

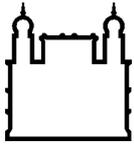
*MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ*

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LOVASTATINA E BENZNIDAZOL SOBRE A
MICROVASCULOPATIA CEREBRAL EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE
DOENÇA DE CHAGAS AGUDA**

BEATRIZ MATHEUS DE SOUZA GONZAGA

*Rio de Janeiro
Maio de 2017*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Beatriz Matheus de Souza Gonzaga

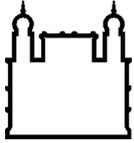
Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre a microvasculopatia cerebral em modelo experimental murino de doença de Chagas aguda

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: *Dr^a. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni*

RIO DE JANEIRO

Maio de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: BEATRIZ MATHEUS DE SOUZA GONZAGA

**Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre a
microvasculopatia cerebral em modelo experimental murino de doença de
Chagas aguda**

ORIENTADORA: Dr^a. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni

Aprovada em: 02/05/17

EXAMINADORES:

**Prof. Dra. Joseli Lannes-Vieira
Prof. Dra. Solange L. de Castro
Prof. Dr. Wagner Baetas da Cruz
Prof. Dr. Roberto M. Saraiva
Prof. Dr. Daniel Adesse**

Rio de Janeiro, 02 de maio de 2017

Gonzaga, Beatriz .

Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre a microvasculopatia cerebral em modelo experimental murino de doença de Chagas aguda / Beatriz Gonzaga. - Rio de Janeiro, 2017.

xv, 69 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Luciana Garzoni.

Bibliografia: f. 56-69

1. Doença de Chagas. 2. Microcirculação cerebral. 3. Lovastatina. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Inovações em Terapias Ensino e Bioprodutos e Laboratório de Investigação Cardiovascular no IOC, Fiocruz, RJ sob orientação da Dr^a Luciana Ribeiro Garzoni.

Data de matrícula no Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: 1º de abril de 2015.

*Dedico aos meus pais Marinéa e
Joubert pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por guiar meus passos e me dar força para continuar em todos os momentos difíceis. Por colocar pessoas maravilhosas na minha vida que sempre me apoiaram e me impulsionaram a ser cada vez melhor.

À minha família que sempre se preocupou e me auxiliou de todas as formas possíveis. Aos meus pais Marinéa e Joubert que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a conquistar os meus objetivos. Aos meus primos/irmãos André e Luciana por estarem sempre do meu lado tanto nos momentos bons quanto ruins, sempre fazendo a caminhada ser mais leve. Aos meus tios Jadir e Martha e a minha vó Zilah por todo apoio.

Aos meus amigos de laboratório por toda ajuda, aprendizagem, conselhos e pelas boas gargalhadas. Ao Samuel, Leonardo, Jade, Matheus, Caio, Daniella, Fabiana, Raquel, Marina, Nathalie e a todos os membros do LICV e LITEB.

Às minhas parceiras Laura e Líndice pela paciência, pelos conselhos, pelas discussões de protocolo, pela troca de conhecimento. Vocês foram fundamentais nessa caminhada, nunca vou esquecer de todo apoio e companheirismo.

À minha orientadora Dr^a Luciana Garzoni por ter acreditado no meu potencial, pela paciência, pelos ensinamentos, pela cobrança que faz com que eu sempre busque melhorar a cada dia. Sou muito grata por ter me acolhido como membro da sua equipe há quatro anos.

Aos amigos que conheci na Fiocruz e se tornaram meus melhores amigos me ouvindo nos momentos de estresse, me ajudando nos momentos de dúvidas, e me apoiando em todos os aspectos da minha vida, Laura e Leonardo.

Às minhas amigas da faculdade e aos meus amigos da vida, por entenderem minhas ausências e por sempre tentarem me ajudar de alguma maneira. A companhia de vocês nos momentos de descontração fez toda a diferença.

Ao auxílio dos Drs. Vanessa Estato, Tania Araújo-Jorge, Daniela Beghini, Hugo Caire, Isabelle Barbieri e Eduardo Tibiriçá.

