

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Efeito do tratamento com inibidor de protease do tipo  
*Bowman-Birk* na infecção experimental pelo  
*Trypanosoma cruzi***

**KÁTIA DA SILVA FONSECA**

**Ouro Preto – MG  
Dezembro de 2015**

**Kátia da Silva Fonseca**

**Efeito do tratamento com inibidor de protease do tipo  
*Bowman-Birk* na infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas como exigência parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Martins Carneiro  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

**Ouro Preto – MG  
Dezembro de 2015**

F733e Fonseca, Kátia da Silva.  
Efeito do tratamento com inibidor de protease do tipo Bowman-Birk na  
infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Kátia da Silva  
Fonseca. - 2015.  
xx; 87f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Martins Carneiro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de  
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Chagas, Doença de. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos. 3.  
Quimioterapia. I. Carneiro, Cláudia Martins. II. Universidade Federal de Ouro  
Preto. III. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:**

**“Efeito do tratamento com inibidores de protease do tipo Bowman-Birk (BBI) ao longo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*”**

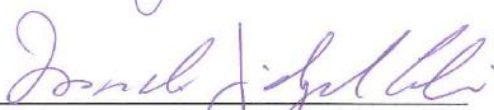
Aos vinte e um dias do mês de Dezembro de 2015, às 14:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Kátia da Silva Fonseca**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....*aprovar*..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof.ª Dr.ª Marta de Lana (UFOP)

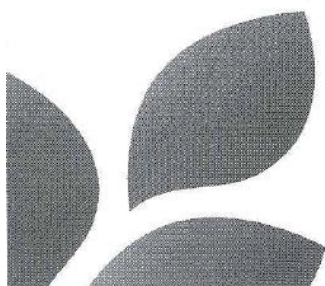
  
Prof.ª Dr.ª Vanja Maria Veloso (UFOP)

  
Prof.ª Dr.ª Silvana Maria Eloi Santos  
(UFMG)

  
Prof. Dr. Marcelo Vidgal Caliari (UFMG)

  
Prof.ª Dr.ª Cláudia Martins Carneiro  
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 21/12/2015



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva<sup>I</sup>

Dr. Milton Hercules Guerra de Andrade<sup>II</sup>

Dr. Policarpo Ademar Sales Junior<sup>III</sup>

Dra. Karina Barbosa Queiroz<sup>IV</sup>

Ms. Levi Eduardo Soares Reis<sup>I</sup>

Ms. Fernando Augusto Siqueira Mathias<sup>I</sup>

Ms. Luísa Helena Perin de Melo<sup>I</sup>

Iago César Martins de Assis<sup>I</sup>

I - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

II – Laboratório de Enzimologia e Proteômica, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

III- Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

IV - Laboratório de Neurogenômica – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

Dedico este trabalho à José Fonseca, Consolação, Felipe e  
Guilherme que estiveram ao meu lado em todos os  
momentos. Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida, por sempre me acompanhar e iluminar o meu caminho. Obrigada por me permitir concluir mais uma etapa.

Aos meus amados pais José Fonseca e Maria da Consolação da Silva Fonseca por abdicarem de seus sonhos em prol dos meus e pelo amor incondicional. Mesmo que eu não consiga expressar em palavras o amor e a gratidão que sinto por vocês, saibam que agradeço todos os dias por ter vocês em minha vida e por fazer parte da nossa família. Eu amo muito vocês!

Ao meu irmão Felipe, melhor amigo, por todo apoio, amor e cumplicidade. Amorzinho, você é o melhor irmão que eu poderia querer e agradeço muito por ter você ao meu lado em todos os momentos!!

Ao meu amor Guilherme, pelo apoio nos bons e maus momentos, conselhos e por caminhar sempre ao meu lado. Sem você tudo teria sido mais difícil. Te amo muito!

À toda minha família, avós, tios e primos pelo carinho, orações e apoio durante essa e todas as outras etapas.

À professora Cláudia, a minha eterna gratidão pela oportunidade, confiança, todos esses anos de orientação e acima de tudo amizade! Muito obrigada pelo exemplo de profissionalismo e competência!

À minha co-orientadora Paula, meu anjo da guarda, pela disponibilidade e amizade construída ao longo de todos estes anos! Obrigada pelo apoio, pela ótima convivência e pelos incontáveis ensinamentos.

Ao professor Alexandre Reis, obrigada pelo apoio durante minha caminhada acadêmica e exemplo de paixão pela pesquisa.

À Maria, pelos ensinamentos técnicos histopatológicos e pelo carinho.

À Amandinha, Thaís, Nadinha, Flávia e Ju pela amizade e apoio. O trabalho se torna muito mais agradável ao lado de vocês!

A Luísa, Jam e Carol pela amizade e pela colaboração nos momentos que mais precisei durante essa jornada! Vocês foram essenciais para a finalização desta etapa e tornaram esta caminhada mais leve!

Ao Levi e ao Fer pela amizade, disponibilidade, bons momentos e contribuição na realização dos experimentos.

À Josefa e Lu pela amizade e apoio, principalmente nos meus momentos de tensão.

À Karina, pela realização da técnica de qPCR

À todos os amigos do LIMP e LMP pela ótima convivência e apoio em todos os momentos. Vocês conseguem fazer dos momentos de trabalho muito mais prazerosos!

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP e funcionários por todo auxílio durante a experimentação animal.

À República Hangar, pela união, histórias, irmandade em todos estes anos. Vocês são minha segunda família!!

À República Saideira, pelos ótimos momentos compartilhados e por me permitirem fazer parte desta gloriosa família!

À todos os meus amigos pelo amor, apoio, torcida e por sempre compreenderem minha ausência.

A todos aqueles que por distração deixei de mencionar o nome, mas de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse realizado, a minha eterna gratidão!!



A Doença de Chagas (DCh) apresenta patogênese inflamatória, exibindo no coração um processo difuso que pode se manifestar tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Esta inflamação cardíaca pode desencadear o processo de fibrose, uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica. Além disso, lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico induzem perda de neurônios e células gliais, sendo consideradas fundamentais na patogênese da forma digestiva da DCh. Sendo assim, torna-se importante a busca por um tratamento capaz não apenas de eliminar o parasito, mas também de reduzir o processo inflamatório associado. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com o inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk* (BBI), potente inibidor da inflamação pelas vias COX-2/PGE-2 e iNOS/NO, e do BBI associado ou não ao benznidazol (BNZ) na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Primeiramente foi realizada avaliação *in vitro* da atividade do BBI sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* e, posteriormente, a avaliação *in vivo*. Neste sentido, 240 camundongos *Swiss*, machos, com 30 dias de idade foram distribuídos em cinco grupos: não infectado e não tratado (CNI); infectado e não tratado (CI); infectado e tratado com BNZ (BNZ); infectado e tratado com BBI (BBI); infectado e tratado com BNZ e BBI (BNZ/BBI). Os animais infectados foram inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Para o tratamento foi empregado 100 mg/kg de peso corporal de BNZ e/ou 3mg de BBI via gavagem, por 20 dias consecutivos, a partir do primeiro dia em que foi identificada parasitemia no exame de sangue a fresco, sendo seis animais de cada grupo infectado utilizados para a avaliação da parasitemia e mortalidade diária. No 10º, 20º, 30º e 120º dia após infecção (DAI) seis animais de cada grupo foram necropsiados para a coleta de sangue, coração e cólon. O sangue foi utilizado para a realização de imunofenotipagem do sangue periférico e os órgãos foram submetidos a avaliação da carga parasitária, da histologia (processo inflamatório e neoformação de colágeno) e dos níveis teciduais de citocinas. Em relação à avaliação *in vitro*, foi verificado que o BBI apresentou-se inativo nas concentrações de 40 à 320 µg/mL. Já em relação à avaliação da parasitemia, observou-se que, *in vivo*, o BBI também não apresentou ação tripanomicida, assim como na avaliação do parasitismo tecidual, em que os animais do grupo tratado apenas com BBI não controlaram o parasitismo, ao contrário dos animais tratados com BNZ. Já os animais tratados com BNZ e BBI controlaram o parasitismo tecidual na fase aguda da infecção, porém no 120º d.a.i. observou-se a presença de parasitos em alguns animais deste grupo. Ao avaliar o sangue periférico, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que no 10º DAI houve redução no percentual das células NK no grupo tratado com BBI e CI em relação ao grupo CNI. Além disso, foi demonstrado neste tempo redução no percentual de monócitos CD14<sup>+</sup> no grupo BBI em relação aos demais grupos tratados. Já no 20º DAI foi observada redução no percentual de células B nos grupos tratados, assim como aumento do percentual de células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de todos os grupos infectados e tratados, sendo o percentual destas células normalizado no 30º DAI. Ao realizar a avaliação histopatológica, apesar de não ter sido observada nenhuma diferença significativa entre os grupos em relação à neoformação de colágeno, observou-se redução no processo inflamatório tanto no grupo BNZ quanto no BNZ/BBI, sendo que o tratamento com o BNZ associado ao BBI permitiu que esta redução ocorresse no 20º DAI, enquanto nos animais tratados apenas com BNZ o processo inflamatório apresentou-se reduzido somente no 30º DAI. Em relação aos níveis de citocinas no tecido cardíaco, observou-se no 10º DAI aumento no

percentual de IFN- $\gamma$  e MCP-1 nos animais tratados apenas com BBI. Dessa forma, concluiu-se que o BBI, apesar de seu efeito imunomodulador, não se mostrou benéfico no tratamento da doença de Chagas, provavelmente por não permitir o estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra o *T. cruzi*.

**Palavras – chave:** Doença de Chagas, Inibidor de protease, *Bowman – Birk*, quimioterapia, benznidazol, *Trypanosoma cruzi*.

The DCh has a inflammatory pathogenesis, exhibiting a diffuse component in the heart that can manifest in both the acute and the chronic phase. This heart inflammation can trigger the process of fibrosis, one of the most significant manifestations of chronic Chagas disease. In addition, inflammatory lesions of the enteric nervous system induce loss of neurons and glial cells being considered fundamental in the pathogenesis of the digestive form of DCh. Thus, it becomes important to search for a treatment capable of not only eliminate the parasite, but also to reduce the associated inflammation. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of treatment with the protease inhibitor *Bowman-Birk* type (BBI), a potent inhibitor of inflammation by COX-2 / PGE-2 and iNOS/ NO pathways, and benznidazole (BNZ) association with BBI along the *Trypanosoma cruzi* infection, on the inflammatory process. We first carried out an assessment *in vitro* of the BBI activity on trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi* and subsequently the evaluation *in vivo*. To this end, 240 male *Swiss* mice, 30 days old were divided into five groups: non-infected and untreated (CNI); infected and untreated (CI); infected and treated with BBI (BBI); infected and treated with BNZ (BNZ); infected and treated with BBI and BNZ (BNZ/BBI). The infected animals were inoculated intraperitoneally with 500 blood trypomastigotes of Y strain. For the treatment was employed 100 mg / kg body weight of BNZ and / or 3mg of BBI via gavage, during 20 days, from the first day on which was identified parasitaemia on the examination of fresh blood. Six animals from each infected group was used for evaluation of parasitemia and mortality daily. On the 10th, 20th, 30th and 120th day after infection (DAI) six animals from each group were necropsied to collect blood, heart and colon. The blood was used for the realization of immunophenotype of peripheral blood and the organs were subjected to evaluation of parasitic burden, histology (inflammation and collagen neoformation) and tissue levels of cytokines. Regarding the *in vitro* evaluation, BBI presented himself inactive in the same concentration or in concentrations of less than 320 ug / mL. Regarding the evaluation of parasitemia, it was observed that, *in vivo*, BBI did not show trypanocidal action, so as in evaluation of the tissue parasitism in which was observed that animals of the group treated only with BBI were unable to control parasitism unlike animals treated with BNZ. The animals treated with BNZ / BBI controlled tissue parasitism in the acute phase of infection, however it was observed in 120th DAI the presence of parasites in some animals from this group. When assessing peripheral blood, the results of this study showed that in 10th DAI there was a reduction in the percentage of NK cells in the group treated with BBI and CI relative to CNI group. Moreover, at this time it was also observed a reduction in the percentage of CD14<sup>+</sup> monocytes on BBI group in relation to BNZ and BNZ / BBI groups. It was also observed a reduction in B cell percentage in the treated groups, as well as increased CD8<sup>+</sup> cell percentage in the peripheral blood of all infected and treated groups, in the 20th DAI, and the percentage of these cells returned to normal levels 30 DAI. Upon histopathological evaluation, even though it was not observed any significant difference between groups with respect to collagen neoformation, there was a reduction in the inflammatory process in both BNZ and BNZ / BBI group, wherein the treatment with the BNZ associated with BBI allowed this reduction occurred in the 20th DAI, while the animals of the BNZ group the inflammatory process had been reduced only at 30th DAI. Regarding cytokine levels in cardiac tissue was observed in 10th DAI an increase in the percentage of IFN- $\gamma$  e MCP-1 in animals treated with BBI. Thus, it is concluded that BBI,

despite its immunomodulatory effect, did not prove beneficial in the treatment of DCh, probably due to non-establishment of an effective immune response against *T. cruzi*.

**Keywords:** Chagas disease, protease inhibitor, *Bowman-Birk*, chemotherapy, benznidazole, *Trypanosoma cruzi*.

1. Introdução.....	1
1.1 - O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas .....	2
1.2 - Imunopatologia da doença de Chagas.....	4
1.3 - Tratamento .....	7
1.4- Inibidor de protease do tipo <i>Bowman-Birk</i> .....	11
2. Justificativa .....	13
3. Objetivos.....	15
3.1 - Objetivo Geral.....	16
3.2 - Objetivos Específicos.....	16
4. Material e Métodos .....	17
4.1 - Avaliação do efeito do <i>BBI in vitro</i> .....	18
4.2 - Animais, inóculo e tratamentos utilizados .....	18
4.3 - Curvas de parasitemia e taxa de sobrevivência .....	21
4.4 - Necropsia .....	23
4.5 - Imunofenotipagem do sangue periférico .....	25
4.5.1- Estratégias para análise imunofenotípica do sangue periférico por citometria de fluxo.....	26
4.6 - Análise das alterações histopatológicas .....	30
4.7 - Carga parasitária .....	32
4.7.1 - Curva padrão e determinação da carga parasitária por qPCR.....	33
4.8 - Quantificação de citocinas por CBA ( <i>Cytometric Bead Array</i> ).....	35
4.9 - Análises Estatísticas.....	36
5. Resultados.....	37
5.1 - Atividade do BBI sobre o <i>T. cruzi in vitro</i> .....	38
5.2 - Parasitemia.....	39
5.5 - Imunofenotipagem do sangue periférico .....	44
5.5.1 - Distribuição percentual das populações de células NK e CD14 <sup>+</sup> .....	44

---

5.4.2 - Distribuição percentual das populações de linfócitos T e linfócitos B .....	47
5.5. Quantificação do processo inflamatório no coração .....	51
5.6. Quantificação do processo inflamatório no cólon.....	54
5.7. Quantificação da área ocupada por fibras colágenas .....	55
5.8 - Quantificação de citocinas no coração por <i>Cytometric Bead Array</i> .....	56
6. Discussão.....	58
7. Conclusão.....	69
8. Referências.....	71
9. Anexo.....	85

**BBi:** *Bowman - Birk*

**BNZ:** Benznidazol

**CBA:** Cytometric Bead Array

**CCC:** Cardiomiopatia chagásica crônica

**CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais

**CK-MB:** Isoenzima MB da creatina quinase

**COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**COX-2:** Ciclooxigenase 2

**Ct:** Threshold cycle

**DAI:** Dia após infecção

**DCh:** Doença de Chagas

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

**DPMP:** Dia do pico máximo de parasitemia

**EAE:** Encefalomielite autoimune experimental

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**FITC:** Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)

**FL1:** Fluorescência 1

**FL3:** Fluorescência 3

**FL4:** Fluorescência 4

**FSC:** *Forward Scatter* (Tamanho)

**HE:** Hematoxilina-Eosina

**IC50:** Concentração inibitória de 50%

**iNOS:** Inducible Nitric Oxide Synthase (Enzima óxido nítrico sintase induzível)

**IFN- $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-32:** Interleucina 32

**KO:** Nocaute

**LIT:** Liver Infusion Tryptose

**MCP-1:** Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína de quimioatração para monócitos 1)

**NK:** Natural Killer Cells (Células Natural Killer)

**NO:** Oxido nítrico

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PBS:** Tampão Salina-Fosfato

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PE:** R-phycoerythrin (Ficoeritrina)

**PerCP:** Peridinin-Chlorophyll-protein (Proteína clorofila peridininina)

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**PGE-2:** Prostaglandina E

**PMP:** Pico máximo de parasitemia

**PP:** Período patente

**PPP:** Período pré-patente

**qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real ou quantitativa)

**RNase:** Ribonuclease

**RPMI:** Meio Roswell Park Memorial Institute

**SMF:** Sistema fagocitário mononuclear

**SSC:** *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

**TGI:** Trato gastrointestinal



**TNF- $\alpha$** : Fator de necrose tumoral

**TGF- $\beta$** : Fator de crescimento tumoral

**Th1**: Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas

**Th2**: Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do benznidazol (Fórmula molecular: $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e Peso molecular: 260.25g/mol).....	7
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do inibidor de protease do tipo <i>Bowman-Birk</i> . ....	11
<b>Figura3:</b> Fluxograma representativo dos grupos experimentais.....	20
<b>Figura 4:</b> Fluxograma representando os animais utilizados para determinação da curva de parasitemia e taxa de sobrevida. ....	22
<b>Figura 5:</b> Fluxograma representativo das atividades relacionadas à avaliação <i>in vivo</i> . ....	24
<b>Figura 6:</b> Sequência de métodos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e T $CD3^+CD8^+$ , no sangue periférico de camundongos Swiss infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. ....	27
<b>Figura 7:</b> Sequência de métodos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B $CD19^+$ e percentual de células NK $CD49b^+$ no sangue periférico de camundongos Swiss infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> e submetidos a diferentes tratamentos.....	28
<b>Figura 8:</b> Sequência de métodos utilizados para quantificar o percentual de monócitos $CD14^+$ , no sangue periférico de camundongos Swiss infectados pela cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. ....	29
<b>Figura 9:</b> Exemplo da curva padrão referente ao <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
<b>Figura 10:</b> Curvas de parasitemia de camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	40
<b>Figura 11:</b> Percentual de sobrevida dos camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos .....	41
<b>Figura 12:</b> Avaliação da carga parasitária no coração e cólon dos camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos .....	43
<b>Figura 13:</b> Percentual médio das células NK ( $CD49b^+$ ) no sangue periférico de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	45

<b>Figura 14:</b> Percentual médio de monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) no sangue periférico de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	46
<b>Figura 15:</b> Percentual médio dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> no sangue periférico de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	48
<b>Figura 16:</b> Percentual médio dos linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	49
<b>Figura 17:</b> Percentual médio dos linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) no sangue periférico de camundongos infectados com o <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	50
<b>Figura 18:</b> Quantificação de células no tecido cardíaco de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	52
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados experimentalmente com 500 formas tripomastigotas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> . submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	53
<b>Figura 20:</b> Quantificação de células no cólon de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	54
<b>Figura 21:</b> Quantificação da área de neoformação de colágeno no coração de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> avaliados no 30° e 120° dia após a infecção (DAI). ....	55
<b>Figura 22:</b> Perfil de citocinas no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> submetidos ou não a diferentes protocolos terapêuticos. ....	57

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares ..... 25

**Tabela 2:** A atividade tripanomicida do BBI, *in vitro*, contra as formas amastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*..... 38

**Tabela 3:** Dados referentes aos períodos pré-patente e patente, valor e dia do pico máximo de parasitemia dos camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados ou não com BNZ, BBI ou BNZ/BBI.....40

**1. Introdução**

### 1.1 - O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) agente etiológico da doença de Chagas (DCh), é um protozoário hemoflagelado cujos principais hospedeiros invertebrados, vetores da DCh, são insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Chagas, 1909). Nos hospedeiros invertebrados podem ser encontradas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, enquanto no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas (Brener, 1987).

Quando o triatomíneo se alimenta com sangue de mamíferos infectados observa-se o início do ciclo biológico do *T. cruzi*. Neste momento, formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo inseto, e se transformam em esferomastigotas no estômago seguindo posteriormente para o intestino onde se transformam em epimastigotas e se reproduzem por divisão binária. Já no reto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas que são então eliminadas juntamente com as fezes e/ou urina do triatomíneo durante o seu repasto sanguíneo. Ao entrarem em contato com a mucosa lesada ocorre a penetração do parasito e conseqüentemente infecção das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam em amastigotas intracelulares dando início ao processo de multiplicação por divisão binária. Logo após, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas na corrente circulatória infectando outras células, de maneira a disseminar a infecção para outros tecidos (Chagas, 1909; Dias, 1934).

Pode-se destacar a via vetorial como a mais frequente via de transmissão da DCh. No entanto, existem outras formas de transmissão, como a via placentária, transfusional, oral, congênita ou ainda acidentes em laboratórios (Brener 1987, Prata, 2001).

A implementação de medidas para o controle da transmissão vetorial na América Latina permitiu uma redução considerável na incidência da DCh (Moncayo e Ortiz Yanine, 2006), entretanto, ainda assim, esta continua sendo uma importante via de transmissão da doença.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* é de aproximadamente 6 - 7 milhões, sendo estes indivíduos distribuídos em países da América Latina, nos quais a doença ainda é considerada endêmica e em regiões não endêmicas como em países do continente europeu, sendo as transmissões por transfusão sanguínea, transplantes e congênitas mais relevantes, uma vez que é observado alto índice de imigração de latino-americanos para estes países (Who, 2015).

Em grande parte destes países não endêmicos o controle dos bancos de sangue não tem sido realizado rigorosamente, sendo relatados diversos casos de transmissão congênita, por transfusão sanguínea e também por transplante de órgãos (Muñoz et al., 2009; Gascon et al., 2010). Dessa forma, países que recebem imigrantes latino-americanos devem realizar triagens sempre que forem realizados transplantes e doações de sangue, além de criar programas de prevenção de transmissão de mães para filhos e capacitar os profissionais para diagnosticar e tratar a doença (Salvador et al. 2014).

A DCh possui duas fases, a aguda é iniciada logo após a infecção e caracterizada por elevado parasitismo tecidual, parasitemia patente e intenso processo inflamatório (Prata, 2001; Golgher e Gazzinelli, 2004). Nesta fase da doença, embora os sinais e sintomas sejam escassos, alterações inespecíficas como febre, mal-estar, taquicardia e esplenomegalia podem ocorrer (Prata, 2001).

Já na fase crônica, os níveis de parasitemia tornam-se mais baixos, devido à ação do sistema imunológico do hospedeiro que atua no controle da multiplicação do parasito. Nessa fase, podem-se observar três formas clínicas principais: indeterminada, cardíaca e digestiva, podendo também ser observada a forma cardiodigestiva (Tafuri, 1971, Tafuri et al., 1971).

Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* podem permanecer na forma indeterminada pelo resto da vida, sendo observados apenas exames sorológicos ou parasitológicos positivos. Entretanto, 20 a 35% destes podem desenvolver lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo do coração, esôfago e/ou cólon, que levam ao desenvolvimento das formas crônicas, cardíaca e digestiva (Prata, 2001; Moncayo, 2003).

A forma indeterminada é caracterizada por lesões inflamatórias focais que podem ou não estar associadas à presença de parasitos, observados normalmente apenas por meio de técnicas com sensibilidade elevada, como PCR e imuno-histoquímica (Higuchi et al., 1993; Jones et al., 1993).

Já na forma cardíaca são observadas alterações eletrocardiográficas e manifestações clínicas que incluem arritmias e insuficiência cardíaca congestiva (Rassi et al., 2000; Prata, 2001). Além disso, estudos demonstram tanto em modelos experimentais como em humanos, a presença de processo inflamatório com predomínio de células mononucleares, assim como fibrose e necrose de miócitos, embora os parasitos sejam escassos na fase crônica (Higuchi et al., 1987; Tafuri et al., 1988; Rossi et al., 1998; Andrade, 1999; Caliari et al., 2002b).

