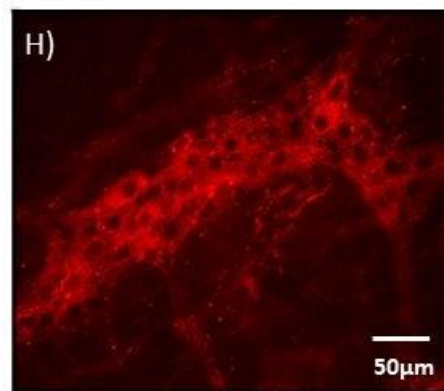


Figura 4 - Análise quantitativa e morfométrica da população neuronal colinérgica no plexo mioentérico de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*. (A) Número de neurônios colinérgicos, imunomarcados com ChAT em (cm²). Foram contados os corpos celulares de 32 imagens obtidas por área (cm²). (B) Número de neurônios gerais no cólon dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Considerando os resultados da área do cólon foi aplicado um fator de correção para avaliar se os resultados obtidos em cm² correspondia a todo órgão. Todos os grupos avaliados foram comparados com o controle sem infecção (*para resultado estatisticamente significativo) e com o grupo infectado sem tratamento (# para resultado estatístico significativo). (C) morfometria dos corpos celulares imunomarcados com ChAT. Ponta da seta, neurônios hipertrofiados comparado ao controle. A análise estatística foi realizada através dos testes One-way ANOVA seguido do teste de Turkey's. Para todos os testes o nível de significância considerado foi de 5%.

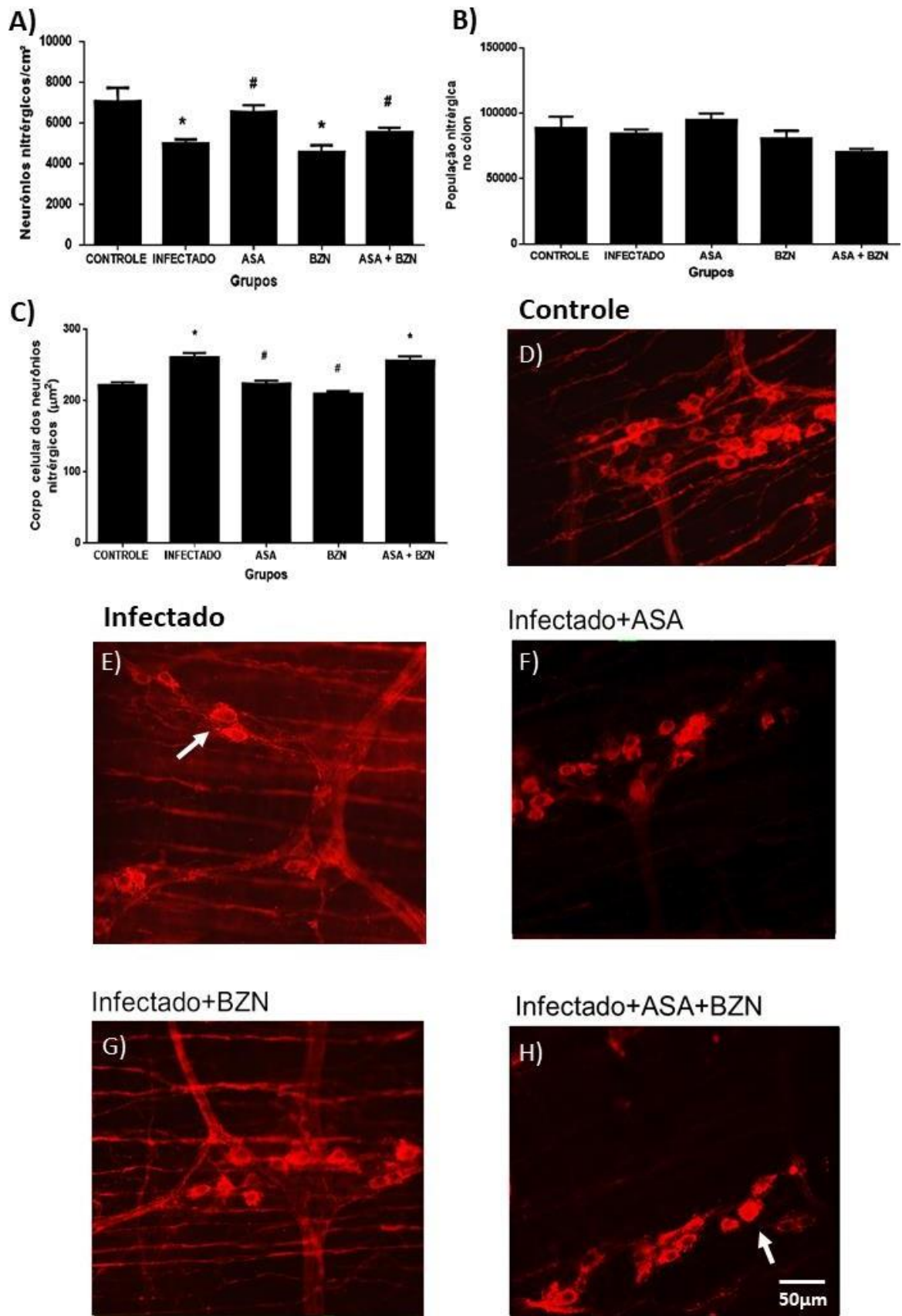


Figura 5 - Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios nitrérgicos no plexo mioéntérico de camundongos infectados com *T.cruzi* (cepa Y). (A) População neuronal nitrérgica (cm²), em 32 imagens. (B) população neuronal nitrérgica no cólon total dos animais infectados com *T.cruzi*. Para esse resultado, consideramos área do cólon de cada camundongo e aplicamos um fator de correção para analisar se as alterações correspondiam a todo cólon. Considerando o aumento da área do cólon, foi aplicado um fator de correção para analisar se as alterações correspondiam a todo cólon. (C) morfometria dos corpos celulares dos neurônios nitrérgicos. Ponta da seta, corpos celulares hipertrofiados. Todos os grupos avaliados foram comparados com controle sem infecção (*para resultado estatisticamente significativo) e com o grupo infectados sem tratamento (# para resultado estatístico significativo). A análise estatística foi realizada através dos testes One-way ANOVA seguido do teste de Turkey's. Para todos os testes o nível de significância foi de 5%.

ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 03/2019.

Londrina, 15 de Janeiro de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Efeitos do tratamento com aspirina, benznidazol e bloqueador de lipoxina (BOC) sobre lesões neuronais mioentéricas observadas no modelo murino da Doença de Chagas" protocolo CEUA nº 20106.2018.11 sob a responsabilidade de Eduardo José de Almeida Araújo, 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 **15/01/2019**.

O objetivo do projeto é avaliar a eficácia do tratamento combinado de Benznidazol (BZN), Aspirina (ASA) e bloqueador de lipoxina (BOC) sobre a morfofisiologia do plexo mioentérico de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	15/01/2019 a 03/01/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	90
Peso/ Idade	8-12 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério de animais isogênicos do Departamento de Imunologia - CEMIB/UNICAMP
Amostras a serem coletadas .	Cólon e 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-me, cordialmente.

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

Ilmo.(a) Sr.(a)
 Prof. (a) Dr (a). Eduardo José de Almeida Araújo
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Histologia/CCB
 Centro de Ciências Biológicas/CCB

ANEXO B

Author guidelines available in:
<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652982/homepage/forauthors.html#submission>