Aos membros da banca por aceitarem meu convite, sei que contribuirão com discussões muito produtivas.

À Fiocruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e à Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por proporcionarem espaço e infraestrutura necessários para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao apoio financeiro do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz e CAPES.

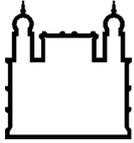
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre a recuperação da microcirculação cerebral em modelo experimental murino de doença de Chagas aguda

RESUMO

Alterações do sistema nervoso central ocorrem na doença de Chagas podendo levar à meningoencefalite, acidente vascular cerebral e dano cognitivo. Recentemente nosso grupo demonstrou que a infecção aguda pelo Trypanossoma cruzi (cepa Y) causa importante microvasculopatia cerebral em camundongos Swiss Webster, demonstrada pela indução de disfunção endotelial, rarefação capilar funcional e aumento de rolamento e adesão de leucócitos em venulas. Atualmente, para o tratamento da doença de Chagas contamos apenas com o benznidazol (BZ) e o nifurtimox, drogas que apresentam 80% de eficácia na fase aguda e menos de 20% na fase crônica. Estas drogas podem apresentar efeitos adversos e levar eventualmente, ao abandono do tratamento. Sendo assim, a busca por novas alternativas terapêuticas é necessária. Uma vez que, as estatinas possuem efeitos pleiotrópicos tais como ação anti-inflamatória, melhora da função endotelial e apresenta ação tripanossomicida, podem ser uma alternativa para o tratamento da microvasculopatia cerebral na doença de Chagas. Nossa hipótese é que a lovastatina (LOV) em monoterapia ou em associação ao BZ, em esquema abortivo de tratamento, seria capaz de impedir os danos à microcirculação e reduzir a inflamação no cérebro de camundongos, durante a doença de Chagas aguda experimental. Camundongos machos Swiss Webster foram inoculados intraperitonealmente com 10^4 formas tripomastigotas do T. cruzi (cepa Y). Após 24 horas os animais foram tratados por via oral durante 14 dias consecutivos com 20 mg/kg/dia LOV, 50 ou 100 mg/kg/dia BZ e com a combinação de 20 mg/kg/dia LOV e 50 mg/kg/dia BZ. Observamos no tecido cerebral ninhos de parasitas e nódulos inflamatórios. A expressão da molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) não foi alterada pela infecção. No entanto, houve um aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), no cérebro dos animais infectados que não foi alterado pelo tratamento com LOV. Todos os esquemas de tratamento, com exceção da LOV em monoterapia, foram capazes de reduzir a parasitemia, o peso e a mortalidade dos animais. Além disso, impediram a rarefação capilar funcional e o aumento do rolamento de leucócitos. Os tratamentos com 100

mg/kg/dia de BZ em monoterapia e com 50 mg/kg/dia de BZ em combinação com LOV, diminuíram também a adesão dos leucócitos e melhoraram o fluxo sanguíneo cerebral. Concluimos com o presente estudo que o BZ e a sua combinação com lovastatina protegem a microcirculação e reduzem a inflamação no cérebro de camundongos durante a doença de Chagas aguda experimental.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

*Central nervous system alterations have been identified in Chagas disease in both human and experimental models, leading to meningoencephalitis, stroke and cognitive damage. Recently our group demonstrated that Trypanosoma cruzi acute infection (cepa Y) leads to cerebral microvasculopathy in Swiss Webster mice as consequence of endothelial dysfunction, capillary rarefaction, increased leukocytes rolling and adhesion. Currently, only benznidazole (BZ) and nifurtimox are available for clinical treatment. These drugs present 80% efficiency in acute phase, and less than 20% in chronic phase, besides side effects that may lead to treatment interruption. In this context, the search for new therapeutics alternatives is necessary. Since statins present pleiotropic effects such as anti inflammatory activity, endothelial function improvement and trypanocidal activity, it could be an alternative of treatment for cerebral microvasculopathy in Chagas disease. Our hypothesis is that lovastatin (LOV) in monotherapy or in association with BZ, using the abortive treatment scheme, could decrease microcirculation damage and reduce brain inflammation in acute experimental Chagas disease. Swiss Webster mice were intraperitoneally inoculated with 10^4 trypomastigotes forms of *T. cruzi*, and after 24 h were treated by oral route for 14 consecutive days with 20 mg/kg/day lovastatin, 50 or 100 mg/kg/day BZ or with the combination of 20 mg/kg/day lovastatin plus 50 mg/kg/day BZ. In non-treated infected mices, cerebral tissue presented parasite nest and inflammatory nodules. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression was not affected by the infection. However, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression was increased in brain of infected animals. All treatment schemes, except lovastatin in monotherapy, reduced parasitemia, mortality and prevented reduction of body weight. Moreover, they avoided the functional capillary rarefaction and the increase in leukocyte rolling. Treatments*