Embora sejam demonstrados poucos parasitos na fase crônica da DCh, alguns grupos de pesquisa consideram que a resposta imunológica observada nesta fase está diretamente relacionada aos parasitos persistentes. Em contrapartida, somado à falta de relação entre a intensidade do processo inflamatório e a carga parasitária, é evidenciada a presença de células e anticorpos auto-reativos, sugerindo que a doença possa ser autoimune (Cunha-Neto et al., 1995; Leon e Engman, 2001).

No entanto, estudos demonstraram que tanto a presença do parasito (Jones et al., 1993; Tarleton e Zhang, 1999; Lages-Silva et al., 2001; Da Silveira et al., 2005), como a indução de uma resposta imunológica contra as células próprias (Cunha-Neto et al., 1995; Leon et al., 2004) parecem estar diretamente associadas à manutenção do processo inflamatório e conseqüentemente às lesões teciduais, de forma que a autoimunidade e a persistência do parasitismo tecidual deixaram de ser teorias opostas para se tornarem complementares (Soares et al., 2001, Dutra et al., 2009).

Na forma digestiva da DCh, as principais manifestações clínicas são o megaesôfago e megacólon, embora lesões no intestino delgado também já tenham sido observadas (Oliveira et al., 1983; Matsuda et al., 2009). Diversas alterações anatômicas, como hipertrofia muscular, aumento do lúmen e dilatação caracterizam a lesão observada no trato gastrointestinal (TGI) durante a doença de Chagas, sendo microscopicamente demonstrados infiltrados inflamatórios nas camadas musculares, além de ganglionites e periganglionites. Estas lesões inflamatórias no sistema nervoso entérico estão associadas à redução no número de neurônios, o que pode induzir a denervação e dilatação do órgão, sendo fundamentais no desenvolvimento da forma digestiva da doença (Köberle, 1957 e 1970; Tafuri, 1970, 1971).

## 1.2 - Imunopatologia da doença de Chagas

A resistência do hospedeiro durante a doença está relacionada tanto à imunidade inata quanto à adquirida, sendo necessária a atuação de diversas células que respondem coletivamente na tentativa de controlar a multiplicação do parasito (Rottenberg et al., 1988; Russo et al., 1988; Aliberti et al., 1996; Corbett et al., 2001). No entanto, ainda assim, o parasito pode persistir no hospedeiro, com manutenção da resposta imune, induzindo lesão tecidual e conseqüentemente alterações relacionadas à função (Jones et al., 1992; Tarleton 2001).



A fase aguda da DCh apresenta intenso processo inflamatório com produção de citocinas que apresentam papel crucial na tentativa de eliminação do parasito e sobrevivência do hospedeiro (Abrahamsohn, 1996).

Inicialmente, células fagocitárias infectadas liberam citocinas importantes na resistência do hospedeiro à infecção pelo parasito, como por exemplo, a interleucina-12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral – alpha (TNF- $\alpha$ ). Estas contribuem para a produção de Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) por células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T, estimulando o recrutamento de leucócitos e conseqüentemente a redução da parasitemia. Ademais, o IFN- $\gamma$  juntamente com o TNF- $\alpha$  auxilia a ativação de macrófagos permitindo a produção da molécula microbicida óxido nítrico (NO) e, portanto, auxiliando no controle da replicação do *T. cruzi* (Silva et al., 1992; Holscher et al., 1998; Michailowsky et al., 2001). Sendo assim, apesar das células do sistema fagocitário mononuclear serem infectadas pelo *T. cruzi*, representam o primeiro mecanismo de defesa celular contra o parasito após a infecção do hospedeiro.

Ainda em relação à resposta imune inicial, foi observado que animais deficientes em células NK apresentaram alta parasitemia na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, estas células representam uma fonte importante de IFN- $\gamma$  no início da infecção, sendo demonstrado que camundongos resistentes se tornaram susceptíveis ao serem tratados com anticorpo monoclonal anti-NK, comprovando a importância das células NK no controle da infecção aguda (Cardillo et al., 1996).

Após ativação dos linfócitos T e produção de IFN- $\gamma$  a resposta imune adaptativa é iniciada, sendo as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> fundamentais na elaboração da resposta imunológica específica contra o parasito (Tarleton, 1995; Dos Reis et al., 1997).

Em avaliação imunohistoquímica do infiltrado inflamatório cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica, foi demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) predominavam quando comparadas às células T CD4<sup>+</sup> (Higuchi et al., 1993). Estas células, além de produzirem granzimas e perforinas, também produzem IFN- $\gamma$ , permitindo a ativação de macrófagos, e conseqüentemente, produção de NO. Dessa forma, se tornam fundamentais na eliminação da célula infectada, contribuindo no controle do parasitismo na fase aguda da infecção (Muller et al., 2003; Martin e Tarleton, 2004; Borges et al., 2009).

Adicionalmente, foi constatado que camundongos deficientes em células CD4<sup>+</sup> apresentaram redução da resposta imunológica permitindo aumento do parasitismo

tecidual, devido provavelmente à não ativação de macrófagos e à proliferação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e B normalmente induzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Russo, 1988; Rottenberg et al., 1995).

Durante a fase aguda da DCh, a resposta imune humoral também contribui para o controle da infecção como evidenciado por Cardillo et al. (2007), que utilizaram em seus estudos camundongos nocautes para linfócitos B e constataram que estes animais apresentaram menor porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados e de memória no baço e no infiltrado inflamatório no tecido muscular esquelético. Ademais, observou-se, nestes mesmos camundongos, quando comparados aos camundongos selvagens, redução do infiltrado inflamatório e aumento no parasitismo tecidual durante a fase aguda da infecção.

No entanto, tem sido demonstrado em diversos estudos que camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentam ativação policlonal de células B, bem como hipergamaglobulinemia e atraso na imunidade humoral específica, o que poderia propiciar a infecção, contribuindo para a susceptibilidade do hospedeiro (Minoprio et al., 1989, Bryan et al., 2010).

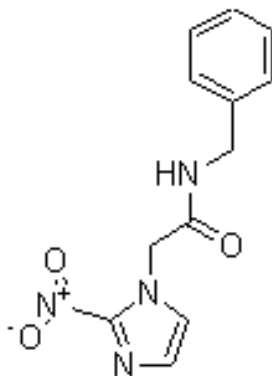
Bryan et al. (2010) notaram que, duas semanas após a infecção, camundongos C57Bl/6 desenvolveram resposta imune humoral específica contra o *T. cruzi*, bem como baixa ativação policlonal, possibilitando a resistência à infecção pela cepa Y do *T. cruzi*. Em contrapartida, camundongos BALB/c, também infectados com a cepa Y, apresentaram elevada ativação policlonal anterior às duas semanas de infecção e baixa resposta imune humoral específica, resultando na susceptibilidade à infecção. Além disso, o perfil de citocinas observado nos camundongos susceptíveis à infecção foi Th2, enquanto nos animais resistentes foi observada uma resposta do tipo Th1.

Sabe-se que o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1, observada durante a infecção pelo *T. cruzi*, é fundamental para o controle da infecção e eliminação do parasito (Hoft et al., 2000). Entretanto, já foi constatado que citocinas da resposta tipo Th2, como a IL-4, além de citocinas consideradas imunomoduladoras, como a IL-10 e o TGF-β, permitem o controle da resposta imunológica observada após a infecção pelo *T. cruzi*, de forma a evitar a exacerbação das lesões teciduais induzidas por citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1 (Silva et al.1992; D'avila et al., 2009). Dessa forma, o balanço entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias apresenta-se como fundamental para a regulação da resposta imune, sendo assim um fator relevante na determinação do curso da infecção (Dutra et al., 1997; Soares et al., 2001; Campi – Azevedo et al., 2015).

### 1.3 - Tratamento

A DCh é sabidamente uma doença negligenciada do ponto de vista terapêutico, uma vez que o financiamento por parte da indústria farmacêutica em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos ainda é escasso. Além disso, a falta de marcadores claros e precoces tanto de eficácia terapêutica quanto de progressão da doença prejudica o desenvolvimento de novos tratamentos (DNDI, 2012).

No Brasil, o único fármaco disponível para o tratamento DCh é o benznidazol – BNZ (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida). Este apresenta capacidade tripanomicida para todas as formas do parasito e promove bons níveis de cura na fase aguda, entretanto na fase crônica demonstra baixa atividade antiparasitária, sendo esta uma das maiores limitações do mesmo (Coura e de Castro, 2002).



**Figura 1: Estrutura química do Benznidazol** (Fórmula molecular:  $C_{12}H_{12}N_4O_3$  e Peso molecular: 260.25g/mol).

Independente da via de transmissão do parasito, o tratamento com BNZ durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é recomendado. Todavia, embora o tratamento da DCh nesta fase seja capaz de curar cerca de 80% dos pacientes e tenha apresentado bons resultados em casos de fase crônica recente, infecções congênitas e acidentes laboratoriais, na fase crônica tardia a sua eficácia é constantemente questionada. Ainda assim, o tratamento tem sido proposto em casos de infecção crônica tardia sem manifestações clínicas ou com manifestações moderadas, objetivando a prevenção da progressão da doença (Viotti et al., 2007; Lana et al., 2009; Bern, 2015).

Diversos estudos demonstram que o tratamento com BNZ, embora não seja eficaz na eliminação do parasito quando administrado na fase crônica da doença, promove significativa redução nas alterações eletrocardiográficas e a progressão clínica da patologia

(Sosa-Estani e Segura, 2006; Viotti et al., 2006; Viotti e Vigliano, 2007). Este efeito positivo do tratamento na evolução clínica da doença pode ser explicado pela redução do parasitismo tecidual e do processo inflamatório associado ao mesmo (Tarleton, 2001; Viotti et al., 2006; Viotti e Vigliano, 2007; revisado por Urbina, 2010). Além disso, Campi – Azevedo et al. em 2015, observaram que o tratamento com BNZ induziu mudanças no perfil imunológico em pacientes com a forma cardíaca, favorecendo a produção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  pelos monócitos, o que pode contribuir para evitar a progressão da doença.

A diferença na eficácia dos compostos nitro – heterocíclicos, nas fases aguda e crônica da DCh, pode estar relacionada a propriedades farmacocinéticas, como uma meia vida relativamente curta (Urbina, 2002; Urbina e Docampo, 2003). Além disso, a resistência característica de diversas cepas de *T. cruzi* a nitroderivados pode explicar a baixa taxa de cura observada em pacientes tratados (Filardi e Brener, 1987; Murta et al., 1998; revisado por Murta, 1999).

O mecanismo de ação do BNZ ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, sabe-se que se baseia na formação de radicais livres intermediários ou metabólitos nucleofílicos, através da redução do grupo nitro pela ação de enzimas do tipo nitroreduases do citocromo P-450 (Polak e Richle, 1978; Docampo e Moreno, 1984). Estes radicais livres formam ligações covalentes com lipídios, proteínas e DNA, lesando os componentes celulares dos parasitos (Dias de Toranzo et al., 1988, Urbina, 1999). Além disso, estudos demonstram que o BNZ aumenta a fagocitose do *T. cruzi* devido ao aumento de IFN- $\gamma$  e inibição da NADH-fumarato redutase do parasito (Docampo e Moreno, 1984).

Durante o tratamento com BNZ podem surgir reações adversas, tais como: sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema, purpura, febre, anorexia, perda de peso corporal, linfadenopatia, dor muscular, depressão da medula óssea, distúrbios gastrointestinais, trombocitopenia e agranulocitose, polineuropatia, parestesias e polineurites periféricas (Coura e de Castro, 2002; Lamas et al., 2006). Sendo assim, devido à conhecida toxicidade do BNZ e seu efeito limitado em relação às fases da doença, a busca por novos fármacos se faz necessária (Coura e De Castro, 2002; Soeiro e De Castro, 2009).

Neste contexto, vários alvos biológicos promissores têm sido selecionados na busca por novos fármacos para tratamento da doença, dentre os quais pode-se destacar: enzima tripanotiona redutase, biossíntese de esteróis e as proteases.

Os derivados nitrofuranos provocam a inativação irreversível da enzima tripanotiona redutase do *T. cruzi*, que está envolvida no metabolismo oxidativo do parasito. Estudos *in vitro* obtiveram um derivado a partir do nitrofural, a hidroximetilnitrofurazona, e demonstraram que este pró-farmaco apresentou atividade tripanomicida superior à Nitrofurazona e ao BNZ, e toxicidade menor que o fármaco original (Chung et al., 2003).

Fármacos inibidores da biossíntese de esteróis como o Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol também demonstraram ação tripanomicida *in vitro*, visto que o parasito precisa de esteróis específicos para a sobrevivência e multiplicação. Entretanto, trabalhos indicam que estes compostos não são suficientemente eficazes para erradicar a infecção em animais crônicos experimentalmente infectados ou em humanos, embora uma redução na carga parasitária, bem como nas reações adversas possa ser observada (Revisado em Urbina 2001, 2002).

Posteriormente, foram sintetizados compostos estruturalmente semelhantes a estes, como o Posaconazol que permitiu a cura parasitológica em modelos murinos nas fases aguda e crônica da DCh (Molina et al., 2000; Urbina e Docampo, 2003). Entretanto, ao ser avaliado o efeito do tratamento com esse composto em pacientes crônicos portadores da DCh não foi observada a mesma eficácia demonstrada em camundongos. Uma possível explicação para esta divergência de resultados seria que a fase crônica no modelo murino fosse correspondente à fase crônica recente em pacientes, sendo a resposta superestimada. Já que na fase crônica tardia, o *T. cruzi* pode ter formas amastigotas quiescentes, contra os quais o composto não apresenta efeito satisfatório (Molina et al., 2014).

As proteases também foram selecionadas como potenciais alvos no desenvolvimento de novos fármacos anti – *T. cruzi*, pois estão diretamente envolvidas na sobrevivência, multiplicação do parasito, e conseqüentemente no desenvolvimento desta doença (McKerrow et al., 1993).

Um grande número de pesquisas a respeito do papel das proteases em doenças inflamatórias tem sido realizado (Safavi et al., 2012). Estas são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e são classificadas de acordo com a interação do seu resíduo catalítico com inibidores específicos, sendo distribuídas nas seguintes categorias: serino proteases; aspártico-proteases, metaloproteases e cisteíno-proteases, além da treonino-protease e glutâmico-protease, incluídas recentemente (Barret e McDonald, 1986).

Sendo assim, uma estratégia válida na busca por compostos com atividade tripanomicida baseia-se na inibição das proteases do parasito como a cruzipaína, enzima que pertence à classe das cisteíno-proteases, importante na sobrevivência e crescimento do

*T. cruzi*, sendo observada sua expressão em diferentes níveis nos diferentes estágios do mesmo (Cazzulo et al., 2001). Além disso, alguns inibidores de protease demonstraram ter ação tripanomicida tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Chen et al., 2010), além de permitirem redução da inflamação e lesão tecidual (Jelicks et al., 2002; Barr et al., 2005).

As serino proteases participam de vários processos fisiológicos e patológicos, e estão diretamente envolvidas na resposta imunológica com ação pró-inflamatória (Safavi et al., 2012). A proteinase 3 e a Cathepsina G, por exemplo, são serino proteases armazenadas em grandes quantidades nas células polimorfonucleares (Korkmaz et al., 2010) que induzem a atividade pró-inflamatória da IL-32 e a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T, respectivamente (Novick et al., 2006; Tani et al., 2001).

Já as granzimas são serino proteases produzidas por linfócitos T e células NK, que induzem a morte por apoptose de células-alvo, além de auxiliar a proliferação de células B e facilitar a chegada de células T ao local da infecção (Mullbacher et al., 1999; Trapani, 2001, Safavi et al., 2012).

Dessa forma, acredita-se que os inibidores das serina proteases, podem ser eficazes no tratamento de doenças inflamatórias, modificando diversas vias de inflamação e modulando o sistema imune, por meio do controle da produção de citocinas e quimiocinas, uma vez que estas se encontram amplamente envolvidas em respostas imunológicas pró-inflamatórias (Safavi et al., 2012).

A combinação de compostos também pode representar uma alternativa terapêutica relevante para o tratamento da DCh, sendo uma estratégia já utilizada no tratamento de várias doenças tais como o câncer, doenças infecciosas e protozooses (Fivelman et al., 2004).

Diversas combinações de fármacos já foram avaliadas para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Urbina et al. (1993) avaliaram a eficácia da combinação do cetaconazol e da lovastatina e observaram uma atividade anti – proliferativa sobre as formas epimastigotas e amastigotas *in vitro*, no entanto este resultado não foi observado quando a mesma associação foi avaliada *in vivo*. Já Araújo et al. (2000) observaram que o BNZ associado ao Cetaconazol induziu um efeito sinérgico em camundongos infectados pela cepa Y e CL, mas não em camundongos infectados pela cepa Colombiana. No mesmo estudo, avaliaram também a associação entre BNZ e Ofloxacino, no entanto esta combinação não apresentou resultados positivos.

Benaim et al. (2006) mostraram que a amiodarona, medicamento utilizado para o tratamento de arritmias atua de forma sinérgica com o Posaconazol, bloqueando a

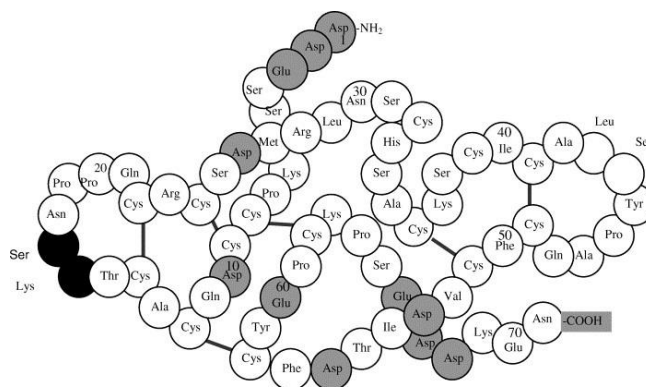
biossíntese de ergosterol e, López-Munoz et al., em 2010, demonstraram um efeito sinérgico de aspirina com o nifurtimox e o BNZ na infecção pelo *T. cruzi in vitro*, considerando que a capacidade da aspirina em aumentar a atividade antiparasitária dos macrófagos resulta no aumento do efeito dos fármacos avaliados.

Pelizzaro-Rocha et al. (2010) ao avaliarem o efeito da combinação do BNZ com Partenólido, produto natural que exhibe propriedades anti-inflamatórias, sobre o *T. cruzi*, observaram efeito sinérgico dos dois compostos sobre as formas epimastigotas. Além disso, demonstraram que combinações de drogas podem não apenas controlar a infecção, mas também reduzir o dano às células do hospedeiro, uma vez que o efeito citotóxico do BNZ foi reduzido quando administrado juntamente com o Partenólido.

#### 1.4- Inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk*

O inibidor de proteases do tipo *Bowman-Birk* (BBI) foi isolado em sementes de soja, e posteriormente encontrado em outras leguminosas (Norioka et al., 1983), e gramíneas (Odani et al., 1986). O BBI identificado na soja (*Glycine max*) consiste em uma cadeia de 71 aminoácidos ligados por sete pontes dissulfeto, devido às quais forma-se uma estrutura rígida composta por dois sítios independentes de ligação à protease, um capaz de inibir tripsina e o outro com alta afinidade de ligação para quimotripsina (Odani e Ikenaka, 1973).

Este inibidor de protease é capaz de resistir a temperaturas e a valores de pH elevados, bem como a enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, atingindo o intestino com suas estruturas praticamente inalteradas, características relevantes que o tornam um excelente candidato para administração oral (Birk, 1985; Losso, 2008; Marin-Manzano et al., 2009).



**Figura 2: Estrutura química do BBI.** Em branco, o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser), e do lado esquerdo, em preto, o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser) (Safavi e Rostami, 2012).

Estudo demonstrou que o BBI é um poderoso inibidor da inflamação através das vias COX-2/PGE2 e iNOS/NO permitindo assim redução nos danos proteolíticos e oxidativos que ocorrem durante o processo inflamatório. Em baixas concentrações (20 uM), o BBI foi capaz de inibir 45% da produção de PGE2 e 50% de NO em cultura de macrófagos (Dia et al., 2008). Além disso, foi observado que o BBI concentrado foi benéfico para camundongos com colite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio, reduzindo a inflamação no cólon quando administrado durante e após o tratamento (Ware, 1999).

Estudos sugerem que o efeito positivo do tratamento com BBI em encefalomiélites autoimunes experimentais (EAE) ocorre principalmente devido à alteração no perfil de citocinas produzidas por células da resposta imune. O tratamento com BBI aumenta a produção de IL-5 e IL-10, sendo este um dos mecanismos associados ao efeito imunoregulatório do BBI (Touil et al., 2008).

Dai e colaboradores (2012) observaram que o tratamento com BBI não teve efeito benéfico em camundongos KO para IL-10. Estes apresentaram desenvolvimento normal da EAE, demonstrando claramente que a IL-10 é fundamental na redução da inflamação induzida por BBI, assim como demonstraram também que durante o tratamento com este inibidor de protease, a principal fonte de IL-10 seriam as células T CD4<sup>+</sup>.

Dessa forma, uma vez que a patogênese das lesões na DCh está diretamente associada a uma exacerbação do processo inflamatório, acredita-se que a combinação do BNZ, droga utilizada atualmente no tratamento da mesma, com o BBI, composto que possui propriedades anti-inflamatórias conhecidas, possa promover melhora parasitológica, assim como redução da lesão tecidual comumente observada na infecção pelo *T. cruzi*.



**2. Justificativa**

Sabe-se que a DCh apresenta patogênese inflamatória, exibindo no coração um componente difuso que pode se manifestar tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Esta inflamação cardíaca pode desencadear o processo de fibrose, uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica, que se encontra associada a infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em degeneração. Além disso, lesões inflamatórias do sistema nervoso entérico induzem perda de neurônios e células gliais, sendo consideradas fundamentais na patogênese da forma digestiva da DCh.

Sendo assim, é importante buscar um tratamento capaz não apenas de eliminar o parasito, mas também de reduzir a inflamação causada pelo mesmo. Dessa maneira a associação do benznidazol com o BBI, conhecido por reduzir o processo inflamatório em outras doenças, poderia induzir a redução da inflamação causada pelo *T. cruzi*, diminuindo assim a lesão tecidual típica dessa doença, além de reduzir o parasitismo.

**3. Objetivos**

### 3.1 - Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com o inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk*, combinado ou não com o benznidazol, ao longo da infecção experimental de camundongos *Swiss* pela cepa Y do *T. cruzi*.

### 3.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* do tratamento com inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk* sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*;
- Analisar o efeito *in vivo* do tratamento com inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk*, associado ou não ao benznidazol, sobre a curva de parasitemia, a taxa de sobrevivência e sobre as células mononucleares do sangue periférico;
- Realizar a avaliação, *post-mortem*, do tratamento com inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk*, associado ou não ao benznidazol, sobre o processo inflamatório, a neoformação de colágeno, carga parasitária e produção de citocinas no coração e no cólon.

**4. Material e Métodos**

#### 4.1 - Avaliação do efeito do BBI *in vitro*

A avaliação, *in vitro*, do efeito do BBI sobre as formas tripomastigotas e amastigotas (formas do parasito relevantes na infecção humana) foi realizada no centro de pesquisas Rene Rachou – Fiocruz, de acordo com o protocolo descrito por Buckner et al. (1996) com modificações.

A cepa do *T. cruzi* utilizada neste ensaio foi a Tulahuen que expressa o gene de *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase, cultivada em monocamada de fibroblastos L929 de camundongo. Esta cepa foi utilizada devido à dificuldade em se utilizar diferentes cepas do *T. cruzi*, como Y e Colombiana transfectadas com  $\beta$ -galactosidase, outras enzimas, ou proteína verde fluorescente, sendo esta uma das limitações do método.