with 100 mg/kg/day BZ in monotherapy and using 50 mg/kg/day BZ in combination with LOV, also reduced leukocyte adhesion and improved the brain blood flow. The present study showed that BZ and its combination with LOV, protect the microcirculation and reduce brain inflammation in acute experimental Chagas disease.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
	1.1.1. Epidemiologia.....	2
	1.1.2. Agente etiológico.....	3
	1.1.3. Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
	1.1.4. Fases aguda e crônica da doença de Chagas.....	5
1.2.	Quimioterapia para doença de Chagas.....	6
	1.2.1. Drogas em uso clínico.....	6
	1.2.2. Novas alternativas.....	7
1.3.	Alterações no sistema nervoso central na doença de Chagas.....	9
	1.3.1. Meningoencefalite.....	9
	1.3.2. Acidente vascular cerebral.....	10
	1.3.3. Dano cognitivo.....	11
1.4.	Alterações na microcirculação.....	12
	1.4.1. Alterações microvasculares cardíacas.....	12
	1.4.2. Alterações microvasculares cerebrais.....	13
1.5.	Mediadores inflamatórios	13
1.6.	Óxido nítrico sintase endotelial.....	15
1.7.	Estatinas.....	15
	1.7.1. Efeitos pleiotrópicos.....	16
	1.7.2. Efeitos na doença de Chagas experimental.....	18
1.8.	Justificativa.....	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Animais.....	22
3.2	Tratamento	22
3.3	Avaliação da parasitemia, peso e sobrevida.....	23
3.4	Escore clínico	23
3.5	Microscopia intravital.....	23
3.6	Fluxometria à laser	24