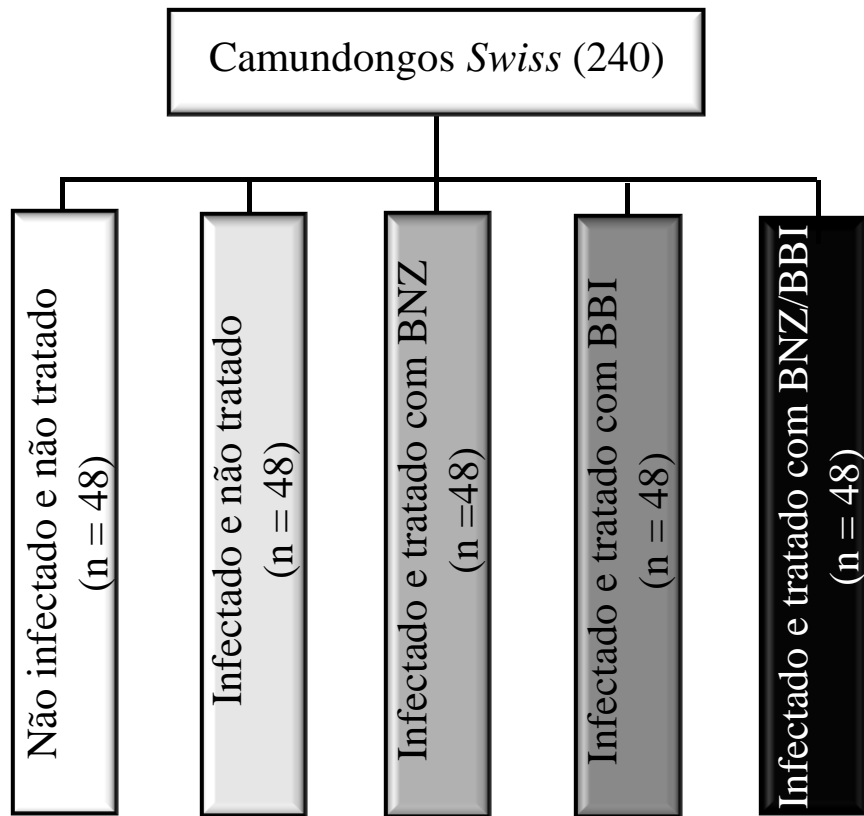
Em resumo, placas de cultura de 96 poços foram cobertas com fibroblastos L929 ( $4 \times 10^3$ ) em 80  $\mu$ l de RPMI por poço e posteriormente incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, tripomastigotas da cepa Tulahuen ( $4 \times 10^4$  diluídos em 20  $\mu$ l de RPMI), expressando o gene  $\beta$ -galactosidase foram adicionadas nos poços previamente revestidos com fibroblastos L929. Após duas horas, o sobrenadante com as tripomastigotas que não conseguiram penetrar nas células foi substituído por 200  $\mu$ l de meio RPMI por poço e a placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48h. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e em cada poço foi acrescentado 180  $\mu$ l de meio RPMI e 20  $\mu$ l de BBI em diferentes concentrações. Após incubação de 96 horas, o substrato cromogênico vermelho de clorofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido (500  $\mu$ M de concentração final) e Nonidet P-40 (0,5% de concentração final) foram adicionados às placas e incubados *overnight* a 37°C. A densidade óptica foi então mensurada em leitor de Microelisa no comprimento de onda de 570 nm, sendo que o controle positivo utilizado foi o BNZ na concentração necessária para inibir 50% do número de tripomastigotas (IC<sub>50</sub> = 1 mg/ml = 3,81  $\mu$ M). Os resultados foram expressos como percentagem de atividade tripanomicida (Oliveira et al., 2006).

#### 4.2 - Animais, inóculo e tratamentos utilizados

Foram utilizados 240 camundongos *Swiss*, machos, com 30 dias de idade distribuídos em cinco grandes grupos: não infectado e não tratado (n=48); infectado e não tratado (n=48); infectado e tratado com BNZ (n=48), infectado e tratado com BBI (n=48) e infectado e tratado com BNZ e BBI (n=48) (Figura 3). Os animais infectados foram

inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Esta cepa foi obtida de camundongos albinos *Swiss* mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Para o tratamento com BBI foram empregados três mg de BBI de *Glycine max* via oral por gavagem, durante 20 dias consecutivos, a partir do primeiro dia em que foi identificada parasitemia no exame de sangue a fresco. Para o tratamento etiológico da doença de Chagas foi empregado 100 mg/kg/dia de BNZ administrado via oral, por 20 dias consecutivos, a partir do primeiro dia em que foi identificada parasitemia no exame de sangue a fresco. Os camundongos pertencentes ao grupo não tratado receberam a mesma quantidade de H<sub>2</sub>O via gavagem. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL-CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto- CEUA (Protocolo nº 2011/67).



**Figura 3:** Fluxograma representativo dos cinco grupos experimentais: grupo controle não infectado, controle infectado e não tratado, infectado e tratado com benznidazol, infectado e tratado com BBI e infectado e tratado com benznidazol e BBI. Os animais infectados foram inoculados com 500 formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.



### 4.3 - Curvas de parasitemia e taxa de sobrevivência

#### 4.3.1. Curva de parasitemia

Para determinação da parasitemia, seis camundongos de cada grupo foram avaliados diariamente por exame de sangue à fresco a partir do 4º dia após a infecção até a negatificação do exame, por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia de Brener (1962). Para isso, cinco  $\mu\text{L}$  de sangue foram retirados da veia caudal dos camundongos e analisados diariamente ao microscópio óptico, sendo a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental e expressa em número de tripomastigotas sanguíneas por 0,1ml de sangue.

As curvas de parasitemia representam as médias diárias de parasitos observados no sangue periférico dos camundongos de cada grupo e por meio de sua avaliação foram determinados os seguintes parâmetros:

##### **Período Pré-patente (PPP)**

Período compreendido entre o dia em que foi realizado o inóculo e o primeiro dia no qual foi observado parasito no sangue periférico do camundongo por meio do exame de sangue à fresco (Resultado expresso em dias).

##### **Período Patente (PP)**

Período compreendido entre o primeiro e o último dia no qual foi detectado parasito no exame de sangue à fresco (Resultado expresso em dias).

##### **Pico Máximo de Parasitemia (PMP)**

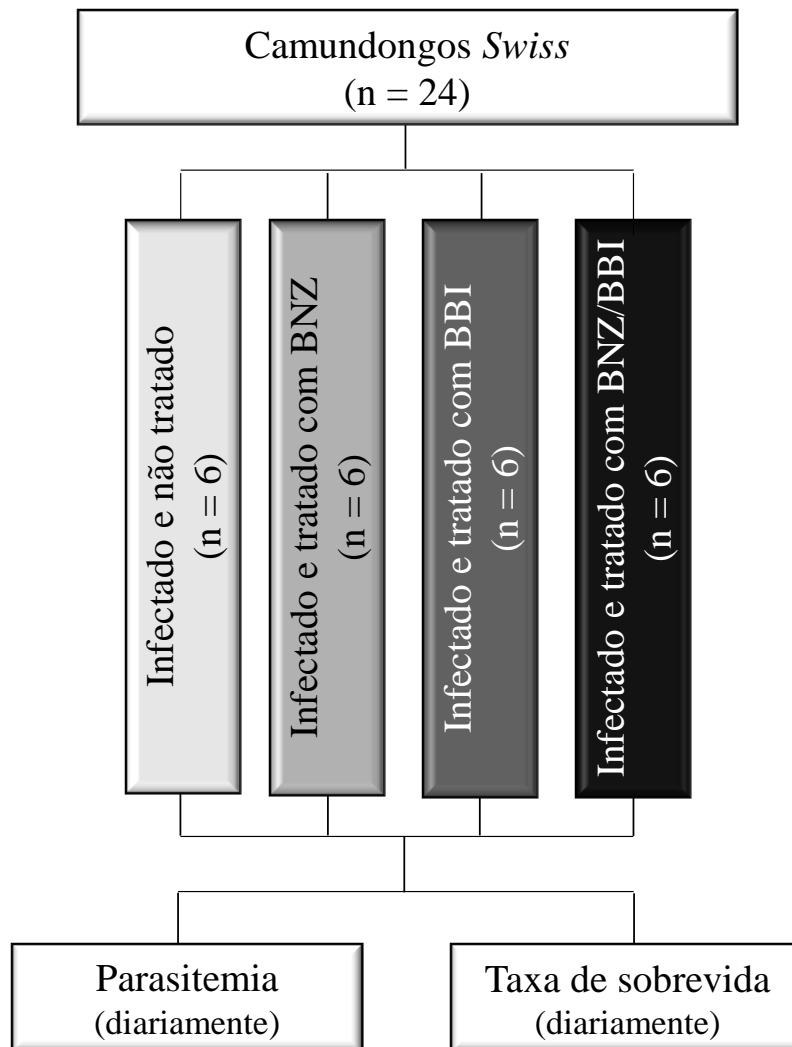
Valor máximo de parasitemia detectado pelo exame de sangue à fresco (Resultado expresso em número de tripomastigotas sanguíneas/0.1mL de sangue).

##### **Dia do Pico Máximo (DPMP)**

Dia no qual foi detectado valor máximo de parasitos pelo exame de sangue à fresco (Resultado expresso em dias).

### 4.3.2. Taxa de Sobrevida

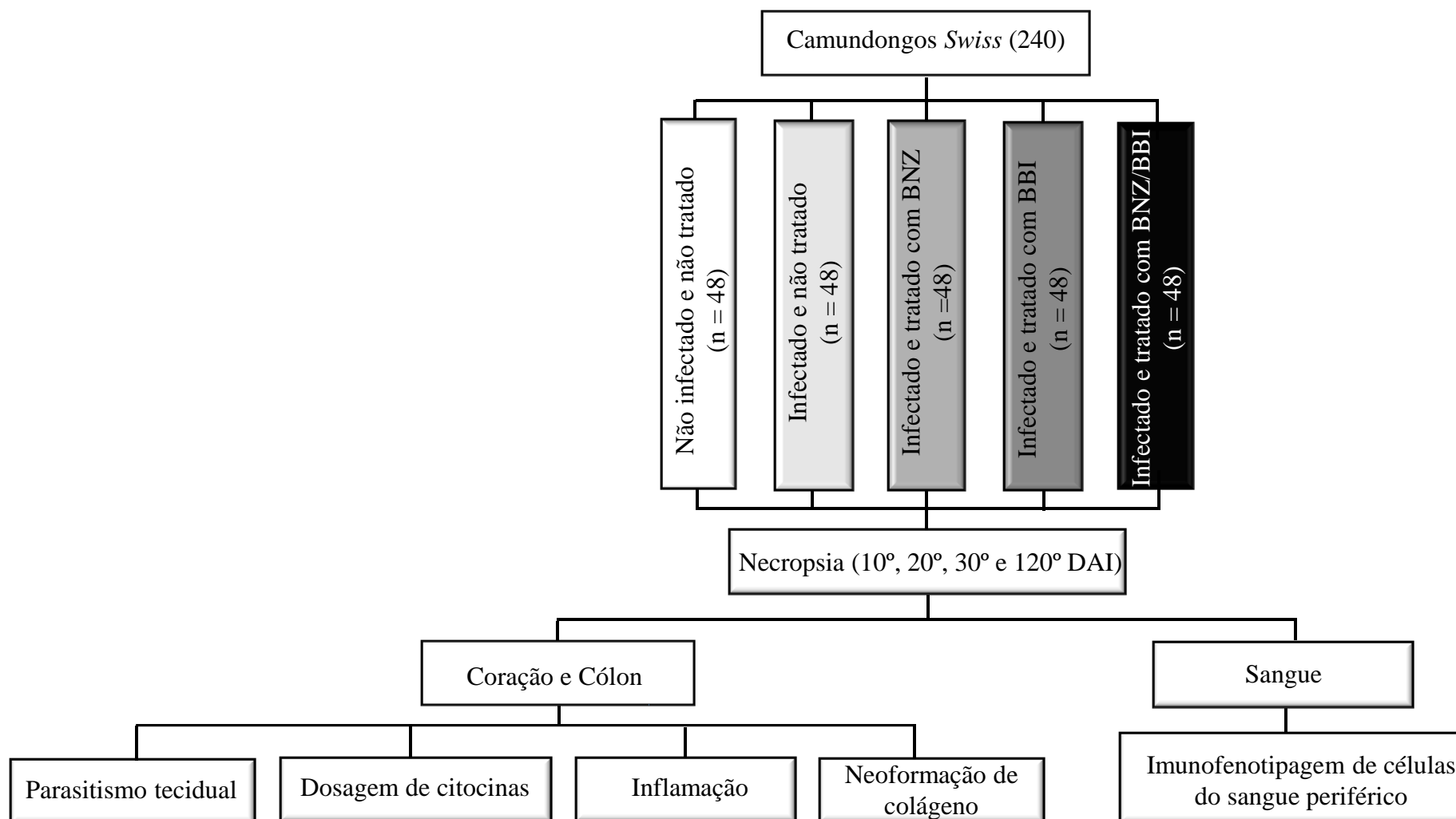
Para definir a taxa de sobrevida, 24 animais (mesmos utilizados na determinação da parasitemia) foram acompanhados diariamente até o 120º DAI sendo a sobrevida registrada e expressa em percentagem cumulativa (Figura 4).



**Figura 4:** Fluxograma representando os animais utilizados para determinação da curva de parasitemia e taxa de sobrevida.

#### 4.4 - Necropsia

Seis animais de cada grupo experimental foram eutanasiados, por deslocamento cervical, aos 10°, 20°, 30° e 120° DAI. Durante a necróspia, foram coletadas amostras de 300µl de sangue do plexo orbital para a realização de imunofenotipagem do sangue periférico. Além disso, amostras de coração *in totum* e cólon (região retossigmóide) foram coletadas, sendo um fragmento de cada órgão fixado em solução Metanol/DMSO, processado e incluído em blocos de parafina para posterior avaliação morfométrica das lesões histológicas, enquanto um segundo fragmento foi submerso em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C para quantificação do parasitismo tecidual por PCR em tempo real e dosagem de citocinas.



**Figura 5:** Fluxograma representativo das atividades relacionadas à avaliação *in vivo*. Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais: grupo controle não infectado, controle infectado e não tratado, infectado e tratado com benznidazol, infectado e tratado com BBI e infectado e tratado com benznidazol e BBI. Os animais dos grupos infectados foram inoculados com 500 formas trypomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Todas as análises foram realizadas em amostras coletadas no 10°, 20°, 30° e 120° DAI. Experimentos realizados em duplicata.

#### 4.5 - Imunofenotipagem do sangue periférico

Para realizar a caracterização do perfil fenotípico celular do sangue periférico, foram adicionados cinco  $\mu\text{L}$  de anticorpo monoclonal com especificidade para marcadores de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo em tubos de poliestireno 12x75 mm (Tabela 1). Para cada tubo com anticorpo, foram transferidas alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de sangue, sendo em seguida incubados por 30 minutos e ao abrigo da luz. Após a incubação, foi realizada a lise dos eritrócitos, utilizando dois mL de solução de lise Billig diluída 10 vezes em água destilada e homogeneizadas em vórtex. As preparações foram novamente incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação por 7 minutos a 1300rpm e 18° C. O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com três mL de PBS (pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anterior. Terminada esta etapa, os leucócitos foram fixados com 200  $\mu\text{L}$  de solução fixadora (10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos a 4° C, procedeu-se a leitura no citômetro de fluxo (FACScan® – Becton Dickinson), e os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada um dos tubos foram definidos. O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados.

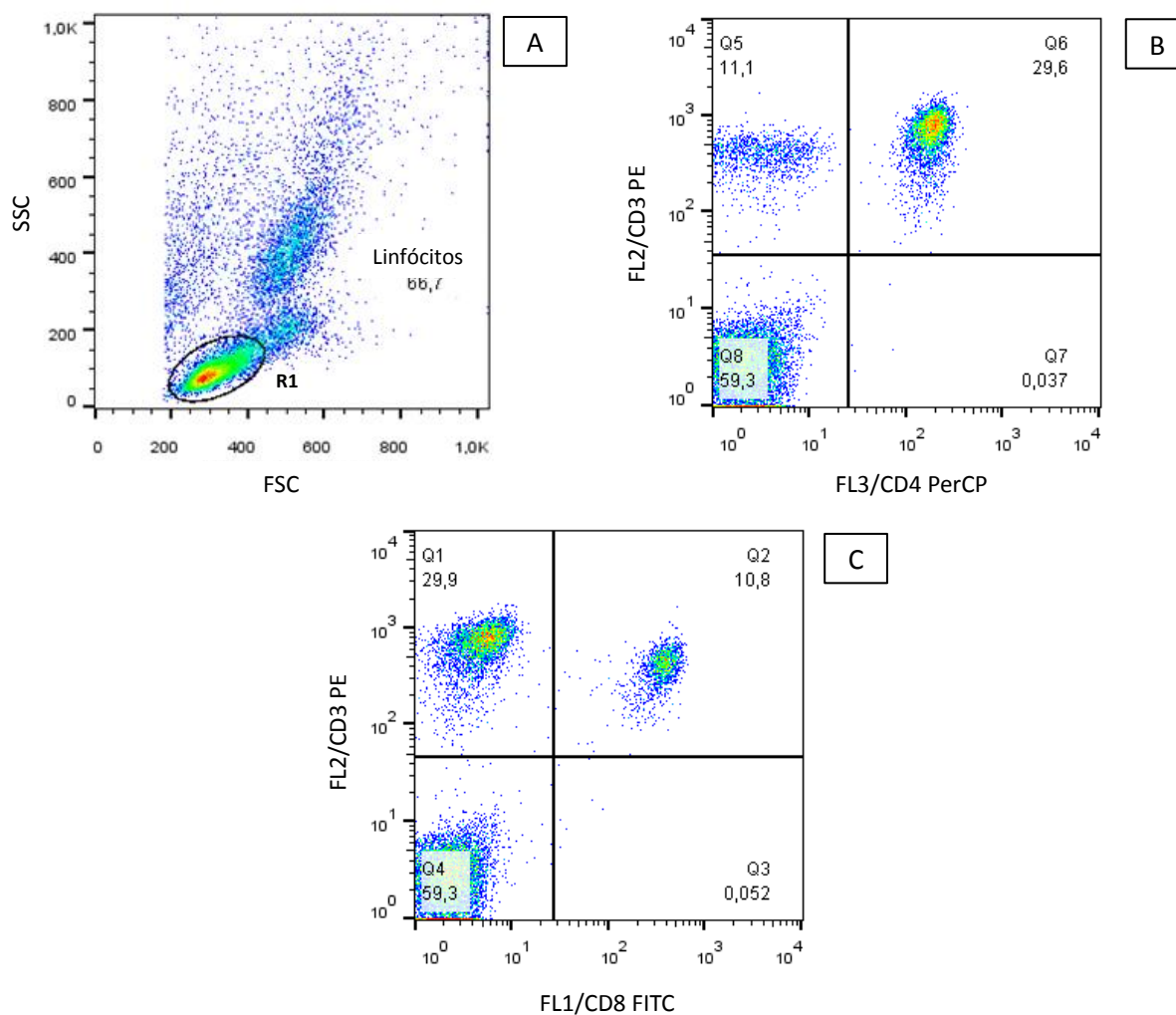
**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados na análise do perfil fenotípico celular do sangue periférico em camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3	PE	BioLegend	Linfócitos T
Anti-CD4	Perc P	BioLegend	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Invitrogen	Linfócitos T citotóxicos
Anti-B cell	FITC	eBioscience	Linfócitos B
Anti-CD14	FITC	eBioscience	Monócitos
Anti-CD49	FITC	BD Biosciences	Células NK

#### 4.5.1- Estratégias para análise imunofenotípica do sangue periférico por citometria de fluxo

Os perfis fenotípicos das populações e subpopulações celulares foram obtidos por meio da frequência (%) de subpopulações de linfócitos T ( $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$ ), de linfócitos B ( $CD19^+$ ), de células NK ( $CD49b^+$ ) e de monócitos ( $CD14^+$ ).

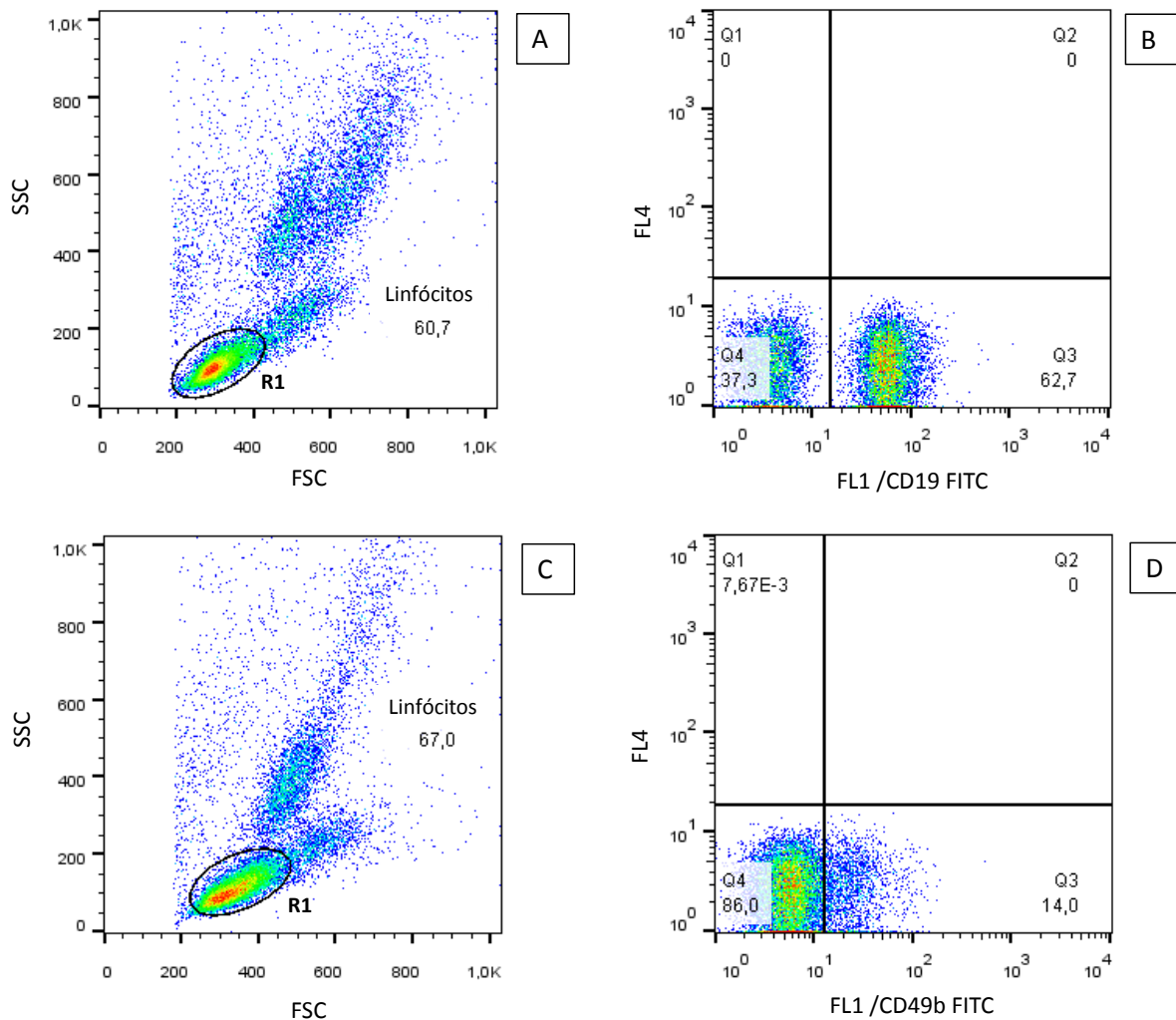
Para a análise da frequência de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$  foi utilizada a estratégia convencional. Para isso, a população celular de interesse foi delimitada, com base em aspectos morfométricos dos linfócitos, em gráficos de distribuição pontual de FSC *versus* SSC (Figura 6A). A partir da seleção da população interesse (R1) foi obtido o percentual de subpopulações T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$  em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como observado nas Figuras 6B e 6C.



**Figura 6:** Sequência de métodos utilizados na quantificação do percentual de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$ , no sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de linfócitos, R1. (B) Gráficos de distribuição pontual FL2/CD3-PE versus FL3/CD4-PerCP, contendo as células selecionadas na região R1, utilizados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$ . (C) Gráficos de distribuição pontual FL2/CD3-PE versus FL1/CD8-FITC, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T  $CD3^+CD8^+$ .

As análises das frequências de linfócitos B  $CD19^+$  e de células NK  $CD49b^+$  também foram realizadas utilizando-se a estratégia de análise convencional, com seleção da população celular de interesse nos gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 7A e C). Após a seleção da região de interesse (R1), foi obtido o percentual de

linfócitos B CD19<sup>+</sup> e de células NK CD49b<sup>+</sup> em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como demonstrado nas Figuras 7B e 7D, respectivamente.