3.7	Análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina.....	25
3.8	Imunohistoquímica.....	25
3.9	Extração e dosagem de proteínas.....	26
3.10	Western Blot	26
3.11	Análises estatísticas	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre parasitemia, peso e sobrevida	29
4.2	Caracterização dos sinais clínicos do modelo de estudo através da aplicação de escore clínico	29
4.3	Tratamento com benznidazol e sua associação à lovastatina impede a redução da densidade capilar funcional cerebral durante a infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	32
4.4	Tratamento com benznidazol e sua associação com a lovastatina previnem o aumento das interações leucócito-endotélio na microcirculação cerebral observado durante a infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	34
4.5	Resumo dos resultados de microscopia intravital	36
4.6	Tratamento com benznidazol e sua associação com a lovastatina previnem o diminuição do fluxo sanguíneo cerebral durante a infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	36
4.7	Tratamento com benznidazol e sua associação com a lovastatina reduzem infiltrado de células F4-80 ⁺ e CD3 ⁺ no tecido cerebral de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i>	39
4.8	Tratamento com lovastatina não altera a expressão de mediadores inflamatórios no tecido cerebral durante a infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	43
4.9	Tratamento com lovastatina não altera a expressão proteica da oxido nítrico sintase endotelial no tecido cerebral durante a infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	44
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 2 - Estruturas químicas de Nifurtimox e Benznidazol.....	7
Figura 3 - Estruturas químicas de Mevastatina e Lovastatina.....	16
Figura 4 - Caracterização do modelo experimental.....	29
Figura 5 - Escore clínico para caracterização do grau das alterações clínicas.....	29
Figura 6 - Análise da densidade capilar funcional por microscopia intravital...31	
Figura 7 - Análise da interação leucócito-endotélio por microscopia intravital.....	33
Figura 8 - Fluxometria através do Laser Speckle.....	35
Figura 9 - Análise de cortes histológicos do tecido cerebral.....	37
Figura 10 - Análise do número de células CD3 ⁺ por imunohistoquímica.....	38
Figura 11 - Análise do número de células F4-80 ⁺ por imunohistoquímica.....	39
Figura 12 - Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> sobre mediadores inflamatórios....	41
Figura 13 - Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> sobre a expressão da óxido nítrico sintase endotelial.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos e diluições utilizadas no Western blot.....	26
Tabela 2 - Densidade capilar funcional e interação leucócito endotélio por microscopia intravital 15 dias pós infecção.....	34
Tabela 3 – Quantificação de células inflamatórias no tecido cerebral.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>AVC</i>	<i>acidente vascular cerebral</i>
<i>BHE</i>	<i>barreira hematoencefálica</i>
<i>eNOS</i>	<i>óxido nítrico sintase endotelial</i>
<i>FoxP3</i>	<i>proteína P3 da caixa do forkhead</i>
<i>GAPDH</i>	<i>gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
<i>GATA-3</i>	<i>fator de transcrição ou proteína de ligação ao DNA GATA-3</i>
<i>HMG-CoA</i>	<i>3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A</i>
<i>ICAM-1</i>	<i>molécula de adesão intercelular 1</i>
<i>IFNγ</i>	<i>interferon gama</i>
<i>IL-1β</i>	<i>interleucina 1 beta</i>
<i>IL-6</i>	<i>interleucina 6</i>
<i>IL-10</i>	<i>interleucina 10</i>
<i>iNOS</i>	<i>óxido nítrico sintase induzível</i>
<i>MCP-1</i>	<i>proteína quimioatrativa de monócitos 1</i>
<i>NF-κB</i>	<i>fator nuclear kappa B</i>
<i>NO</i>	<i>óxido nítrico</i>
<i>SNC</i>	<i>sistema nervoso central</i>
<i>TGFβ</i>	<i>fator de transformação do crescimento beta</i>
<i>TNF</i>	<i>fator de necrose tumoral</i>
<i>VCAM-1</i>	<i>molécula de adesão celular vascular 1</i>
<i>VLA-4</i>	<i>antígeno de expressão tardia 4</i>
<i>VLA-5</i>	<i>antígeno de expressão tardia 5</i>

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). É uma doença negligenciada, endêmica na América Latina que afeta cerca de 7 milhões de pessoas no mundo. No Brasil estima-se que existam cerca de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2017).

Esta doença é dividida em duas fases, sendo a fase aguda caracterizada por parasitemia patente e intensa resposta inflamatória e a fase crônica, caracterizada por parasitemia muito baixa e intermitente, presença de parasitas nos tecidos e resposta inflamatória crônica e de baixa intensidade. A cardiomiopatia é a principal manifestação da doença de Chagas, porém, também são observadas manifestações digestivas e neurológicas (Machado et al., 2012; Rassi et al., 2012).

As manifestações neurológicas podem ocorrer na fase aguda da doença, levando à meningoencefalite, que ocorre principalmente em crianças e imunossuprimidos, e na fase crônica podendo levar ao acidente vascular cerebral de origem cardioembólica ou não (Carod-Artal et al., 2005, 2007; Py, 2011).

Apesar das alterações no sistema nervoso central (SNC) já terem sido comprovadas, pouco se sabe sobre o efeito da infecção pelo *T. cruzi* na microcirculação cerebral. Estudos em humanos demonstram que a DC altera a microcirculação cerebral (Carod-Artal et al., 2010). Nosso grupo demonstrou que a infecção aguda pelo *T. cruzi* causa alterações funcionais na microcirculação cerebral em camundongos, como a redução no número de capilares espontaneamente perfundidos, intensa inflamação microvascular, presença de grandes quantidades de agregados intravasculares de leucócitos-plaquetas e disfunção endotelial (Nisimura et al., 2014).

As estatinas são drogas clinicamente utilizadas para o tratamento da hipercolesterolemia. Seus efeitos pleiotrópicos vem sendo descritos, entre eles sua ação tripanossomicida tanto *in vitro* (Kessler et al., 2013) como *in vivo* em modelos experimentais de DC aguda (Urbina et al., 1993; Silva et al., 2012). Sabe-se que as estatinas têm ações antioxidante e imunomoduladoras, melhoram a função endotelial, inibem a resposta inflamatória, aumentam os níveis endoteliais de óxido nítrico (NO), aumentam a estabilidade da placa aterosclerótica (revisado em Liao & Laufs, 2005). Recentemente, estudos demonstraram o efeito da lovastatina na

microcirculação cerebral funcional em modelo de malária cerebral pela infecção por Plasmodium berghei (Reis et al., 2012).

Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar o efeito do tratamento com lovastatina em monoterapia e em combinação ao benznidazol em camundongos Swiss Webster infectados pela cepa Y do T. cruzi durante a infecção aguda experimental, analisando os seguintes parâmetros: i) aspectos clínicos através da aplicação de um escore clínico; ii) parasitemia, parasitismo e infiltrado inflamatório no cérebro, iii) a microcirculação funcional cerebral e o fluxo sanguíneo cerebral; iv) a expressão proteica de moléculas envolvidas na migração de leucócitos: molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1); v) a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que regula a função vascular.

Esperamos com o presente estudo, contribuir para o entendimento das alterações cerebrais observadas na DC e para a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença.

1.1. A doença de Chagas

A DC, ou tripanossomíase americana, foi descoberta em 1909, pelo médico sanitário Carlos Chagas. É causada pelo protozoário flagelado Trypanosoma cruzi que apresenta como hospedeiros vertebrados os mamíferos sendo transmitido principalmente pelos insetos hematófagos da família Trypanosomatidae, durante o repasto sanguíneo (Chagas, 1909). A transfusão de sangue, os acidentes de laboratório, a infecção congênita e a infecção oral são também formas de transmissão da doença (WHO, 2017).

1.1.1. Epidemiologia

A DC é uma doença endêmica na América Latina, afetando cerca de 7 milhões de pessoas no mundo. De 2000 a 2011, foram contabilizadas 76.847 mortes por doenças tropicais negligenciadas, sendo a DC responsável por 76,7% dessas mortes. (Martins-Melo, 2016). Aproximadamente 60% do total de pessoas que estão infectadas com T. cruzi são residentes do Brasil, México e Argentina (revisto em Rassi Jr et al., 2010).

No Brasil, apesar do controle da transmissão vetorial pelo Triatoma infestans a estimativa é de 1,8 a 4,2 milhões de pessoas infectadas (Dias et al., 2016). A

incidência da doença é alta em áreas rurais com condições ambientais que favorecem a instalação dos insetos triatomíneos nas residências (WHO, 2017). A partir dos anos 80 houve um grande movimento populacional de latinos para países como Estados Unidos, Europa, Ásia e Austrália, criando novos desafios epidemiológicos incluindo a DC (Schmunis, 2007; Schmunis & Yadon, 2010; Jackson et al., 2014).

A forma clássica de transmissão do *T. cruzi* para o ser humano é a transmissão vetorial por triatomíneos infectados. O principal vetor do *T. cruzi* é o *T. infestans* que foi controlado em países do cone sul como Chile, Uruguai e Brasil. Atualmente no Brasil, o *Panstrongylus megistus* é o vetor mais importante (revisto em Coura, 2015).

A transmissão oral do *T. cruzi* é atualmente a principal forma de transmissão da DC no Brasil e foi responsável pela ocorrência de surtos da doença na Amazônia, Pará, Santa Catarina, Bahia e ainda, na Colômbia e na Venezuela. Entre 2000 e 2010, mais de 1,000 casos de DC aguda foram diagnosticados no Brasil, sendo 71% associados a transmissão oral (revisto em Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012).