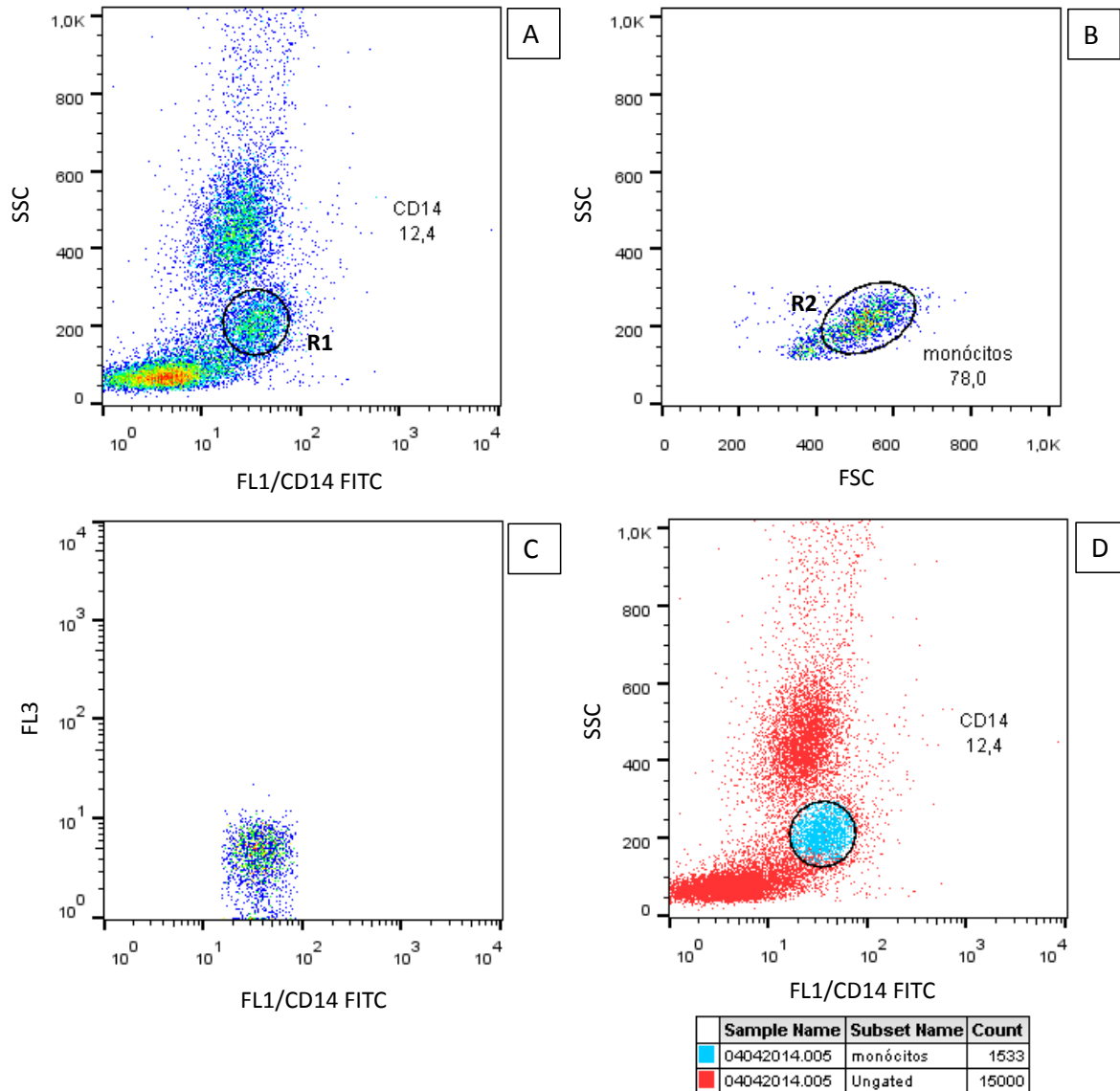


**Figura 7:** Sequência de métodos utilizados na quantificação do percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e de células NK CD49b<sup>+</sup> no sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e submetidos a diferentes tratamentos. (A e C) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse, R1. (B) Gráficos de distribuição pontual FL4 versus FL1/CD19-FITC, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup>. (D) Gráficos de distribuição pontual FL4 versus FL1/NK CD49b-FITC, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de células NK CD49b<sup>+</sup>.

Para análise de monócitos CD14<sup>+</sup> foi selecionada a região de interesse (R1) nos gráficos de distribuição pontual de SSC versus FL1/CD14<sup>+</sup>, para a identificação da população de monócitos como células CD14<sup>+</sup> High SSC intermediário, o que reduz a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 8A). Em seguida, a região de interesse R2 foi obtida dentro de R1, em gráficos bidimensionais de SSC versus FSC (Figura 8B). A confirmação de que a população R2 seria CD14<sup>+</sup>, foi realizada em



gráficos bidimensionais de FL3 *versus* FL1/CD14<sup>+</sup> (Figura 8C) e para garantir que o percentual observado era realmente de monócitos CD14<sup>+</sup>, foi feito um *ungated* interpolando os gráficos.



**Figura 8:** Sequência de métodos utilizados na quantificação do percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>, no sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Gráfico de distribuição pontual SSC versus FL1/CD14-FITC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1. (B) Gráficos de distribuição pontual SSC versus FSC para a seleção da população celular de interesse – R2. (C) Gráficos de distribuição pontual FL3 versus FL1/CD14-FITC, contendo as células selecionadas na região R2. (D) Ungated dos gráficos de distribuição pontual de SSC versus FL1/CD14-FITC com os gráficos de FL3 versus FL1/CD14-FITC, empregados para quantificar o percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>.

#### 4.6 - Análise das alterações histopatológicas

A análise da histopatologia foi realizada em cortes de coração e cólon submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson.

Para avaliação do processo inflamatório, os cortes foram submetidos a duas trocas de xilol para desparafinização, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina (10 minutos) e então lavados novamente em água corrente, objetivando a retirada de excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e imersos em água corrente, evitando assim que ocorresse a acidificação excessiva dos mesmos. Posteriormente, foram corados pela Eosina (30 segundos) e lavados pela última vez em água corrente. Após a lavagem, foram desidratados em dois banhos de álcool absoluto e submetidos à secagem em estufa a 56°C e montados com o auxílio de Entellan e lamínula.

Os núcleos celulares presentes nos cortes foram quantificados em 20 imagens aleatórias, de forma que a área percorrida fosse  $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ , e as imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi considerado quando foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi* e aquele observado nos animais não infectados  $\pm$  desvio padrão (Caliari, 1997; Maltos et al., 2004; Ferreira Junior et al., 2015).

Para a quantificação da área ocupada por fibras colágenas, os cortes de fragmentos de coração e cólon foram desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então submetidos à lavagem em água corrente. Em seguida, os cortes foram corados por Hematoxilina de Harris (30 segundos) e lavados em água corrente (5 minutos) objetivando a retirada do excesso do corante. Os cortes foram submetidos à coloração pela solução número I (Sudam, fucsina ácida e ácido acético glacial) por um minuto e em seguida lavados em água corrente (2 minutos). A solução número II (ácido fosfotúngstico, ácido fosfomolibdico e água destilada) foi gotejada sobre as lâminas contendo os cortes histológicos (10 minutos), e estes foram então lavados em água corrente (2 minutos). Posteriormente, foi aplicada sobre os cortes a

solução número III (azul de anilina, água destilada e ácido acético glacial) por cinco minutos, com posterior lavagem em água corrente por dois minutos. Por fim, os cortes foram desidratados, em dois banhos de álcool absoluto e submetidos à secagem em estufa (56°C) e montados com o auxílio de Entellan e lamínula.

Nos fragmentos de coração, a área ocupada pelas fibras colágenas foi avaliada em 20 imagens aleatórias, percorrendo área de  $1,3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . As imagens foram visualizadas e capturadas pela objetiva de 20x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. A área com neoformação de colágeno foi quantificada através de pixels em tons de azul, selecionados para a formação de uma imagem binária e em seguida utilizados para calcular a área total ocupada por colágeno, conforme equações abaixo:

$$\text{Porcentagem de fibras de colágeno} = \frac{\text{área do colágeno}}{\text{área do colágeno} + \text{área do tecido}} \times 100$$

$$\text{Colágeno acertado} = \frac{\text{porcentagem de colágeno} \times \text{área do frame}}{100}$$

Nos fragmentos de cólon, a neoformação de colágeno foi avaliada de forma semi-quantitativa, sendo utilizada objetiva de 20x para todas as análises. A neoformação de colágeno não foi observada no grupo de animais não infectados (grupo controle), sendo este classificado como ausente. Considerando este dado, os animais dos demais grupos foram classificados quanto à presença de neoformação de fibras colágenas como: ausente, discreta, moderada ou intensa.

#### 4.7 - Carga parasitária

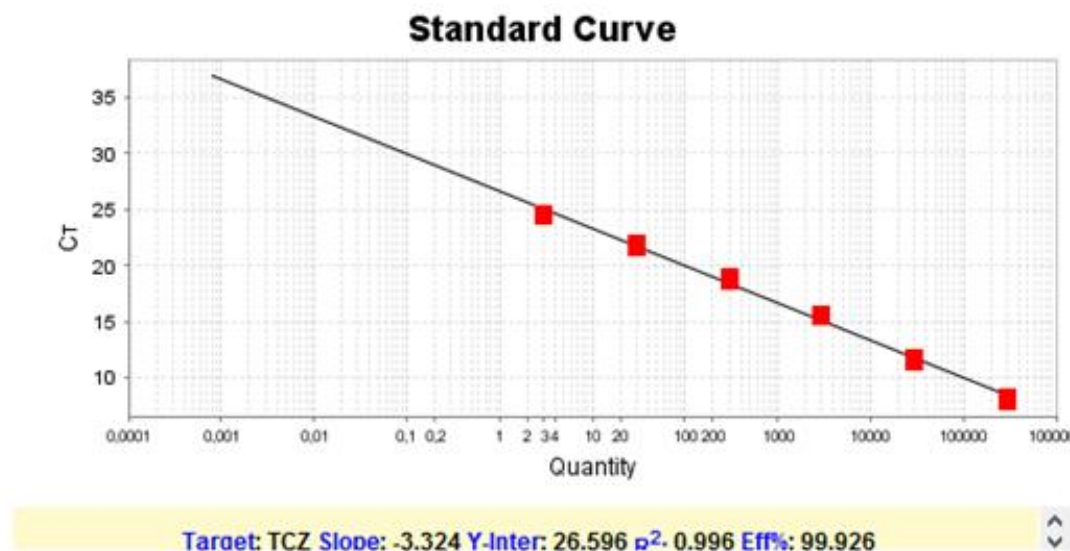
A carga parasitária foi avaliada utilizando a técnica de qPCR. Neste sentido, fragmentos de coração e cólon foram armazenados inicialmente à  $-80^{\circ}\text{C}$ , cortados e pesados, obtendo-se fragmentos de 20-30 mg. Estes foram então submetidos aos métodos de extração de DNA utilizando o kit *Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Nos tubos contendo os fragmentos de tecido foram adicionados, inicialmente, 500  $\mu\text{L}$  de solução de lise nuclear e em seguida colocou-se os mesmos tubos no gelo por dois minutos. Posteriormente, estes foram homogeneizados por inversão, adicionados de 30  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (*Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, USA) a 20 mg/mL e mantidos *overnight* em banho seco à  $55^{\circ}\text{C}$ . Após este período, eles foram adicionados de três  $\mu\text{L}$  de RNase e colocados por 30 minutos em banho seco à  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por cinco minutos e adicionados de 200  $\mu\text{L}$  de solução de precipitação protéica. As amostras foram homogeneizadas por 20 segundos utilizando-se o aparelho vortex (*Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA*), e centrifugadas por 5 minutos à 16.000g (Microcentrífuga Eppendorf<sup>®</sup>- Modelo 5418, NY, USA). Foi realizada a transferência dos sobrenadantes para outros tubos nos quais haviam sido adicionados previamente 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Merck<sup>®</sup>, Darmstad, Alemanha). Estes tubos contendo as amostras foram então homogeneizados e centrifugados por 1,5 minutos a 16.000 g. Os sobrenadantes foram então descartados e os sedimentos foram adicionados de 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (Merck<sup>®</sup>, Darmstad, Alemanha). Após ser realizada outra centrifugação a 16.000 g, os sobrenadantes foram descartados novamente e os tubos deixados abertos objetivando que o etanol 70% remanescente evaporasse. Foi acrescentado então 100  $\mu\text{L}$  de solução de hidratação a cada tubo e o DNA foi mantido por 24h à temperatura ambiente para reidratação. Logo após, dois  $\mu\text{L}$  da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para determinar a concentração e avaliar o grau de pureza do mesmo por meio das razões nas absorbâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA*). Em seguida, as amostras foram armazenadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da determinação da carga parasitária por qPCR.

#### 4.7.1 - Curva padrão e determinação da carga parasitária por qPCR

Inicialmente foi preparada uma curva padrão para que fosse possível determinar o número de cópias do DNA do parasito (Figura 9). Neste sentido, utilizou-se epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) cultivadas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Triptose*), até atingir o número de  $1 \times 10^8$  parasitos.

A quantidade de parasitos foi determinada realizando-se a contagem em câmara de Neubauer e após a extração de DNA da massa de epimastigotas, foi construída a curva padrão. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100 mL de água ultra pura autoclavada, a concentração final foi de  $10^6$  parasitos/mL, considerando a extração aproximadamente 100% eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas em nanoespectrofotômetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA*) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm, e posteriormente foram realizadas diluições seriadas de 10x, com obtenção de sete pontos, de  $10^6$  a 1 parasito, utilizados na curva. A curva padrão foi utilizada como referência e acrescentada à todas as placas em triplicata.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp®Optical 96 - Well Reaction Plate* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), seladas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA). Foram utilizados apenas os resultados das reações nas quais a curva padrão teve eficiência entre 90 - 110% e obteve valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ( $r^2 = 0,95-0,999$ ).



**Figura 9:** Exemplo da curva padrão gerada a partir da diluição seriada de  $1 \times 10^6$  espiroplasmas de *Trypanosoma cruzi*. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos e em Y os valores de Ct referentes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do slope (-3,32), coeficiente de linearidade ( $R^2 = 0,996$ ) e a eficiência (99,9%).

As amostras da curva padrão foram consideradas controles positivos e os poços nos quais foi adicionada água livre de nucleases (sem adição de DNA) foram considerados os controles negativos bem como as amostras do grupo CNI que foram submetidas à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* para controle de reação inespecífica.

Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; os quais amplificam um fragmento de 182 pb do parasito (Cumming e Tarleton, 2003). As reações foram realizadas em duplicata, sendo utilizados 60 ng/ $\mu$ L de DNA genômico, cinco  $\mu$ L de SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems), dois  $\mu$ L dos iniciadores e água livre de nucleases em quantidade suficiente para totalizar um volume final de 10 $\mu$ L por poço.

Simultaneamente, na mesma placa, foi realizada a amplificação do gene do fator alfa de necrose tumoral murino - específico (TNF- $\alpha$ ). Este foi utilizado para verificar a integridade do DNA analisado, uma vez que é expresso de forma constitutiva no modelo animal avaliado.

Para a amplificação do gene TNF- $\alpha$ , foram utilizados os pares de iniciadores: TNF-5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF-5411 5' CAGCA

AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'' (Cummings e Tarleton, 2003), os quais amplificam um fragmento de 170 pb. Durante as reações, as amostras inicialmente foram submetidas à processo de desnaturação à 95°C por 10 minutos, e em seguida por 40 ciclos à 95°C por 15 segundos e 63°C por 1 minuto.

A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear utilizando os valores do Ct das amostras da curva padrão, sendo consideradas negativas as amostras com Ct acima do último ponto da curva. Os resultados foram expressos pelo número de parasitos/mg de tecido.

#### 4.8 - Quantificação de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*)

As citocinas IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1 foram quantificadas, no sobrenadante de macerado de coração, utilizando-se o kit de quantificação de citocinas murinas (BD *Cytometric Bead Array – Mouse Inflammation Kit*). Os experimentos foram realizados de acordo com as especificações da bula e protocolo de marcação definido pelo fabricante com algumas modificações (Becton, Dickinson and Company, Catalog N°. 560485). Inicialmente, as amostras foram descongeladas em banho-maria (37°C) e centrifugadas a 10000 xg por 10 minutos para coleta do sobrenadante. O padrão foi reconstituído antes da execução da técnica com dois mL do Reagente G (solução tampão) e posteriormente foram realizadas as seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Visto que as *beads* estão individualizadas no kit, é necessário preparar uma mistura delas imediatamente antes do uso, sendo cerca de três  $\mu$ L de cada suspensão de *beads* utilizadas para cada ensaio. Na realização da técnica, foram adicionados 18 $\mu$ L das misturas de *beads* a 25 $\mu$ L dos padrões (nas diluições obtidas anteriormente); e também à 25 $\mu$ L das amostras nos seus respectivos tubos. Em seguida, foram adicionados em todos os tubos 18 $\mu$ L do Reagente B (reagente de detecção marcado com PE) e estes foram incubados por 2h, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após finalizar o período de incubação, foram adicionados 500 $\mu$ L do Reagente F (solução de lavagem) em cada tubo, que foi então centrifugado a 600xg por 7 min a 18°C. Com o auxílio de bomba de vácuo, o sobrenadante foi aspirado, restando cerca de 100 $\mu$ L do sobrenadante em cada tubo e novamente, foram adicionados 100 $\mu$ L do Reagente F em cada tubo e a leitura das amostras foi realizada. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo (*FACScalibur® Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA*), armazenados em mídia eletrônica e analisados com o auxílio do *software*

*FCAP Array Software TM (Soft Flow Hungary Ltd, BD Biosciences).*

#### **4.9 - Análises Estatísticas**

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA)*, sendo as diferenças consideradas significativas quando os valores de  $p$  foram inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Foi verificado inicialmente se a distribuição dos dados era paramétrica ou não através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os dados referentes à parasitemia, imunofenotipagem do sangue periférico, quantificação do processo inflamatório e área de neoformação de colágeno (dados paramétricos) foram submetidos ao teste de análise de variância ANOVA *one-way*. Quando as alterações foram significativas, o teste de Bonferroni foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias.

Para comparações da carga parasitária e nível de citocinas no coração (dados não paramétricos) foi realizada análise de *Kruskal Wallis*, e quando as alterações foram significativas, o teste de Dunns foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as medianas.



**5. Resultados**

### 5.1 - Atividade do BBI sobre o *T. cruzi* *in vitro*

A partir de cultura de fibroblastos da linhagem L929 foi avaliado o crescimento da cepa Tulahuen do *T. cruzi* na presença do BBI. A atividade do BBI representada pela inibição do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas do parasito em cultura está apresentada na Tabela 2. Utilizando o BNZ como controle positivo, foi verificado que o BBI apresentou-se inativo nas concentrações de 40 a 320 µg/mL.

**Tabela 2:** Avaliação do efeito do inibidor de proteases do tipo *Bowman-Birk* no cultivo da cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi* em fibroblastos da linhagem L929 em diferentes concentrações

Composto	Concentração (µg/mL)	Atividade (%)	IC50 sobre o parasita
BBI	320	0	Inativo
	160	23	
	80	9	
	40	0	
BZ	1	52	Ativo

A atividade tripanomicida sobre as formas amastigotas e tripomastigotas foi calculada pela atividade da enzima beta-galactosidase e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do crescimento. O benznidazol foi utilizado como controle positivo.

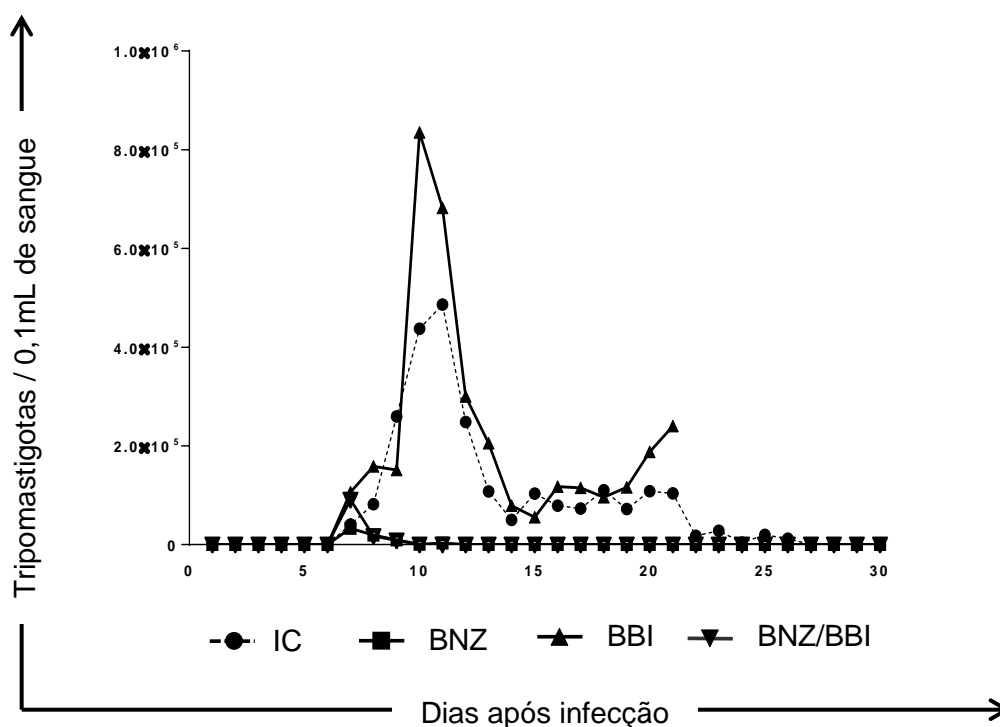
## 5.2 - Parasitemia

Na Figura 10 observam-se as médias das curvas de parasitemia dos animais pertencentes aos grupos CI, BNZ, BBI e BNZ/BBI, e na Tabela 3, os dados referentes aos períodos pré-patente (PPP) e patente (PP), dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) e o valor do pico máximo de parasitemia (VPM) dos mesmos grupos.

A análise da curva de parasitemia demonstrou que a área sob a curva dos grupos BNZ e BNZ/BBI foram significativamente menores em relação à área sob a curva dos grupos CI e BBI (Figura 10).

Na Tabela 3 é possível observar que o PPP foi de seis dias para todos os grupos analisados, enquanto o PP para os grupos CI (PP = 21 dias) e BBI (PP > 15 dias) foi maior quando comparado aos grupos BNZ (PP = 5 dias) e BNZ/BBI (PP = 3 dias).

Os animais pertencentes ao grupo BBI apresentaram o maior valor de pico de parasitemia (834.950 formas tripomastigotas/0,1ml de sangue), quando comparado aos grupos CI (486.250 formas tripomastigotas/0,1ml de sangue), BNZ (32.800 formas tripomastigotas/0,1ml de sangue) e BNZ/BBI (90.900 formas tripomastigotas/0,1ml de sangue). Em relação ao dia do pico máximo de parasitemia, observou-se que este foi precoce para os grupos BNZ e BNZ/BBI (7° DAI), quando comparados aos grupos CI (11° DAI) e BBI (10° DAI).



**Figura 10:** Curvas de parasitemia de camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, compondo os grupos controle infectado (CI; ●), infectado e tratado com benznidazol (BNZ; ■), infectado e tratado com BBI (BBI; ▲) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI; ▼). As curvas plotadas representam a média de seis animais por grupo em cada ponto.

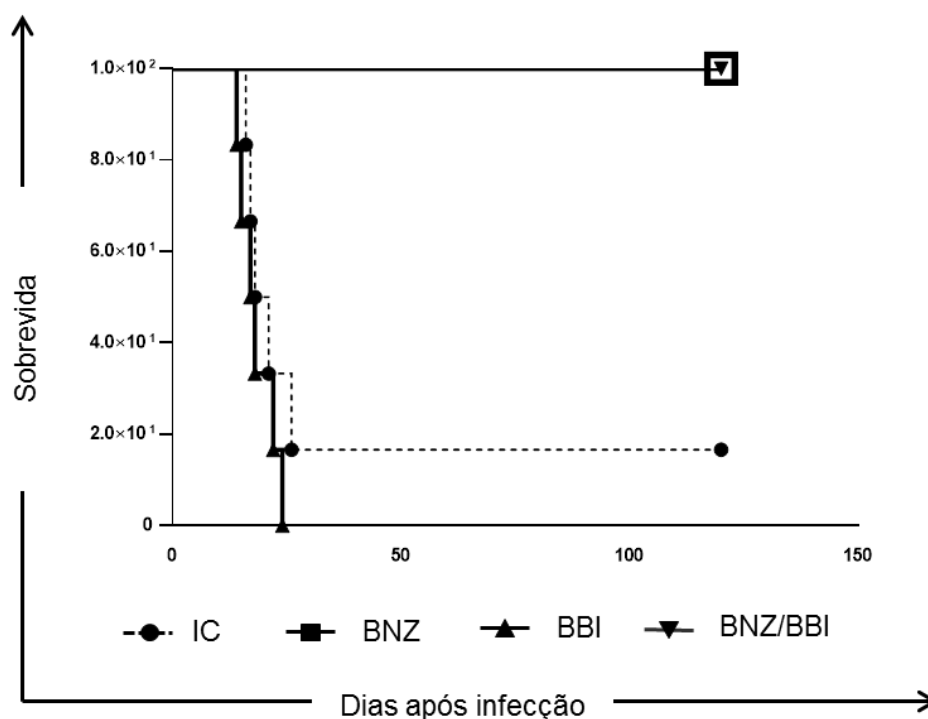
**Tabela 3:** Dados referentes aos períodos pré-patente e patente, valor e dia do pico máximo de parasitemia dos camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, tratados ou não com BNZ, BBI ou BNZ/BBI

Grupos	PPP	PP	DPMP	PMP
CI	6	21	11	486,250
BZ	6	5	7	32,800
BBI	6	>15	10	834,950
BZ/BBI	6	3	7	90,900

PPP: Período pré-patente, PP: Período patente, DPMP: Dia do pico máximo de parasitemia, PMP: Pico máximo de parasitemia, CI: grupo controle infectado, BNZ: infectado e tratado com benznidazol, BBI: infectado e tratado com BBI, BNZ/BBI: infectado e tratado com benznidazol e BBI.

### 5.3. Taxa de sobrevivência

Na Figura 11 está representado o percentual de sobrevivência dos animais pertencentes aos grupos CI, BNZ, BBI e BNZ/BBI. Nos grupos CI e BBI foi observada mortalidade a partir do 16º e 14º DAI, e no 120º DAI a sobrevivência foi de 17% e 0%, respectivamente. Já nos grupos BNZ e BNZ/BBI foi demonstrado, após 120 dias de avaliação, que a taxa de sobrevivência foi de 100%.



**Figura 11:** Percentual de sobrevivência dos camundongos inoculados intraperitonealmente com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, compondo os grupos: controle infectado (CI; ●), infectado e tratado com benznidazol (BNZ; ■), infectado e tratado com BBI (BBI; ▲) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI; ▼). As curvas plotadas representam a média de seis animais por grupo em cada ponto.

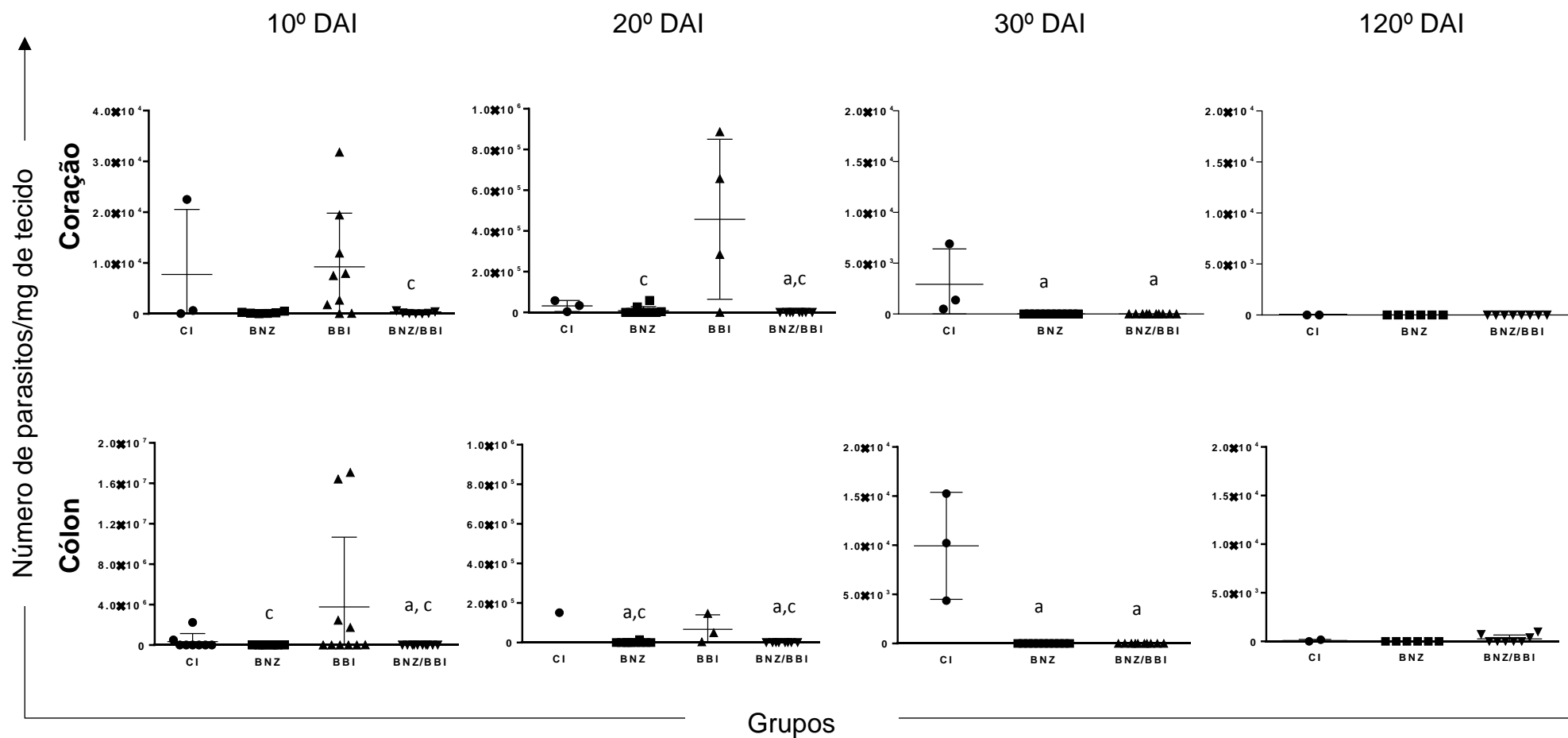
#### 5.4 - Avaliação da carga parasitária no coração e cólon

A PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada na avaliação da eficácia de quimioterapias em diversos modelos experimentais. Esta metodologia apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de pequenas quantidades de DNA do parasito, bem como a quantificação da carga parasitária. Neste trabalho, esta ferramenta foi utilizada para determinar a carga parasitária em amostras de coração e cólon de camundongos *Swiss*, infectados experimentalmente com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos a diferentes protocolos terapêuticos.

Na figura 12 está representada a avaliação da carga parasitária no coração e cólon dos animais infectados e submetidos ou não ao tratamento com BNZ, BBI ou BNZ associado ao BBI no 10º, 20º, 30º e 120º DAI.

Em relação ao coração, no 10º dia foi demonstrado menor número de parasitos nos animais tratados com BNZ/BBI em relação ao grupo BBI. Já no 20º dia, foi observado número significativamente menor de parasitos nos animais do grupo BNZ/BBI quando comparados tanto aos animais do grupo CI quanto do grupo BBI. Além disso, os animais tratados apenas com BNZ apresentaram menor número de parasitos que aqueles tratados apenas com BBI. No 30º DAI o número de parasitos manteve-se menor nos animais dos grupos tratados com BNZ e BNZ/BBI em relação ao grupo CI. Neste momento, todos os animais do grupo BBI já haviam morrido. Na avaliação durante a fase crônica da infecção (120º DAI) não foram observados parasitos em nenhum dos grupos avaliados.

Em relação ao cólon, observou-se no 10º DAI que os animais tratados com BNZ/BBI apresentaram redução na carga parasitária em relação ao grupo CI, e tanto o grupo BNZ/BBI quanto o grupo BNZ apresentaram redução da carga parasitária quando comparados ao grupo BBI. Assim como observado no coração, no 20º dia após a infecção os animais infectados e tratados com BNZ/BBI apresentaram uma carga parasitária menor quando comparados aos animais dos grupos CI e BBI. No entanto, o grupo de animais infectados e tratados com BNZ isolado, apresentou menor carga parasitária não apenas em relação aos animais do grupo BBI, como observado no coração, mas também em relação aos animais do grupo CI. No 30º dia foi observada menor quantidade de parasitos nos animais do grupo tratado com BNZ e BNZ/BBI em relação ao grupo CI, assim como no coração. No 120º DAI não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos avaliados.



**Figura 12:** Avaliação da carga parasitária no coração e cólon dos camundongos pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10°, 20°, 30° e 120° DAI. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “c” relacionadas aos grupos CI e BBI respectivamente. Os gráficos representam a média dos animais sobreviventes por grupo em cada ponto.

## 5.5 - Imunofenotipagem do sangue periférico

### 5.5.1 - Distribuição percentual das populações de células NK e CD14<sup>+</sup>

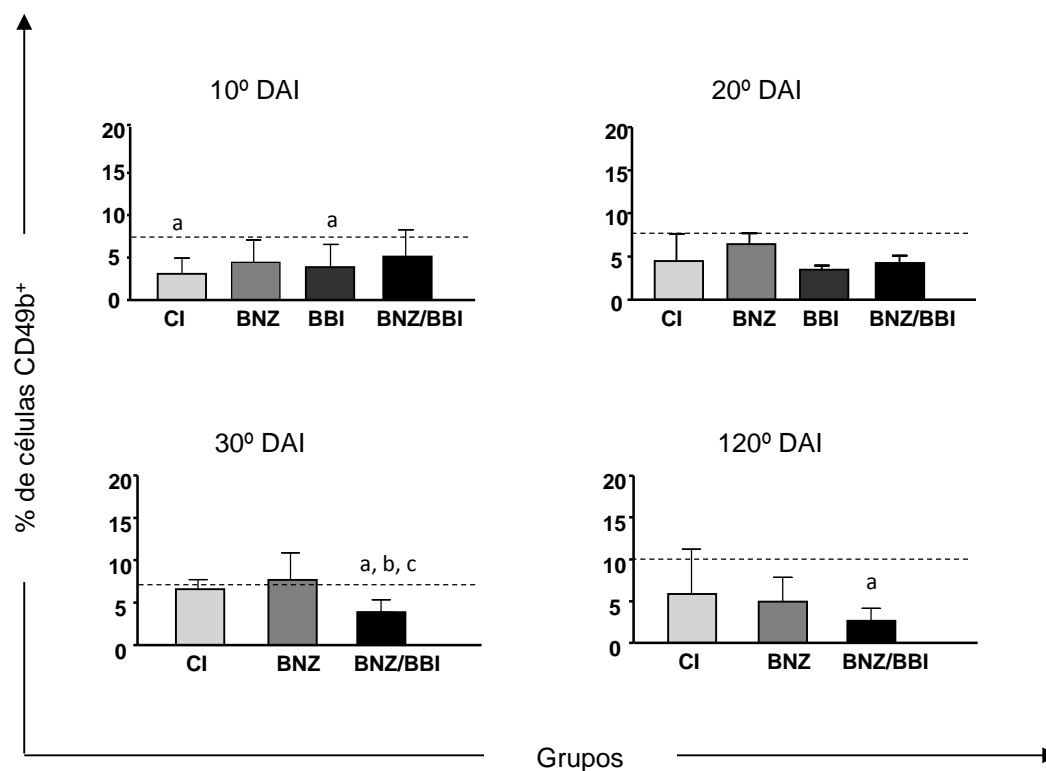
Com o objetivo de caracterizar o efeito da infecção e tratamentos sobre a resposta imune inata foi realizada análise fenotípica das células NK (CD49<sup>+</sup>) e dos monócitos (CD14<sup>+</sup>).

Na Figura 13 está representado o percentual das células NK no sangue dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais (CNI, CI, BNZ, BBI e BNZ/BBI) no 10°, 20°, 30° e 120° DAI.

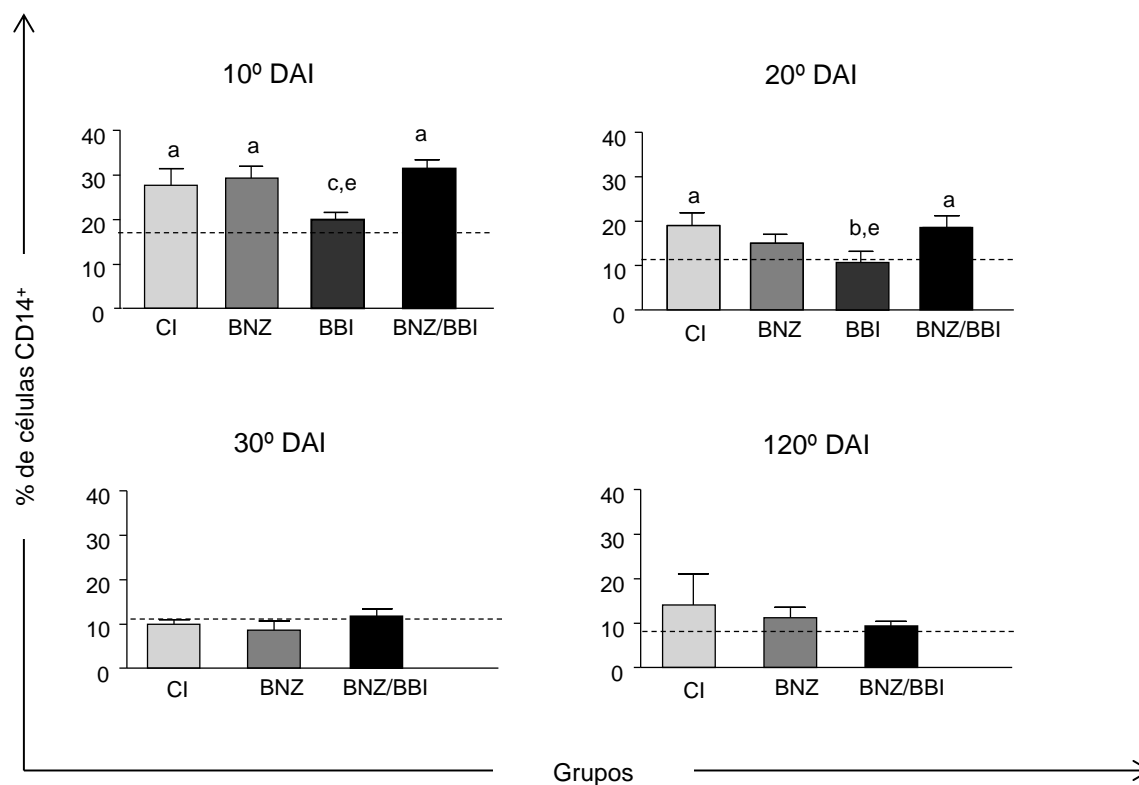
No 10° DAI foi observado menor percentual de células CD49<sup>+</sup> nos animais do grupo CI e BBI quando comparado aos animais do grupo CNI. No 20° DAI, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados. Já no 30° DAI foi observado menor percentual destas células nos animais do grupo BNZ/BBI em relação aos demais grupos, sendo esta diferença mantida no 120° DAI somente em relação ao grupo CNI.

Já na Figura 14 está representado o percentual dos monócitos CD14<sup>+</sup>, sendo observado no 10° DAI maior percentual destas células nos grupos CI, BNZ e BNZ/BBI em relação ao grupo CNI. Além disso, foi demonstrado percentual menor destas células em animais infectados e tratados com BBI quando comparados aos demais grupos tratados. No 20° DAI foi observado aumento no percentual das células CD14<sup>+</sup> nos animais dos grupos CI e BNZ/BBI em relação aos animais do grupo CNI. Foi observado também menor percentual destas células nos animais infectados e tratados apenas com BBI, em relação aos animais do grupo CI e do grupo BNZ/BBI. Já nos demais tempos avaliados (30° e 120° DAI), não foi demonstrada nenhuma diferença significativa entre os grupos.





**Figura 13:** Percentual médio das células NK (CD49b<sup>+</sup>) no sangue periférico de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> e 120<sup>o</sup> DAI. A linha tracejada representa o grupo de animais não infectados (CNI). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a”, “b” e “c” relacionadas aos grupos CNI, CI e BNZ respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.



**Figura 14:** Percentual médio de monócitos (CD14<sup>+</sup>) no sangue periférico de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> e 120<sup>o</sup> DAI. A linha tracejada representa o grupo de animais não infectados (CNI). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “e” relacionadas aos grupos CNI, CI, BNZ e BNZ/BBI respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.

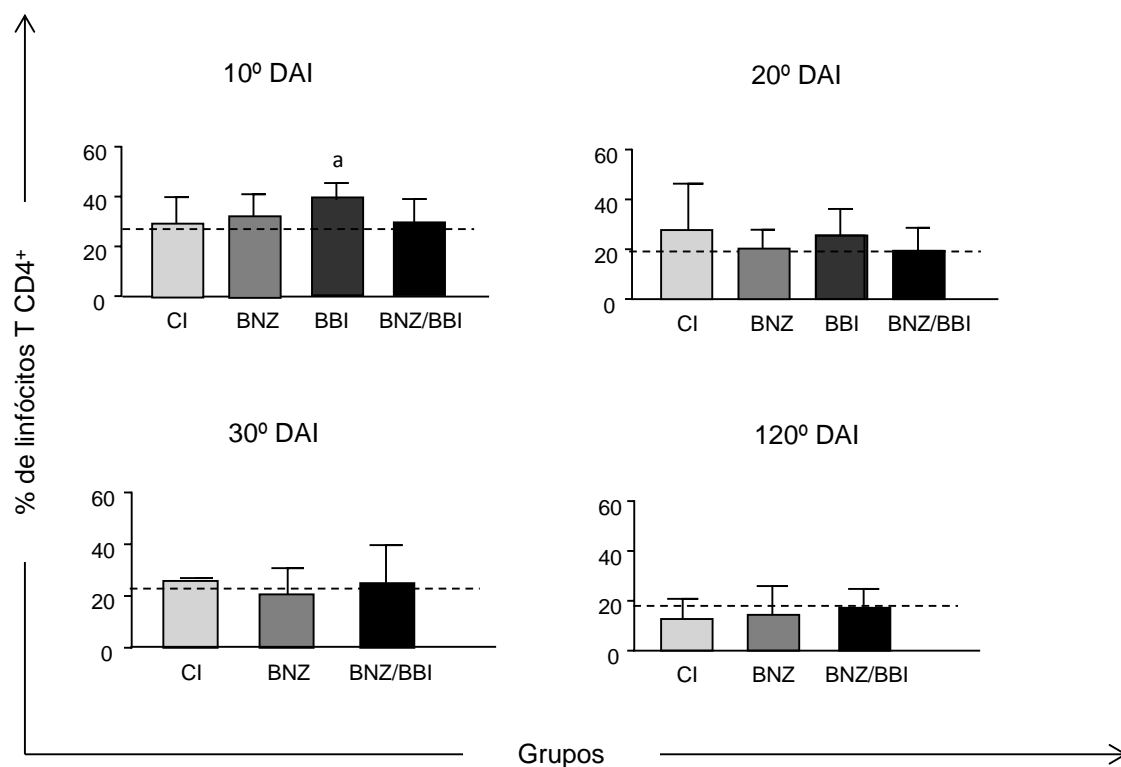
#### 5.4.2 - Distribuição percentual das populações de linfócitos T e linfócitos B

Com o objetivo de caracterizar o efeito da infecção e tratamentos sobre a resposta imune adquirida foi realizada análise da distribuição percentual dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B no sangue periférico.

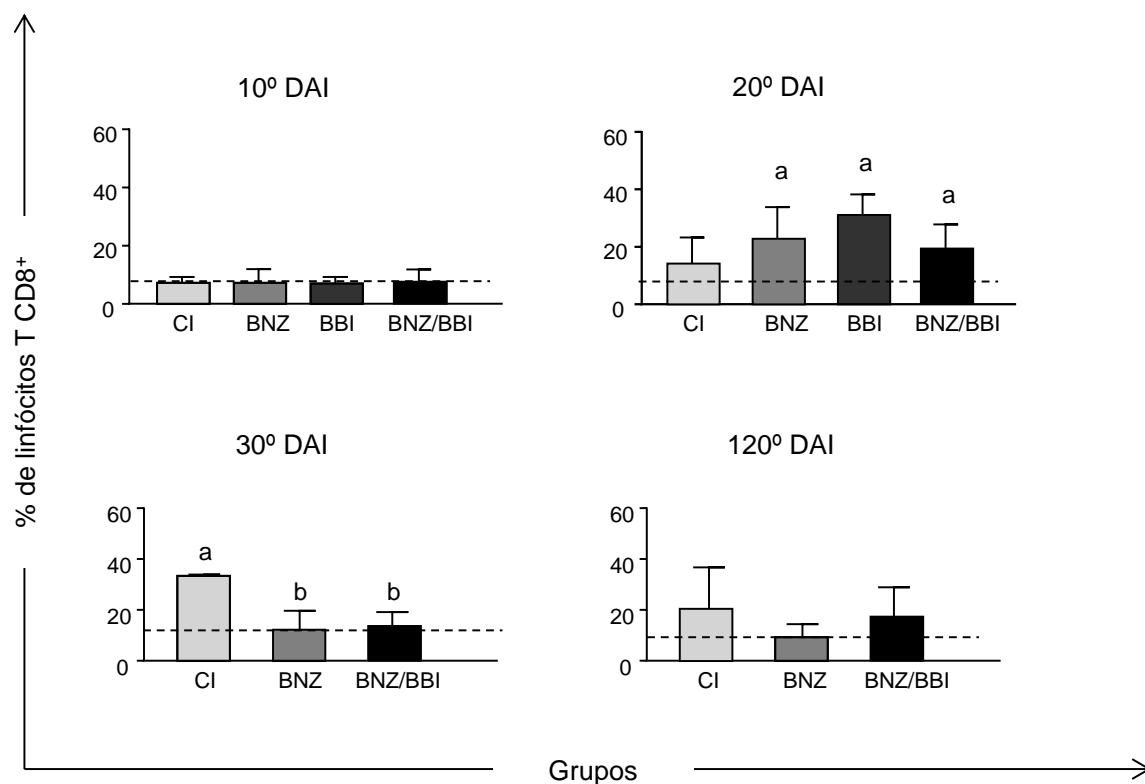
Ao analisar as células TCD4<sup>+</sup> foi demonstrado que no 10º dia após a infecção o percentual destas células apresentava-se maior nos animais infectados e tratados apenas com BBI quando comparados aos animais não infectados. Nos demais tempos avaliados nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 15).

Em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, no 10º DAI não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, enquanto no 20º DAI houve aumento dessas células em todos os grupos infectados e tratados quando comparados aos animais do grupo CNI. Já no 30º DAI foi demonstrado maior percentual dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> nos animais do grupo CI em relação aos animais do grupo CNI, bem como menor percentual destas células nos animais do grupo BNZ e BNZ/BBI em relação ao grupo CI. No 120º DAI não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 16).