1.1.2. Agente etiológico

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado, pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e gênero Trypanosoma (Levine et al., 1980). Este protozoário apresenta um flagelo similar ao encontrado em outros tripanossomatídeos, que se exterioriza através do reservatório ou bolsa flagelar, sendo o meio pelo qual o parasito ingere nutrientes do meio externo. Seu citoesqueleto é formado por microtúbulos sub-peculiares e participa de processos importantes como a diferenciação dos diferentes estágios evolutivos e motilidade. Seu DNA encontra-se concentrado no cinetoplasto (kDNA) (de Souza, 2002; Dias & Coura 1997).

As três formas evolutivas do parasito possuem características morfológicas diferentes. A forma amastigota possui um curto flagelo de aproximadamente 1 µm de comprimento, e cinetoplasto em forma de barra anterior ao núcleo. Já a forma epimastigotas possui cinetoplasto em forma de disco ligeiramente côncavo, localizado anteriormente ao núcleo. A forma tripomastigota apresenta cinetoplasto

posterior ao núcleo, e seu flagelo pode chegar a 20 μm (Ley et al., 1988; Brener, 1973).

Análises de componentes lipídicos do parasito durante as últimas décadas mostraram que o *T. cruzi*, semelhante à maioria dos fungos, depende do ergosterol para seu desenvolvimento, proliferação e viabilidade celular em todos os estágios evolutivos. Visto que o ergosterol não é encontrado em seres humanos, o mesmo se tornou um potencial alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da DC (revisto em Urbina, 2009).

1.1.3. Ciclo biológico do *Trypanossoma cruzi*

O parasito possui um ciclo de vida complexo, que depende de um hospedeiro invertebrado, ou inseto vetor, e um vertebrado. O inseto vetor adquire as formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Na porção anterior do trato digestivo do triatomíneo o parasita se diferencia na forma epimastigota, que é multiplicativa (divisão binária). Ao atingir a porção posterior do intestino do inseto, o parasita sofre diferenciação para a forma infectante tripomastigota metacíclica. Durante o repasto sanguíneo o vetor defeca liberando junto com as fezes, formas tripomastigotas que podem infectar o hospedeiro vertebrado através de lesão da pele durante o ato de coçar ou através de mucosas íntegras como a conjuntiva (Brener, 1973).

Ao atingir a corrente sanguínea o parasita invade as células do hospedeiro ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo que se funde com endosomas tardios e lisosomas (Woolsey & Burleigh, 2004). Quando há o rompimento do vacúolo, o parasito se diferencia para a forma amastigota, se multiplicando por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Após a multiplicação, se diferenciam para as formas tripomastigotas, infectantes, rompendo a célula hospedeira, sendo capaz de infectar células vizinhas ou se disseminar através da corrente sanguínea ou via linfática (Brener, 1973; Meyer & Oliveira, 1948; revisto em Tanowitz et al., 2009).

O ciclo de vida irá se completar quando o inseto vetor realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo uma pequena quantidade de parasitas que irá se diferenciar em formas epimastigotas na porção média do intestino do inseto. Ao atingir a porção posterior do intestino o parasito se diferencia em formas tripomastigotas metacíclicas, que serão transmitidas ao

hospedeiro mamífero durante um novo repasto sanguíneo (revisto em Tanowitz et al., 2009).