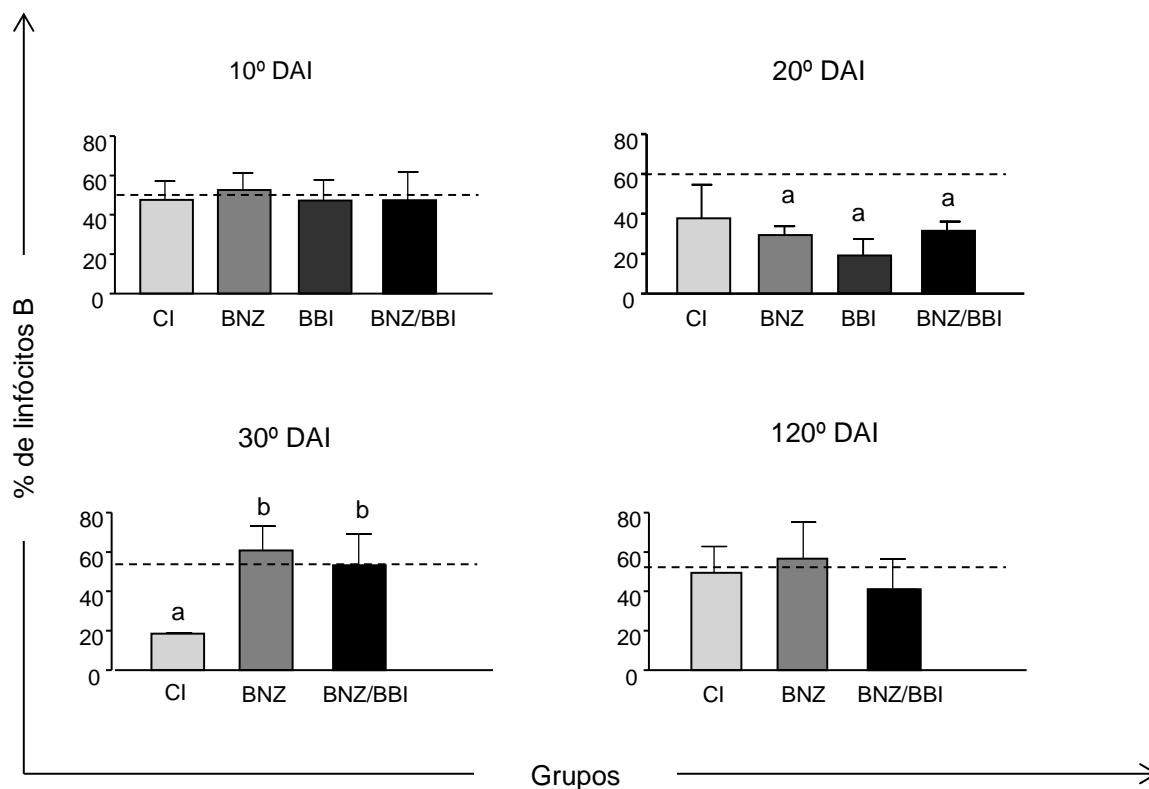
Na avaliação dos linfócitos B, foi constatado que todos os tratamentos promoveram redução no percentual destas células em relação ao grupo CNI no 20º DAI. Já no 30º DAI foi observado percentual menor dos linfócitos B no grupo CI quando comparado aos demais grupos. No último tempo avaliado (120º DAI), não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 17).



**Figura 15:** Percentual médio dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10°, 20°, 30° e 120° DAI. A linha tracejada representa o grupo de animais não infectados (CNI). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a”, relacionada ao grupo CNI. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.



**Figura 16:** Percentual médio dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10°, 20°, 30° e 120° DAI. A linha tracejada representa o grupo de animais não infectados (CNI). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “b” relacionadas aos grupos CNI e CI respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.

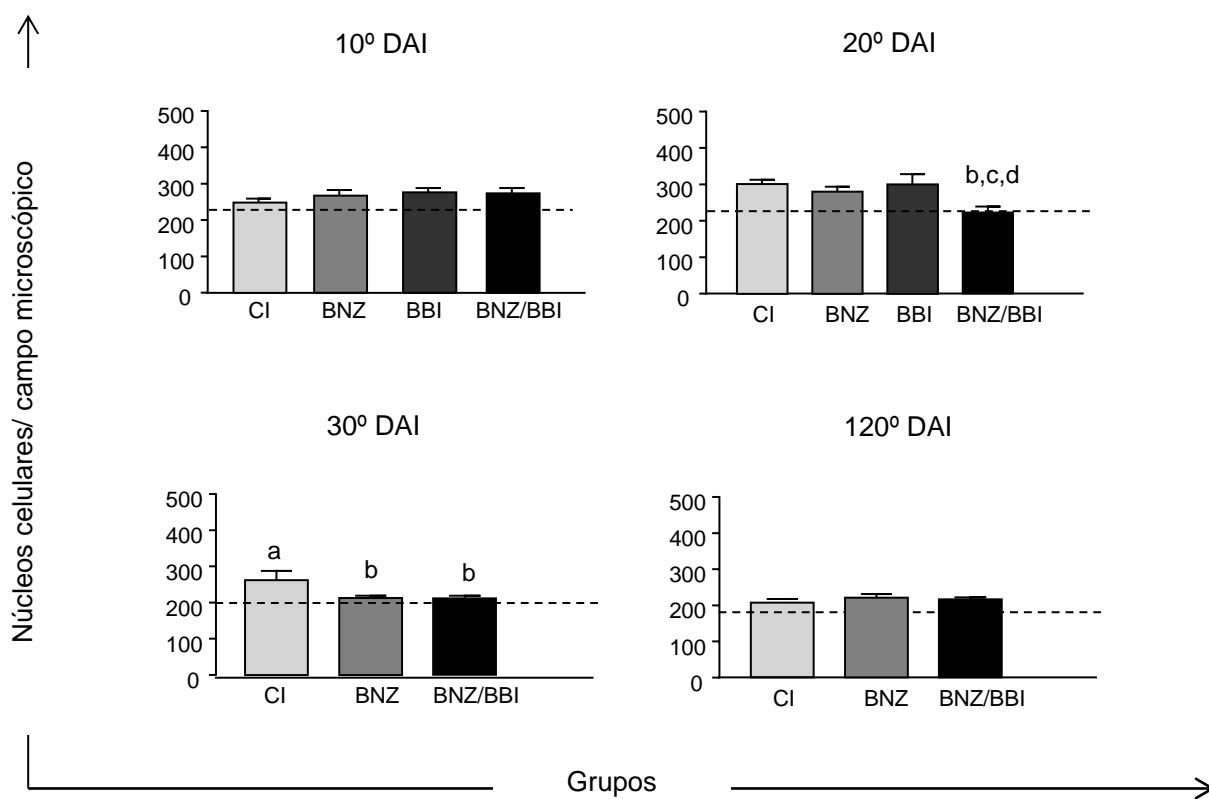


**Figura 17:** Percentual médio dos linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) no sangue periférico de camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* e pertencentes aos grupos: controle infectado (CI), infectado e tratado com benznidazol (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com benznidazol e BBI (BNZ/BBI), no 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup> e 120<sup>o</sup> DAI. A linha tracejada representa o grupo de animais não infectados (CNI). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “b” relacionadas aos grupos CNI e CI respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.

### 5.5. Quantificação do processo inflamatório no coração

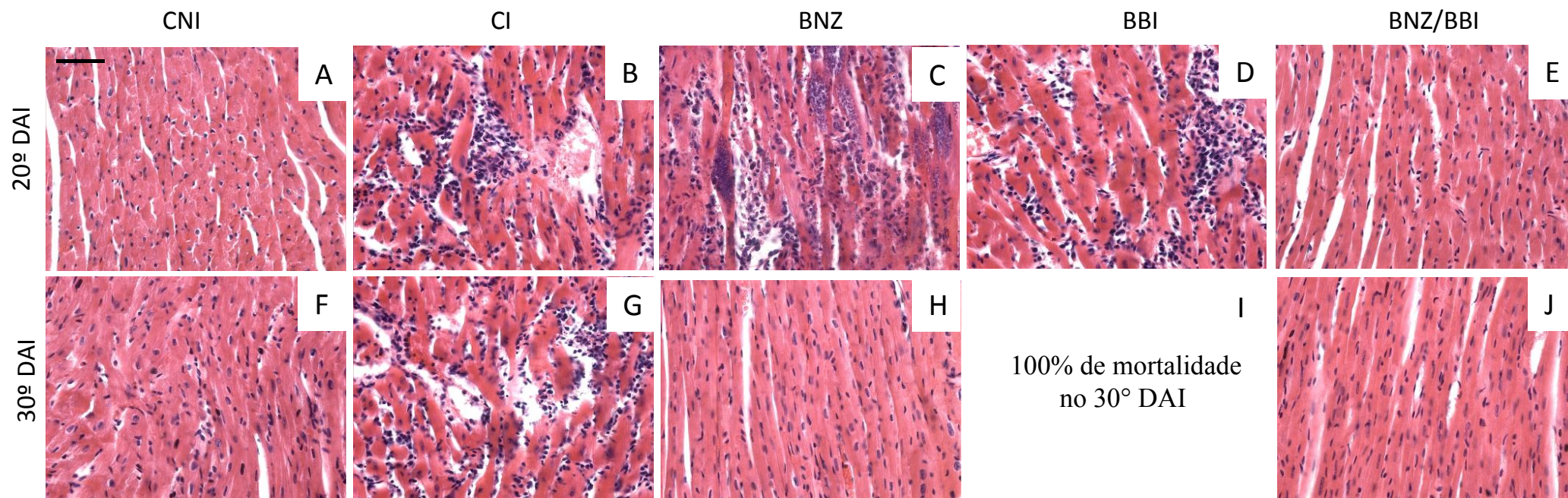
Em relação ao processo inflamatório cardíaco pode-se observar, na Figura 18, que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos no 10º DAI. No entanto, no 20º DAI foi observado redução do processo inflamatório nos animais infectados e tratados com BNZ/BBI em relação aos demais grupos infectados.

Esta diferença se manteve no 30º DAI em relação ao grupo CI, sendo neste momento observado também redução do processo inflamatório nos animais tratados com BNZ em relação ao grupo de animais infectados e não tratados (CI). Por fim, no 120º DAI não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos.



**Figura 18:** Quantificação de células no tecido cardíaco de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* avaliados no 10°, 20°, 30° e 120° dia após a infecção. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” relacionadas aos grupos CNI, CI e BNZ e BBI respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados.

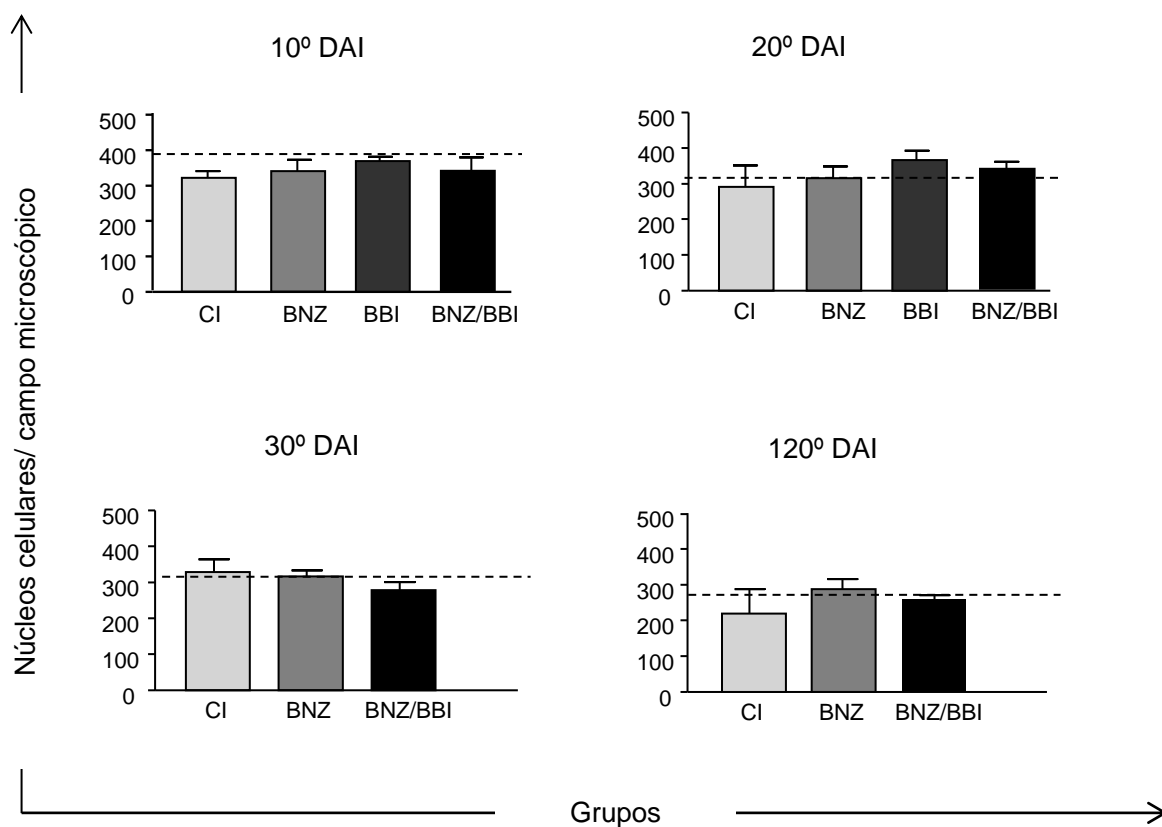




**Figura 19:** Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados experimentalmente com 500 formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. A e F: Aspecto histológico normal no grupo CNI no 20° (A) e 30° (F) DAI; B e G: Processo inflamatório moderado no grupo CI no 20° (B) e 30° (G) DAI; C e H: Processo inflamatório moderado no grupo BNZ no 20° DAI (C) e aspecto histológico compatível com o normal no grupo BNZ no 30° DAI (H); D: Processo inflamatório moderado no grupo BBI no 20° DAI (D); E e J: Aspecto histológico compatível com o normal, no grupo BNZ/BBI no 20° (E) e 30° (J) DAI. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm.

### 5.6. Quantificação do processo inflamatório no cólon

Em relação ao processo inflamatório no cólon, pode-se observar, na Figura 20, que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados.



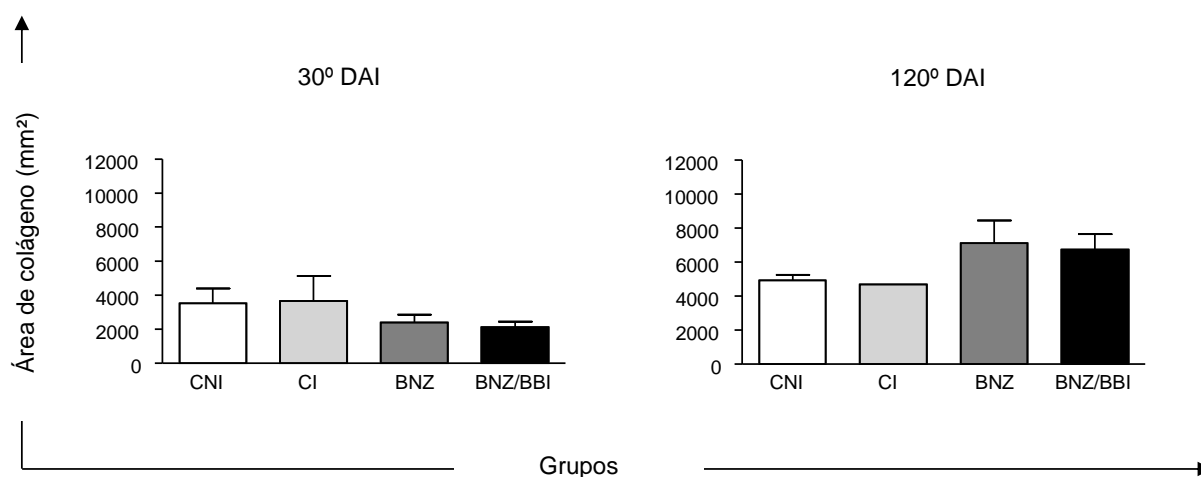
**Figura 20:** Quantificação de células no cólon de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* avaliados no 10°, 20°, 30° e 120° dia após a infecção. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo. A linha tracejada representa o número médio de células quantificadas em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados.

### 5.7. Quantificação da área ocupada por fibras colágenas

Na Figura 21 está representada a análise quantitativa da neoformação de colágeno no coração dos animais avaliados.

Tanto no 30° DAI quanto no 120° DAI, não foi observada diferença estatística entre os grupos avaliados, ou seja, não foi observada neoformação de colágeno em nenhum dos grupos infectados, tratados ou não.

Para avaliação da neoformação de colágeno no cólon, foi realizada análise semi-quantitativa, na qual não foi observada nenhuma diferença entre os grupos.



**Figura 21:** Quantificação da área de neoformação de colágeno no coração de camundongos infectados por 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* avaliados no 30° e 120° dia após a infecção (DAI). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de dois experimentos distintos, com seis animais em cada grupo, representando a média de doze animais por grupo.

### 5.8 - Quantificação de citocinas no coração por *Cytometric Bead Array*

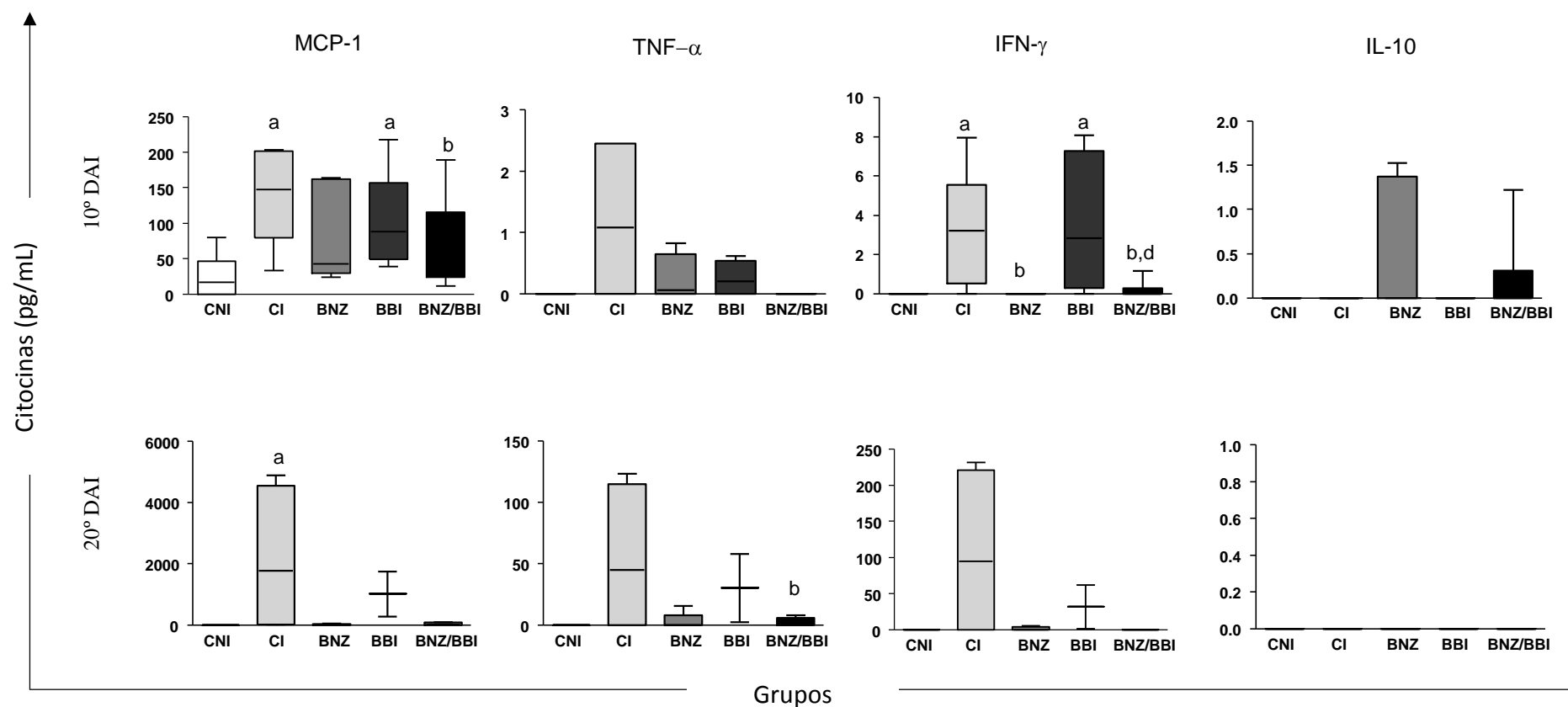
O padrão de citocinas presentes no coração dos animais avaliados foi analisado através da quantificação por citometria de fluxo, utilizando o Kit CBA. Os resultados estão apresentados na figura 22.

No 10º DAI, foi observado aumento significativo da quimiocina MCP-1 nos animais dos grupos CI e BBI em relação aos animais do grupo CNI, e redução da mesma nos animais do grupo BNZ/BBI em relação ao grupo CI. Já no 20º DAI, foi observado aumento de MCP-1 somente nos animais do grupo CI em relação ao grupo CNI.

Na análise da citocina TNF- $\alpha$  foi demonstrado no 20º DAI redução da mesma nos animais do grupo BNZ/BBI quando comparado ao grupo CI.

Já em relação à citocina IFN- $\gamma$ , foi observado no 10º dia, aumento da mesma nos animais dos grupos CI e BBI em relação ao grupo CNI. Além disso, observou-se também, redução desta citocina nos animais do grupo BNZ em relação ao grupo CI, e nos animais do grupo BNZ/BBI em relação aos grupos CI e BBI.

Para IL-10, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, em nenhum dos tempos avaliados.



**Figura 22:** Perfil de citocinas no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* compondo os grupos: Não infectado e não tratado (CNI), infectado e não tratado (CI), infectado e tratado com BNZ (BNZ), infectado e tratado com BBI (BBI) e infectado e tratado com BNZ associado ao BBI (BNZ/BBI), no 10° (A) e 20° (B) DAI. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a”, “b” e “d” relacionadas aos grupos CNI, CI e BBI respectivamente.

**6. Discussão**

O principal componente associado às manifestações clínicas da DCh é um processo inflamatório difuso e persistente diretamente relacionado ao desenvolvimento de fibrose nos órgãos afetados (Prata, 2001; Urbina, 2010). Neste sentido, foi avaliado o efeito do BBI, um inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk* que apresenta conhecida ação anti-inflamatória, durante o curso da DCh experimental.

Quando avaliada a atividade do BBI sobre o *T. cruzi in vitro*, este se apresentou inativo na concentração igual ou inferior a 320 µg/mL, enquanto o BNZ (fármaco de referência), utilizado como controle positivo da reação, apresentou IC<sub>50</sub> de 1µg/mL, indicando que o BBI não tem ação tripanomicida *in vitro* contra formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*.

Estes resultados são contrários aos obtidos para outros inibidores de protease como, por exemplo, o WRR-483, análogo do K11777, potente inibidor de cruzipaina (maior cisteíno protease do *T. cruzi*) que demonstrou alta eficácia como tripanomicida em ensaios *in vitro*. Este inibidor de cisteíno protease foi capaz de eliminar tanto epimastigotas quanto amastigotas em cultura de macrófagos após 12 dias, utilizando-se a concentração de 5,2 ug/mL do composto (Engel et al., 1998).

Como o inibidor de protease do tipo *Bowman-Birk* é bem tolerado por via oral e não apresenta efeitos adversos conhecidos, a utilização deste tem sido proposta como estratégia no tratamento de diversas doenças inflamatórias como encefalomiélites autoimunes experimentais e colite ulcerativa, uma vez que são potentes inibidores da inflamação pelas vias COX-2/PGE-2 e iNOS/NO (Touil et al., 2008; Safavi et al., 2012).

Visto que a inflamação é uma das manifestações mais significativas na DCh, essencial na patogênese tanto da forma cardíaca quanto da forma digestiva da doença (Tafari, 1971, Da Silveira et al., 2005), mesmo frente à ausência de atividade do BBI isolado sobre o *T. cruzi in vitro*, levando em consideração a sua ação anti-inflamatória comprovada em outras enfermidades, a hipótese desse trabalho era que o BBI associado ao BNZ poderia modular a resposta imune de maneira a reduzir os danos teciduais, não permitindo uma exacerbação do processo inflamatório, enquanto o BNZ atuaria controlando o parasitismo. Sendo assim, visto a importância clara da resposta inflamatória nos mecanismos imunopatológicos na doença de Chagas, mesmo não apresentando atividade tripanomicida, o BBI poderia, associado ao BNZ, modular a resposta imune, influenciando a evolução clínica da doença.

De um modo geral, a combinação de compostos já foi utilizada em inúmeros estudos como estratégia alternativa na quimioterapia da DCh, bem como na terapêutica de inúmeras doenças, como uma maneira de aumentar a eficácia do tratamento (Araújo et al., 2000; Fivelman et al., 2004; Lopez-Muñoz et al., 2010). Araújo et al. (2000) observaram, após tratamento de camundongos infectados com a cepa CL ou Y, que a associação do Cetoconazol com o BNZ permitiu um aumento na taxa de cura em relação aos animais tratados com os fármacos isolados, demonstrando um efeito sinérgico. Além disso, Diniz et al. (2013) demonstraram que o BNZ associado ao Posaconazol em doses inferiores às usuais ou durante um período menor de tratamento apresentam eficácia semelhante ou superior às drogas administradas em sua dose usual e tratamento completo, em modelo murino. Já Penitente et al. (2015), avaliando camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa VL-10 e tratados com Enalapril associado ao BNZ, demonstraram que embora a associação dos dois fármacos não tenha permitido a redução do número de parasitos circulantes, possibilitou o aumento do efeito imunomodulador de ambas as drogas induzindo baixa produção de biomarcadores de lesões cardíacas.

Sendo assim, simultaneamente ao estudo *in vitro*, foi realizada avaliação *in vivo* do BBI associado ou não ao BNZ, sendo utilizada a cepa Y do parasito. A escolha da cepa foi baseada no Workshop em Modelos Experimentais em Triagem de Drogas e Desenvolvimento para a DCh (Romanha et al., 2010), uma vez que apresenta resistência parcial ao BNZ e é rotineiramente utilizada em estudos que avaliam a eficácia de fármacos, de forma que os resultados podem ser comparados à vários outros compostos. Posteriormente, caso os resultados fossem satisfatórios, uma cepa resistente ao fármaco padrão deveria ser utilizada (Filardi e Brener, 1987; Romanha et al., 2010).

Quando avaliada a parasitemia e sobrevida em camundongos infectados pela cepa Y, observou-se que os animais infectados e tratados apenas com BBI apresentaram maior pico de parasitemia e 0% de taxa de sobrevida, ao passo que os animais tratados com BBI associado ao BNZ apresentaram o menor período patente em relação aos demais grupos infectados (tratados ou não) e 100% de sobrevida assim como os animais tratados apenas com BNZ. Estes resultados confirmam que a redução da parasitemia após tratamento com BNZ, favorece a redução da mortalidade de camundongos *Swiss* (Andrade et al., 1977; Caldas et al., 2008). Além disso, conforme esperado, demonstra que o BBI isolado, assim como observado *in vitro*, não teve ação tripanomicida no modelo murino, ao contrário dos



inibidores de cruzipaina, que demonstraram, em estudos anteriores, induzir cura parasitológica neste modelo experimental (Engel et al., 1998).

Estudos anteriores evidenciaram que camundongos C3H infectados pelo *T. cruzi* e tratados com inibidores da cisteína protease cruzipaina apresentaram hemoculturas negativas, sendo dessa forma considerados parasitologicamente curados (Engel et al., 1998; Barr et al., 2005). Entretanto, a técnica de hemocultura, apesar de ser muito específica, apresenta baixa sensibilidade, e quando utilizada isoladamente, os resultados negativos podem não indicar a cura parasitológica, e sim parasitemia baixa ou intermitente. Sendo assim, para se determinar a eficácia terapêutica de um composto torna-se fundamental uma avaliação laboratorial mais rigorosa, com utilização de testes complementares (Chiari et al., 1989; Machado-de-Assis et al., 2012).

Após análise da parasitemia, foi avaliado o parasitismo tecidual no coração e cólon dos camundongos infectados, e observou-se que de um modo geral, neste trabalho o parasitismo foi consideravelmente maior no cólon quando comparado ao coração. Esses dados, estão de acordo com o trabalho de Lewis et al. (2014) que demonstrou através de um sistema de imagem de bioluminescência que durante a fase aguda os parasitos estão amplamente distribuídos infectando diversos órgãos, inclusive o coração. Porém, tanto na fase aguda quanto na crônica observou-se bioluminescência maior no TGI, sendo que durante a fase crônica os parasitos estavam presentes apenas no TGI, principalmente cólon e estômago, indicando que o cólon funciona como um reservatório de parasitos, o que permite a persistência do mesmo por longos períodos.

Foi observado também que os animais do grupo tratado apenas com BBI apresentaram carga parasitária superior aos animais submetidos aos demais tratamentos tanto no 10º quanto no 20º DAI, o que pode justificar a taxa de 0% de sobrevida observada neste grupo antes mesmo do 30º DAI. Já os animais do grupo tratado com BNZ/BBI conseguiram controlar o parasitismo durante a fase aguda da infecção, assim como os animais tratados apenas com BNZ. No entanto, no 120º DAI, observou-se a presença de parasitos em alguns animais infectados e tratados com BNZ associado ao BBI, indicando uma redução da eficácia do BNZ, quando associado ao BBI.

Em conjunto, esses dados nos levam a crer que o BBI, administrado juntamente com o BNZ, a partir do primeiro dia em que foram detectados parasitos no sangue periférico, não permitiu a montagem de uma resposta imune específica eficaz, capaz de controlar a multiplicação dos mesmos.

Sendo assim, a resposta que ocorre na fase aguda recente, logo após a infecção pelo *T. cruzi*, com síntese de citocinas pró-inflamatórias por células da resposta imune inata, tais como macrófagos e células NK, tem importante papel no controle tanto da parasitemia quanto do parasitismo tecidual (Silva et al., 1995; Cardillo et al., 1996). No entanto o BBI parece ter prejudicado o estabelecimento desta resposta, o que levou a ausência do controle tanto da parasitemia quanto do parasitismo tecidual nos animais tratados com o mesmo. Desta forma, possivelmente, uma reavaliação do esquema terapêutico, iniciando o tratamento com o BBI posteriormente, seria importante alteração a ser considerada nos esquemas terapêuticos propostos, uma vez que impediria a imunomodulação, antes que fosse estabelecida uma resposta efetiva contra o parasito.

Como o BBI tem um efeito imunomodulador, relacionado a um aumento da produção de IL-10, e sabendo-se que a IL-10 atua reduzindo a produção da citocina IFN- $\gamma$  (Silva et al., 1992), os animais do grupo tratado com BBI provavelmente apresentaram um aumento na produção de IL-10 logo nos primeiros dias após a infecção, o que impediu a montagem de uma resposta pró-inflamatória inicial. A ausência de uma resposta imune eficaz pode ter impossibilitado o controle da parasitemia e do parasitismo tecidual, induzindo a mortalidade observada neste grupo e tornando os animais susceptíveis.

Foi demonstrado que o tratamento com anti-IL-10 reduz a parasitemia e previne a mortalidade em camundongos susceptíveis, demonstrando que a IL-10 induz susceptibilidade na fase aguda (Reed et al. 1995; Kuehn et al., 2013). No entanto, Roffê et al. (2012) demonstraram que a IL-10 está relacionada à proteção contra as miocardites fatais no modelo murino, assim como outros autores demonstraram o papel crítico da IL-10 na prevenção de respostas imunes patológicas e consequentemente da mortalidade em modelos experimentais durante a infecção pelo *T. cruzi* (Hunter et al., 1997; Guedes et al., 2009).

Sendo assim, embora uma resposta pró-inflamatória, com produção de IFN- $\gamma$ , seja necessária nos primeiros dias após a infecção pelo *T. cruzi*, no sentido de controlar a multiplicação do parasito, e esta resposta inicial esteja associada à resistência do hospedeiro frente à infecção (Silva et al., 1995; Cardillo et al., 1996), existe uma correlação entre a presença de infiltrado inflamatório intenso, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , e a cardiomiopatia chagásica (Abel et al., 2001; Gomes et al., 2003).

A resposta imune pró-inflamatória também foi associada à forma clínica digestiva da DCh, uma vez que já foi demonstrada a presença de células com potencial citotoxicidade associadas ao processo de denervação tanto no esôfago quanto no cólon (D'ávila Reis et al., 2001; Da Silveira et al., 2005; Dutra, 2009).

Já a forma indeterminada da DCh, tem sido relacionada à predominância de citocinas como a IL-10, em detrimento de citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , de forma que o estabelecimento de uma resposta imunomoduladora, com alta produção de IL-10 na fase aguda tardia parece ser essencial para controlar a resposta imunológica do hospedeiro. Dessa forma, o balanço entre a resposta pró e anti-inflamatória apresenta-se como essencial para um bom prognóstico na DCh (Souza et al., 2007; Dutra et al., 2009; Andrade et al., 2014).

Neste sentido, para avaliar a resposta imune sistêmica frente aos tratamentos avaliados, foi realizada uma análise fenotípica das células mononucleares do sangue periférico, tanto relacionadas à imunidade inata quanto à adquirida, e os resultados obtidos neste trabalho mostraram que no 10<sup>o</sup> DAI houve uma redução no percentual de monócitos CD14<sup>+</sup> no grupo de animais tratados com BBI quando comparados aos grupos BNZ e BNZ/BBI. Além disso, foi observada também neste tempo, uma redução no percentual das células NK no grupo BBI e CI em relação aos animais não infectados, sendo que a redução no percentual destas células no sangue periférico poderia refletir o recrutamento das mesmas para os tecidos infectados.

Sabe-se que os macrófagos são fundamentais na resposta contra o *T. cruzi*, seja devido à habilidade destas células como co-estimuladoras, na apresentação de antígenos ou produção de citocinas, demonstrando a importância das mesmas no início da resposta imune específica contra o parasito (Souza et al., 2004). Foi demonstrado também que as células NK são de grande relevância na imunidade inata contra o *T. cruzi* devido à produção de IFN- $\gamma$  e consequente ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Cardillo et al., 1996). Estes têm papel essencial na defesa inicial contra o *T. cruzi*, sendo que as propriedades de defesa dos mesmos envolvem em parte a expressão de iNOS, com subsequente produção de NO, estimulada por IFN- $\gamma$  (Gazzineli et al., 1992; Silva et al., 1992; Perez et al., 2005).

O menor percentual de células NK no sangue periférico dos animais do grupo CI e BBI no 10<sup>o</sup> dia após a infecção poderia ser, em parte, responsável pela alta mortalidade observada em ambos os grupos, uma vez que Cardillo et al. (1996) observaram que a

depleção das células NK resulta em parasitemia e mortalidade aumentadas em camundongos na fase aguda recente da infecção pelo *T. cruzi*. Isso porque a depleção bloquearia a produção de IFN- $\gamma$ , a ativação de macrófagos e consequentemente aumentaria a susceptibilidade à infecção, sugerindo que as células NK seriam as principais responsáveis pela produção desta citocina no início da fase aguda. Este papel das células NK na fase aguda inicial contribuiria para a limitação da replicação do parasito até que a resposta imune específica pudesse se estabelecer.

No 30° e 120° DAI, observou-se uma redução no percentual destas células (NK e monócitos) no sangue periférico dos animais tratados com BNZ/BBI. No entanto, sabe-se que na fase crônica, a presença de células NK já foi demonstrada tanto em pacientes com megaeosfago quanto em pacientes com megacólon, enquanto os macrófagos estão entre as células observadas no infiltrado inflamatório no coração de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e no TGI de pacientes com a forma digestiva, sendo sugerida a participação destas células em lesões teciduais observadas ao longo da doença (Higuchi et al., 1993; Corbett et al., 2001; Da Silveira et al., 2005).

Além do papel protetor fundamental atribuído às células NK e macrófagos principalmente nos primeiros dias após a infecção, inúmeros estudos demonstram a importância das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no controle da infecção e sobrevivência na fase aguda (Tarleton, 1995; Dos Reis 1997).

Ferraz *et al.* (2009) demonstraram que camundongos nocaute para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e para linfócitos TCD8<sup>+</sup> são altamente susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi*, o que permite sugerir que a ampliação da resposta imune seja essencial no controle da infecção.

Rottenberg et al. (1995) e Gonçalves da Costa et al. (2002) confirmaram que na ausência de células TCD4<sup>+</sup> a resposta imunológica do hospedeiro é reduzida e, diante disso observa-se um aumento do parasitismo tecidual, provavelmente devido à redução das citocinas como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , responsáveis pela ativação dos macrófagos e a proliferação de outros linfócitos.

Entretanto, a replicação do *T. cruzi* ocorre no citoplasma de inúmeros tipos celulares, de forma que as células TCD8<sup>+</sup> se tornam essenciais para o controle da infecção, visto que são capazes de eliminar células infectadas por meio de mecanismos antiparasitários como secreção de citocinas e citotoxicidade direta sobre as mesmas (Nickell et al., 2000; Henriques-Pons et al., 2002; Tzelepis et al., 2006).

Neste trabalho, foi observado aumento significativo no percentual de células TCD4<sup>+</sup> nos animais tratados com BBI em relação aos animais dos grupos CNI no 10º DAI, no entanto, este aumento não foi o suficiente para controlar a elevada parasitemia já observada nos animais do grupo neste momento da infecção.

A ativação inicial das células TCD8<sup>+</sup> parece ocorrer em torno de uma semana após a infecção (Martin et al., 2006; Tzelepis et al., 2006; Padilla et al., 2009). Estudo comparando camundongos naives C57BL/6, nocaute para IFN- $\gamma$  e nocaute para perforina demonstraram que camundongos naives reduziram a parasitemia entre 9 e 13 dias após a infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, entretanto, camundongos nocaute para IFN- $\gamma$  não controlaram a mesma e morreram mais rapidamente. Já os animais nocaute para CD8 e nocaute para perforina também foram incapazes de controlar a parasitemia, no entanto morreram posteriormente (15 a 21 dias após a infecção). Sendo assim, o IFN- $\gamma$  secretado pelas células NK seria importante nas duas primeiras semanas ao passo que o IFN- $\gamma$  secretado por células T CD8<sup>+</sup> seria fundamental após o 14º dia de infecção (Tzelepis et al., 2006).

No presente trabalho foi observado, no 20º DAI, aumento do percentual de células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de todos os grupos infectados e tratados, em relação ao grupo CNI. Já no 30º DAI, observou-se que nos grupos tratados com BNZ e BNZ/BBI houve redução no percentual de células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, provavelmente associado ao controle da infecção e consequente controle do parasitismo tecidual, já observado neste tempo em ambos os grupos. Por outro lado, no grupo tratado com BBI o percentual de sobrevivida no 30º DAI já era de 0%, provavelmente devido à falta de controle do parasitismo tecidual.

No 10º DAI, além da quimiocina MCP-1, quimioatrativa para células NK, linfócitos T e principalmente monócitos (Leonard et al., 1990; Mukaiada et al., 1998), foi observada no tecido cardíaco dos camundongos do grupo BBI um aumento de IFN- $\gamma$ , citocina que apresenta papel relevante na ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. No entanto, estes animais não conseguiram controlar o parasitismo tecidual, o que provavelmente contribuiu para a alta mortalidade observada neste grupo.

Em relação aos linfócitos B, foi demonstrada uma redução destas células no 20º DAI em todos os animais infectados e tratados, sendo esta redução mais evidente nos animais tratados com BBI, embora esta diferença entre o grupo BBI e os demais grupos não tenha sido significativa. Já no 30º dia observa-se um retorno dos níveis normais de

linfócitos B nos animais dos grupos BNZ e BNZ/BBI, provavelmente devido ao recrutamento destas células para o local da infecção e consequente controle do parasitismo tecidual.

A resposta imune mediada pelas células B tem grande importância no controle da infecção pelo *T. cruzi*, sendo a proteção induzida por anticorpos relacionada principalmente a eliminação dos parasitos da circulação sanguínea, através de mecanismos como fixação do complemento e citotoxicidade, bem como outros mecanismos protetores (Basso, 2013).

Tem sido demonstrado que alguns isotipos de imunoglobulinas IgG são muito eficientes para ativar o complemento e eliminar os parasitos, sugerindo que IgG específico para *T. cruzi* é um importante elemento da resposta imune contra o parasito (Lima-Martins et al., 1985; Cardillo et al., 2007). Além da produção de anticorpos, as células B podem atuar como células apresentadoras de antígenos, de forma a amplificar a resposta imune mediada por células (Mamula e Janeway, 1993).

Cardillo et al. (2007) demonstraram que, durante a fase aguda, camundongos deficientes em células B apresentaram menor percentagem de células T CD8<sup>+</sup> ativadas e de memória no baço e no infiltrado inflamatório no músculo esquelético. Além disso, camundongos nocaute para células B apresentaram uma redução no número de células no infiltrado inflamatório no músculo esquelético, ao passo que os ninhos intactos de parasitos era maiores, tanto em relação ao tamanho quanto em relação à quantidade. Sendo assim, a redução no percentual destas células observada principalmente no grupo tratado com BBI isolado, pode ter contribuído para o aumento do parasitismo tecidual, o qual foi observado no tecido cardíaco e no cólon destes animais e, conseqüentemente, favorecido a mortalidade observada neste grupo.

Embora o processo inflamatório seja fundamental no controle do parasitismo tecidual, lesões associadas a fenômenos degenerativos intensos, como a inflamação e a fibrose, têm papel fundamental no desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença, como a cardiomiopatia inflamatória na fase crônica e as lesões do sistema nervoso entérico (Higuchi et al., 1995; Vazquez et al., 2015). Visto isso, acredita-se que inicialmente a resposta pró-inflamatória seja importante no controle do parasitismo, no entanto, posteriormente torna-se crucial o estabelecimento de uma resposta imunomoduladora, objetivando evitar a destruição tecidual (Dutra et al., 2009).

Neste trabalho, a eficácia dos tratamentos avaliados na melhora dos aspectos histopatológicos foi determinada através da análise do processo inflamatório e da neoformação de fibras colágenas no coração e cólon dos camundongos tratados com BNZ e BBI isolados ou em associação.

Em relação ao processo inflamatório, foi observado que, tanto o tratamento com BNZ isolado quanto com o BNZ associado ao BBI promoveram a redução do processo inflamatório cardíaco, corroborando com Assíria Fontes Martins et al., 2015, que demonstraram que camundongos infectados com a cepa Y, após tratamento com BNZ apresentaram aspecto tecidual em relação ao infiltrado inflamatório no coração, semelhante ao observado em animais não infectados.

No entanto a associação do BNZ com o BBI permitiu que esta redução ocorresse já no 20º dia após a infecção, o que ocorreu provavelmente devido ao efeito imunomodulador do BBI, enquanto nos animais tratados apenas com BNZ o processo inflamatório apresentou-se reduzido somente no final da fase aguda (30º DAI).

Embora não existam trabalhos na literatura demonstrando o efeito do BBI no processo inflamatório cardíaco ou relacionando-o à infecção pelo *T. cruzi*, já foi demonstrado anteriormente que o tratamento com BBI, em doenças autoimunes, elimina a inflamação no sistema nervoso central e reduz o número de células no infiltrado inflamatório na medula espinhal de camundongos C57BL/6 tratados, além de permitir a redução da perda de células ganglionares da retina (Gran et al., 2006; Touil et al., 2008). Além disso, ao avaliar o efeito anti-inflamatório do BBI no cólon de pacientes com colite ulcerativa, foi observado que o grupo tratado apresentou resultados benéficos, tanto em relação à taxa de remissão quanto na melhora clínica, em relação ao grupo placebo (Lichtenstein et al., 2008).

No entanto, no cólon dos animais avaliados no presente trabalho não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados, ou seja, apesar da absorção do BBI ser realizada no intestino (Billings et al., 1991), seus efeitos anti-inflamatórios não puderam ser observados no cólon dos animais avaliados.

Além da análise do processo inflamatório, foi avaliada também a neoformação de fibras colágenas no coração e cólon dos animais avaliados no 30º e 120º DAI, sendo observado que os animais infectados e tratados com BNZ ou BNZ/BBI não apresentaram aumento na área ocupada por colágeno em relação aos demais grupos. Além disso, os dois

únicos animais sobreviventes do grupo CI também não apresentaram neoformação de colágeno em nenhum dos órgãos avaliados 120° DAI.

Apesar de não constar na literatura trabalhos avaliando a neoformação de colágeno em animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados com BBI, Morris et al. (2010) observaram que o tratamento com BBI induziu uma redução de TGF- $\beta$  e de fibrose em camundongos com distrofia muscular. Já Assíria Fontes Martins et al. (2015), embora não tenha realizado avaliação de um grupo infectado e não tratado, observaram que camundongos infectados com a cepa Y e tratados com BNZ durante a fase aguda, não apresentaram lesão tecidual seis meses após o tratamento, sendo a área ocupada por colágeno no coração dos camundongos tratados semelhante ao observado em animais não infectados, corroborando com os resultados deste trabalho.

Esses dados nos permitem inferir, que o BBI associado ao BNZ teve um papel protetor em relação ao processo inflamatório, no entanto, parece ter prejudicado o efeito tripanomicida do BNZ, o que pode estar associado à imunomodulação precoce da resposta imunológica. Sendo assim, a avaliação de novos esquemas terapêuticos é necessária para definir, de maneira mais efetiva, o papel do BBI na infecção pelo *T. cruzi*.



**7. Conclusão**

- BBI não apresentou atividade tripanomicida *in vitro* contra formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*;
- O tratamento com BBI não induziu a redução da parasitemia, do parasitismo tecidual ou aumento na taxa de sobrevida;
- A associação do BBI ao BNZ permitiu uma redução precoce do processo inflamatório em relação ao tratamento com BNZ isolado, entretanto não alterou o processo de neoformação de colágeno;
- Apesar de seu efeito imunomodulador, no geral, BBI não se mostrou benéfico no tratamento da doença de Chagas, provavelmente por não permitir o estabelecimento de uma resposta imune eficaz contra o *T. cruzi*.



ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. **Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection.** Journal of Autoimmunity, 17(1):99-107, 2001.

ABRAHAMSOHN, I. A., R. L. COFFMAN. ***Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection.** *Experimental Parasitology*, 84: 231–244 1996.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. **Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes.** *Infection and Immunity*, 64:1961-67, 1996.

ANDRADE, Z.A. **Immunopathology of Chagas disease.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1:71-80, 1999.

ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K. J. DUTRA, W.O. **Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Jul; 8(7): e3010, 2014.

ARAÚJO, M.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.; BRENER, Z. **A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease.** *The journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(6):819-24, 2000.

ASSÍRIA FONTES MARTINS, T.; DE FIGUEIREDO DINIZ, L.; MAZZETI, A.L.; DA SILVA DO NASCIMENTO, Á.F.; CALDAS, S.; CALDAS, I.S.; DE ANDRADE, I.M.; RIBEIRO, I.; BAHIA, M.T. **Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease.** *Plos one*, 10(6):e0128707, 2015.

BARRETT, A. J. MCDONALD, J. K. **Nomenclature: protease, proteinase and peptidase.** *The Biochemical Journal*, 1; 237(3): 935, 1986.

BARR S. C.; WARNER K. L.; KORNREIC B. G.; PISCITELLI J.; WOLFE A.; BENET L.; MCKERROW J. H. **A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by *Trypanosoma cruzi*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12): 5160–5161, 2005.

BASSO, B. **Modulation of immune response in experimental Chagas disease.** *World journal of experimental medicine*, 3(1): 1–10, 2013.

BENAIM, G.; SANDERS, J.M.; GARCIA-MARCHÁN, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A.R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J.M.; LEON-ROSSELL, A.; CONCEPCION, J.L.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. **Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole.** *Journal of medicinal chemistry*, 49(3):892-9, 2006.

BERN, C. **Chagas' disease.** *The New England journal of medicine*, 5; 373 (19):1882, 2015.

BILLINGS, P. C., BRANDON, D. L., AND HABRES, J. M. **Internalisation of the *Bowman-Birk* protease inhibitor by intestinal epithelial cells.** *European Journal of Cancer*, 27: 903-908,1991.

BIRK, Y. **The *Bowman-Birk* inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans.** *International Journal of Peptide and Protein Research*, 25:113–131, 1985.

BORGES, C.R.B.; JUNIOR, V.R.; REIS, M.A.; CASTELLANO, L.R.; JAVIER, E.L.C.; PEREIRA, S.A.L.; SANTOS, E.S.; RODRIGUES, D.B.R. **Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(2):170-74, 2009.

BRENER, Z. **Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 4:389-96, 1962.

BRENER, Z. **Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 82:205-13, 1987.

BRENER, Z.; CANÇADO, J.R.; GALVÃO, L.M.; DA LUZ, Z.M.; FILARDI, LDE S.; PEREIRA, M.E.; SANTOS, L.M.; CANÇADO, C.B. **An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 88(1):149-53, 1993.

BRYAN, M.A.; GUYACH, S.E.; NORRIS, K.A. **Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice**. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(7): 733-739, 2010.

BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.M.J.; LA FLAMME, A.C.; VAN VOORKHIS, W. C. **Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -Galactosidase**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40: 2592- 2597,1996.

CALIARI, M.V. **Princípios de morfometria digital. KS300 para iniciantes**. Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, 1-149, 1997.

CALIARI, M. V.; DO PILAR MACHADO, R.; DE LANA, M.; CAJA, R. A.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; DOS SANTOS, C. A.; MAGALHAES, G. A.; SAMPAIO, I. B.; TAFURI, W. L. **Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 44, p. 273-8, 2002b.

CAMPI-AZEVEDO, A.C.; GOMES, J.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SILVEIRA-LEMOS, D.; VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER- AVELAR, R.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; BÉLA, S.R.; SILVESTRE, K.F.; BATISTA, M.A.; SCHACHNIK, N.C.; CORREA- OLIVEIRA, R.; ELOI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, A.O. **Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events**. Immunobiology. 220 (5):564-74, 2015.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. **Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells**. Infection and Immunity, 64:128-34, 1996.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L.S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. **B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection**. Immunology, 122: 584-95, 2007.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. **The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease**. Current pharmaceutical design, 7(12):1143-56, 2001.

CHAGAS, C. **Nova trypanozomiaze humana**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1: 159-218, 1909.

CHEN, Y.T.; BRINEN, L.S.; KERR, I.D.; HANSELL, E.; DOYLE, P.S.; MCKERROW, J.H.; ROUSH, W.R. **In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi***. Plos Neglected tropical diseases, 4(9): e825, 2010.

CHUNG, M.C.; GÜIDO, R.V.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.; FERREIRA, E.I. **Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug**. Bioorganic and medicinal chemistry, 11(22):4779-83, 2003.

CORBETT, C.E.; RIBEIRO, U.JR.; PRIANTI, M.G.; HABR-GAMA, A.; OKUMURA, M.; GAMA-RODRIGUES, J. **Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease**. Diseases of the Colon and Rectum, 44:993-98, 2001.

COURA, J.R.; S. L.; DE CASTRO A. **Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(1): 3-24, 2002.

COURA, J.R. **Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(3):113-17, 2006.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. **Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR**. Mol Biochem Parasitol, 129(1):53-9, 2003.

CUNHA-NETO, E., M.; DURANTI, A.; GRUBER, B.; ZINGALES, I.; DE MESSIAS, N.; STOLF, G.; BELLOTTI, F.; PILLEGGI, M.E.; PATARROYO AND KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen**. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 92:3541–3545, 1995.

DA SILVEIRA, A.B.; ARANTES, R.M.; VAGO, A.R.; LEMOS, E.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. **Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus**. Parasitology, 131:627-34, 2005.

DAI, H.; CIRIC, B.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A. **Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by *Bowman-Birk* inhibitor**. Journal of Neuroimmunology, 245(1-2):1-7, 2012.

D'ÁVILA D.A.; GUEDES, P.M.; CASTRO, A.M.; GONTIJO, E.D.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C. **Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, n.1, 100-105, 2009.

D'AVILA REIS, D.; LEMOS, E.M.; SILVA G.C.; ADAD, S.J.; McCURLEY T.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; MACHADO C.R.S. **Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95:177- 178, 2001.

DNDI. **Informativo nº2: Plataforma de pesquisa clínica em doença de Chagas**. Disponível em: <[https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2010/03/InformativoChagas.Portugues\\_2.pdf](https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2010/03/InformativoChagas.Portugues_2.pdf) > Acesso em: novembro de 2015.

DIAS E. **Estudos sobre *Schizotrypanum cruzi***. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 28: 1-110, 1934.

- DIA, V.P.; BERHOW, M.A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. **Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages.** Journal of agricultural and food chemistry, 56(24):11707-17, 2008
- DIAS DE TORANZO, E.G.D.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZUULO, B.M.; CAZULO, J.J. **Interaction of Benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** Experimentia, 44: 880-881, 1988.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N. **Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*.** Reviews of Infection Diseases, 6: 223-238, 1984.
- DOSREIS, G.A. **Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Parasitology today, 13(9):335-42, 1997.
- DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; PINTO-DIAS, J.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO-PARRA, J.F. **Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection.** Scandinavian Journal of Immunology, 45(1):74-80, 1997.
- DUTRA, W.O.; MENEZES, C.A.; VILLANI, F.N.; DA COSTA, G.C.; DA SILVEIRA, A.B.; REIS, D.D.; GOLLOB, K.J. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104 (1):208-18, 2009.
- FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; URBINA, J.A.E ROMANHA, A.J. **Absence of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(1):174-79, 2009.
- FERREIRA JUNIOR, M.; BATISTA, S. A.; VIDIGAL, P. V.; CORDEIRO, A. A.; OLIVEIRA, F. M.; PRATA, L. O.; DINIZ, A. E.; BARRAL, C. M.; BARBUTO, R. C.; GOMES, A. D.; ARAUJO, I. D.; QUEIROZ, D. M.; CALIARI, M. V. **Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*).** European Journal of Histochemistry, 59: 2489, 2015.
- FILARDI, L. S.; Z. BRENER. **Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81: 755-9, 1987.
- FIVELMAN, Q.L.; ADAGU, I.S.; WARHUST, C.W. **Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying in vitro Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 (11): 4097- 4102. 2004.
- GASCON, J.; BERN, C.; PIZANO, M.J. **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.** Acta Tropica, 115:22-27, 2010.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. **The microbicidal activity of IFN- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- $\beta$ .** European Journal of Immunology, 22:2501-2506, 1992.

- GOLGHER, D. E GAZZINELLI, R.T. **Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease.** *Autoimmunity*, 37(5):399-409, 2004.
- GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.** *Infection and Immunity*, 71(3):1185-93, 2003.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CALABRESE, K.S.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; LAGRANGE, P.H. ***Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes.** *Histology Histopathology*, 17(3):837-44, 2002.
- GRAN, B.; TABIBNZADEH, N.; MARTIN, A.; VENTURA, E.S.; WARE, J.H.; ZHANG, G.X.; PARR, J.L.; KENNEDY, A.R.; ROSTAMI, A.M. **The protease inhibitor, *Bowman-Birk Inhibitor*, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis.** *Multiple Sclerosis*, 12(6):688-97, 2006.
- GUEDES, P.M.; VELOSO V.M.; AFONSO L.C.; CALIARI M.V.; CARNEIRO C.M.; DINIZ L.F.; MARQUES-DA-SILVA .E.A.; CALDAS I.S.; DO VALLE MATTÁ M.A.; SOUZA S.M.; LANA M.; CHIARI E.; GALVÃO L.M.; BAHIA M.T. **Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15; 130 (1-2):43-52, 2009.
- HENRIQUES-PONS, A.; OLIVEIRA, G. M.; PAIVA, M. M.; CORREA, A. F.; BATISTA, M. M.; BISAGGIO, R. C.; LIU, C. C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; COUTINHO, C. M.; PERSECHINI, P. M.; ARAUJO-JORGE, T. C. **Evidence for a perforin- mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection.** *International Journal of Experimental Pathology*, 83:67-79, 2002.
- HIGUCHI, M.L.; DE MORAIS, C.F.; PEREIRA BARRETO, A.C.; LOPES, E.A.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. **The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies.** *Clinical Cardiology*, 10(11):665-70, 1987.
- HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A. **Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings.** *Cardiovascular Pathology*, 2:101-6, 1993.
- HIGUCHI, M.D. **Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions.** *Revista Paulista de Medicina*, 113(2):821-5, 1995.
- HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.E.; ROODMAN, S.T. **Involvement of CD4<sup>+</sup> Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*.** *Infection and immunity*, 68(1):197-204, 2000.
- HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A., BRONBACHER, F. **Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase.** *Infection and Immunity*, 66:1208-15, 1998.



- HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRÜNIG, G.; FORT M.; RENNICK D.; ARAUJO, F. G. **IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi***. *Journal of Immunology*, 158: 3311–3316, 1997.
- JELICKS, L.A.; CHANDRA, M.; SHTUTIN, V.; PETKOVA, S.B.; TANG, B.; CHRIST, G.J.; FACTOR, S.M.; WITTNER, M.; HUANG, H.; DOUGLAS, S.A.; WEISS, L.M.; ORLEANS-JUSTE, P.D.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H.B. **Phosphoramidon treatment improves the consequences of chagasic heart disease in mice**. *Clinical Science*, 103(48): 267S-271S, 2002.
- JONES E.M.; COLLEY D.G.; TOSTES S.; LOPES E.R.; VNEMCAK-JONES C.L.; McCURLEY T.L. **Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy**. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, 48(3):348-57, 1993.
- KÖEBERLE, F. **Patogenia da moléstia de Chagas. Estudos dos órgãos musculares ocos**. *Revista Goiana de Medicina*, 3:155-180, 1957.
- KÖBERLE, F. **The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis**. *Bulletin of the World Health Organization*, 42: 739-43, 1970.
- KORKMAZ, B.; HORWITZ, M.S.; JENNE, D.E.; GAUTHIER, F. **Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases**. *Pharmacological Reviews*, 62(4):726-59, 2010.
- KUEHN, C.C.; OLIVEIRA, L.G.; MIRANDA, M.A.; PRADO, J.C. **Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection**. *Parasitology*, 141(7):904-13, 2014.
- LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L.E.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. **Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism**. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:435-41, 2001.
- LANA, M.; LOPES, L.A.; MARTINS, H.R.; BAHIA, M.T.; MACHADO-DE-ASSIS, G.F.; WENDLING, A.P.; MARTINS-FILHO, O.A.; MONTOYA, R.A.; DIAS, J.C.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; COURA, J.R. **Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8):1139-47, 2009.
- LAMAS, M. C.; VILLAGGI, L.; NOCITO, I.; BASSANI, G.; LEONARDI, D.; PASCUTTI, F.; SERRA, E.; SALOMÓN, C.J. **Development of parenteral formulations and evaluation of biological activity of trypanocide drugs benznidazole**. *International Journal of Pharmaceutics*, 307: 239-43, 2006.
- LEON, J.S.; DANIELS, M.D.; TORIELLO, K.M.; WANG, K.; ENGMAN, D. **Cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins**. *Infection and Immunity*, 72(6): 3410-17, 2004.
- LEON, J.S.; ENGMAN, D.M. **Autoimmunity in Chagas heart disease**. *International Journal of Parasitology*, 31(5-6):555-6, 2001.
- LEONARD E.J.; YOSHIMURA T. **Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP- 1)**. *Immunology Today*, 11:97–101, 1990.

LEWIS M.D.; FORTES FRANCISCO A.; TAYLOR M.C.; BURRELL-SAWARD H.; MCLATCHIE A.P.; MILES M.A.; KELLY J.M. **Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection.** Cellular Microbiology, 16(9):1285-300, 2014.

Cell Microbiol. 2014 Sep;16(9):1285-300. doi: 10.1111/cmi.12297. Epub 2014 May 1.

LIMA-MARTINS, M.V.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. **Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies.** Parasite Immunology, 7:367-76, 1985.

LICHTENSTEIN, G.R.; DEREN, J.J.; KATZ, S.; LEWIS, J.D.; KENNEDY, A.R.; WARE, J.H.; **Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis.** Digestive diseases and Science, 53: 175-180, 2008.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J.D. ***Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole.** Experimental Parasitology, 124(2):167-71, 2010.

LOSSO, J. N. **The biochemical and functional food properties of the *Bowman-birk* inhibitor.** Critical Reviews Food Science Nutrition, 48: 94-118, 2008.

MALTOS, K.L.; MENEZES, G.B.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; SANTOS, J.M.; ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. **Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp.** Archive of Oral Biology, 49:443-50, 2004.

MAMULA M.J.; JANEWAY C.A. **Do B cells drive the diversification of immune responses?** Immunol Today, Apr;14(4):151-2, 1993.

MARÍN-MANZANO, M.C.; RUIZ, R.; JIMÉNEZ, E.; RUBIO, L.A.; CLEMENTE, A. **Anticarcinogenic soyabean *Bowman-Birk* inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition *in vitro*.** The British Journal of Nutrition, 101(7):967-71, 2009.

MARTIN, D.; TARLETON, R.L. **Generation, specificity, and function of CD8<sup>+</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection.** Immunological Reviews, 201:304-17, 2004.

MARTIN, D.L.; WEATHERLY, D.B.; LAUCELLA, S.A.; CABINIAN, M.A.; CRIM, M.T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, S.H.; ROSENBERG, C.S.; COLLINS, M.H.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, R.L. **CD8<sup>+</sup> T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes.** PLoS Pathogens, 2:e77, 2006.

MATSUDA N.M.; MILLER S.M.; EVORA P.R. **The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease.** Clinics, 64(12):1219-24, 2009.

MCKERROW J.H.; SUN E.; ROSENTHAL P.J.; BOUVIER J. **The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa.** Annual Reviews of Microbiology, 47:821-853, 1993.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N.M.; ROCHA, C.D.; VIEIRA, L.Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R.T. **Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection.** American Journal of Pathology, 159:1723-33, 2001.

- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. **Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells.** Immunological Review, 112:183-207, 1989.
- MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENNER, Z.; ROMANHA, A.J; LOEBENBER G.D. e URBINA. **Activities of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(1): 150–155, 2000.
- MOLINA, I.; GÓMEZ I PRAT, J.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. **Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease.** The New England Journal of Medicine, 370(20):1899-908, 2014.
- MONCAYO, A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98:577-91, 2003.
- MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.L. **An uptade on Chagas disease (Human American trypanosomiasis).** Annals of Tropical Medicine Parasitology, 100(8):663-77, 2006.
- MORRIS, C.A.; SELSBY, T.J.; MORRIS, L.D.; PENDRAK, K.; SWEENEY, H.L. **Bowman-Birk inhibitor attenuates dystrophic pathology in mdx mice.** Journal of Applied Physiology, 109 no. 5 (1492-1499), 2010.
- MUKAIDA N.; HARADA A.; MATSUSHIMA K. **Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions.** Cytokine Growth Factor Reviews, 9:9–23, 1998.
- MÜLLBACHER, A.; WARING, P.; THA HLA, R.; TRAN, T.; CHIN, S.; STEHLE, T.; MUSETEANU, C.; SIMON, M.M. **Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes.** Proceedings of the national academy of sciences of the United States of América, 96(24):13950-5, 1999.
- MULLER, U.; SOBEK, V.; BALKOW, S.; HOLSCHER, C.; MULLBACHER, A.; MUSETEANU, C.; MOSSMANN, H.; SIMON, M.M. **Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway.** European Jornal of Immunology, 33(1):70-78, 2003.
- MUÑOZ, J.; GÓMEZ I PRAT, J.; GÁLLEGO, M.; GIMENO, F.; TREVIÑO, B.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; RIBERA, O.; MOLINA, L.; SANZ, S.; PINAZO, M.J.; RIERA, C.; POSADA, E.J.; SANZ, G.; PORTÚS, M.; GASCON, J. **Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain).** Acta Tropica, 111(1):51-5, 2009.
- MURTA, S. M.; GAZZINELLI R. T.; BRENER Z.; ROMANHA A.J. **Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox.** Molecular and Biochemical Parasitology, 93: 203-14, 1998.
- MURTA, S. M.; ROPERT C.; ALVES R.O.; GAZZINELLI R.T.; ROMANHA A.J. **In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release**

by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology*, 21: 535-44, 1999.

NICKELL, S. P.; SHARMA, D. *Trypanosoma cruzi*: roles for perforin- dependent and perforin-independent immune mechanisms in acute resistance. *Experimental Parasitology*, 94:207–216, 2000.

NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. **Purification and characterization of protease inhibitors from peanuts (*Arachis hypogaea*)**. *Journal of Biochemistry* 91: 1427- 1434, 1982.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. **Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I, and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume *Bowman-Birk* type inhibitors**. *Journal of Biochemistry*, 94:589-599, 1983.

NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M.; AZAM, T.; RABINKOV, A.; DINARELLO, C.A.; KIM, S.H. **Proteinase 3 is an IL-32 binding protein**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América*, 103(9):3316-21, 2006.

ODANI, S.; IKENAKA, T. **Scission of soybean *Bowman-Birk* proteinase inhibitor into two small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity**. *Journal of Biochemistry*, 74: 857-860, 1973.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. **Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the *Bowman-Birk* type**. *Journal of Biochemistry*, 100: 975-983, 1986.

OLIVEIRA, R.B.; MENEGHELLI, U.G.; GODOY, R.A.; DANTAS, R.O.; PADOVAN, W. **Abnormalities of interdigestive motility of the small intestine in patients with Chagas disease**. *Digestive Diseases and Sciences*, 28:294-9, 1983.

OLIVEIRA, R.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, R.O.; LIARTE, D.B.; DONNICI, C.L.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. **Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101:169-173, 2006.

PADILLA, A.M.; BUSTAMANTE, J.M.; TARLETON, R.L. **CD8<sup>+</sup> T cells in *Trypanosoma cruzi* infection**. *Current opinion in immunology*, 21 (4): 385-90, 2009.

PELIZZARO-ROCHA, K.J.; TIUMAN, T.S.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. **Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi***. *Phytomedicine*, 18(1):36-9, 2010.

PENITENTE, A.R.; LEITE, A.L.; DE PAULA COSTA, G.; SHRESTHA, D.; HORTA, A.L.; NATALI, A.J.; NEVES, C.A.; TALVANI, A. **Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi***. *The american journal of tropical medicine and hygiene*.

PÉREZ, A.R.; TAMAE-KAKAZU, M.; PASCUTTI, M.F.; ROGGERO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. **Deficient control of *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is related to a delayed specific IgG response and increased macrophage production of pro-inflammatory cytokines**. *Life Sciences*, 77:1945–1959, 2005.

POLAK A.; RICHLE R. **Mode of action of the 2- nitroimidazol derivative benznidazole**. *Annals of Tropical Medicine of Parasitology*, 72: 45, 1978.

- PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** The Lancet Infection Diseases, 1:92-100, 2001.
- RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. **Chagas heart disease.** Clinical Cardiology, 23: 883–89, 2000.
- REED, S. G. **Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*.** MOLECULAR APPROACHES TO PARASITOLOGY, 443– 445, 1995.
- ROFFÊ, E.; ROTHFUCHS, A.G.; SANTIAGO, H.C.; MARINO, A.P.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L.R.; MURPHY, P.M. **IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection.** Journal of immunology, 15;188(2):649-60, 2012.
- ROMANHA A.J.; CASTRO S.L.; SOEIRO MDE N, LANNES-VIEIRA J.; RIBEIRO I.; TALVANI A.; BOURDIN B.; BLUM B.; OLIVIERI B.; ZANI C.; SPADAFORA C.; CHIARI E.; CHATELAIN E.; CHAVES G.; CALZADA J.E.; BUSTAMANTE J.; FREITAS-JUNIOR L.H.; ROMERO L.I.; BAHIA M.T.; LOTROWSKA M.; SOARES M.; ANDRADE S.G.; ARMSTRONG T.; DEGRAVE W.; ANDRADE ZDE A. **In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105(2):233-8, 2010.
- ROSSI M.A. **Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations.** International Journal of Cardiology. 30;66(2):183-94, 1998.
- ROTTENBERG, M.; CARDONI, R.L.; ANDERSSON, R.; SEGURA, E.L.; ORN, A. **Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection.** Scandinavian Journal of Immunology, 28:573-82, 1988.
- ROTTENBERG, M.E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L. **Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup>.** Immunology Letters, 45:53-60, 1995.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A. e HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. **Parasitic load increases and Myocardial Inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*- infected mice after inactivation of helper T cells.** Annales de l'Institute Pasteur. Immunology 139, 225-236, 1988.
- RUSSO, M.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. **Depletion of L3T4<sup>+</sup> T lymphocytes during acute *Trypanosoma cruzi* infection abolish macrophage and B lymphocyte activation but not tissue inflammatory reaction.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 83:527-538, 1988.
- SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. **Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases.** Experimental and Molecular Pathology, 93(3):428-33, 2012.
- SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; POU, D.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; CABEZOS, J.; SORIANO, A.; SERRE, N.; GÓMEZ I PRAT, J.; PAHISSA, A.; MOLINA, I. ***Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile.** Clinical Microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and infections, 20(7):706-12, 2014.

- SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. **Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** The Journal of Experimental Medicine, 175, 169-74, 1992.
- SOARES, M.B.; SILVA-MOTA, K.N.; LIMA, R.S.; BELLINTANI, M.C.; PONTES- DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism.** The American Journal of Pathology, 159:703-9, 2001.
- SOEIRO, M.N.; DE CASTRO, S.L. ***Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches.** Expert Opinion on Therapeutic Targets, 13(1):105-21, 2009.
- SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E.L. **Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina.** Current Opinion in Infectious Diseases, 19(6):583-7, 2006.
- SOUZA P.E.; ROCHA M.O.; MENEZES C.A.; COELHO J.S.; CHAVES A.C.; GOLLOB K.J.; DUTRA W.O. ***Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease.** Infection and Immunity, 75(4):1886-94, 2007.
- SOUZA P.E.; ROCHA M.O.; ROCHA-VIEIRA E.; MENEZES, C. A. S.; CHAVES A.C.; GOLLOB K.J.; DUTRA W.O. **Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity.** Infection and Immunity, p. 5283–5291, 2004.
- TAFURI, W.L. **Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease: light and electron microscope studies.** The American Journal of Tropical of Medicine and Hygiene, 19:405-17,1970.
- TAFURI, W.L. **Light and electron microscopy studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis.** Virchows Archiv: an International Journal of Pathology, 354:36-49, 1971.
- TAFURI, W. L.; MARIA, T. A.; LOPES, E. R. **[Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study].** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 13, p. 76-91, 1971.
- TAFURI, W. L.; DE LANA, M.; CHIARI, E.; CALIARI, M. V.; BAMBIRRA, E. A.; RIOS-LEITE, V. H.; BARBOSA, A. J. **[Dogs as experimental models for the study of the natural course of Chagas disease].** *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 21, p. 77, 1988.
- TANI,K.; MURPHY, W.J.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. **The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific IG production in mice.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 282(4):971-6, 2001.
- TARLETON R.L. **The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections** Parasitology Today, 11(1):7-9, 1995.
- TARLETON, R.L.; ZHANG, L. **Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?** Parasitology Today, 15:94-99, 1999.
- TARLETON, R.L. **Parasite persistence in the etiology of Chagas disease.** International Journal for Parasitology, 31:550-54, 2001.

- TOUIL, T.; CIRIC, B.; VENTURA, E.; SHINDLER, K.S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. **Bowman-Birk inhibitor suppresses autoimmune inflammation and neuronal loss in a mouse model of multiple sclerosis.** Journal of the neurological sciences, 271(1-2):191-202, 2008.
- TRAPANI, J.A. **Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases.** Genome Biology, 2(12):3014, 2001.
- TZELEPIS F.; DE ALENCAR B.C.; PENIDO M.L.; GAZZINELLI R.T.; PERSECHINI P.M.; RODRIGUES M.M. **Distinct kinetics of effector CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice.** Infection and Immunity, 74:2477-2481, 2006.
- URBINA, J.A.; LAZARDI, K.; MARCHAN, E.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R.; MALDONADO, R.A.; PAYARES, G.; DE SOUZA, W. **Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo studies.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37(3):580-91, 1993.
- URBINA, J.A. **Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant?** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94 (1): 349-355, 1999.
- URBINA, J.A. **Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments.** Current Opinion in infections Diseases, 14: 117-118, 2001.
- URBINA, J.A. **Chemotherapy of Chagas disease.** Current Pharmaceutical Disease, 9: 287-295, 2002.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.** Trends in Parasitology, 19(11):495-501, 2003.
- URBINA, J.A. **Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches.** Acta Tropica, 115(1-2):55-68, 2010.
- VAZQUEZ, B.P.; VAZQUEZ, T.P.; MIGUEL, C.B.; RODRIGUES, W.F.; MENDES, M.T.; DE OLIVEIRA, C.J.; CHICA, J.E. **Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load,** Parasites and Vectors, 3:8:206, 2015.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCH, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M.G.; POSTAN, M.; ARMENTI A. **Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment.** Annals of Internal Medicine, 144: 724-734, 2006.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C. **Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine.** Expert Review of anti-infective Therapy, 5(4):717-26, 2007.
- WARE, J.H.; WAN, X.S.; NEWBERNE, P.; KENNEDY, A.R. **Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis.** Digestive diseases and sciences, 44(5):986-90, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Chagas disease (American trypanosomiasis).** World Health Organ Fact Sheet, n340, 2015.







**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 2011/67, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Efeito do tratamento com inibidores de Bowman-Birk (BBI) ao longo da infecção pelo Trypanosoma cruzi*", que tem como responsável a Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em março de 2015.

Ouro Preto, 13 de outubro de 2011.

**Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa**

**Coordenadora da CEUA-UFOP**