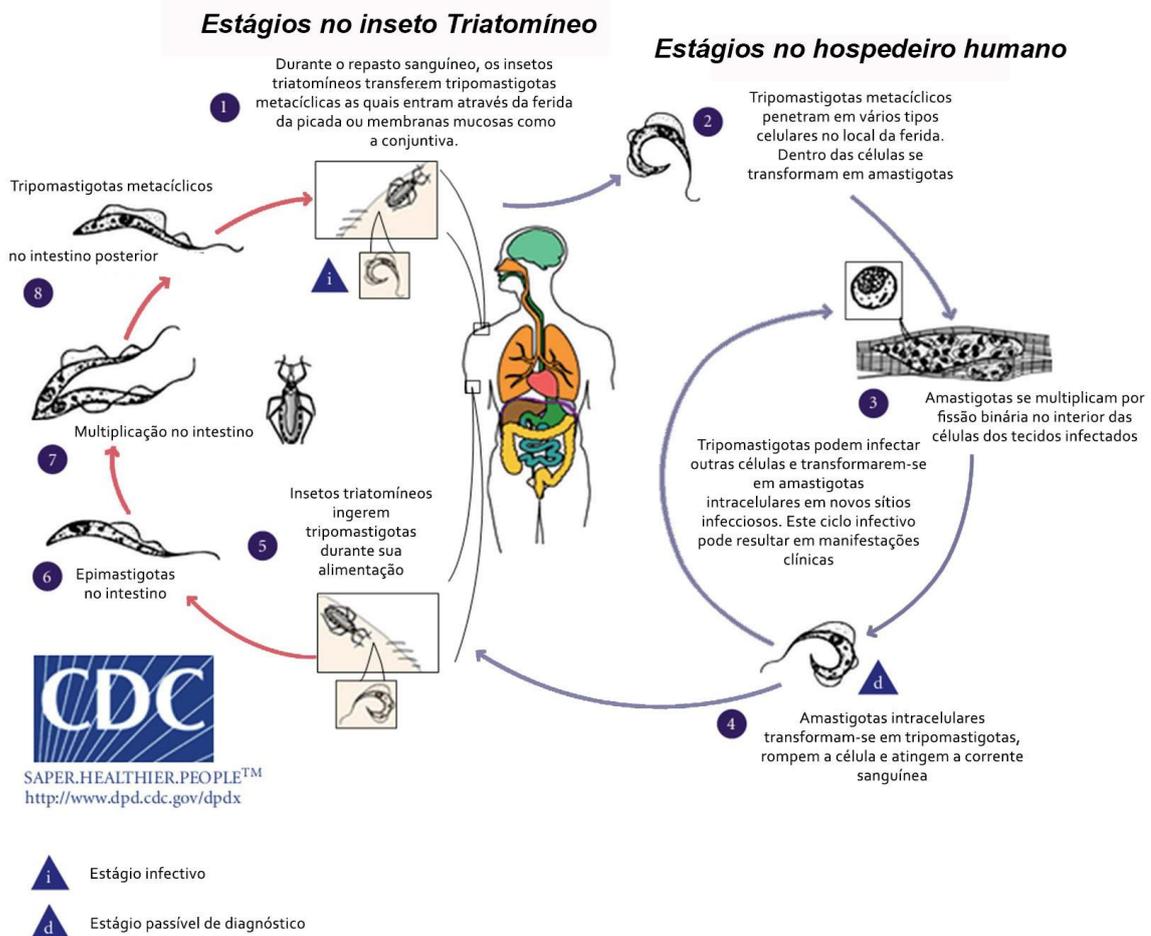


Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.
 Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC)
 (<http://www.cdc.gov/chagas/>).

1.1.4. Fases aguda e crônica da doença de Chagas

A doença de Chagas é dividida em dois estágios clínicos: agudo e crônico. A fase aguda se manifesta de 8 a 10 dias após a infecção, sendo de curta duração. Caracterizada por parasitemia patente, resposta inflamatória de fase aguda, cujos sintomas são: febre prolongada, mal-estar, inchaço do fígado, baço e nódulos linfáticos, e vermelhidão no local da picada do inseto. Passada a fase aguda a doença entra em remissão. A principal causa de morte na fase aguda da doença é a insuficiência cardíaca, no entanto no caso da infecção de crianças e pessoas imunossuprimidas pode ocorrer a manifestação nervosa da doença caracterizada por meningoencefalite (Rassi et al, 2012; revisto em Py, 2011).

A fase crônica pode ser sintomática ou assintomática, seu início ocorre 2 ou 3 meses após a infecção. Caracterizada por parasitemia subpatente e presença de parasitas no tecido e resposta inflamatória crônica de baixa intensidade. Cerca de 60% dos pacientes vão desenvolver a forma crônica indeterminada da doença e aproximadamente 30% dos pacientes crônicos irão desenvolver a forma cardíaca, com complicações como arritmia, tromboembolismo e insuficiência cardíaca. Já a manifestação digestiva ocorre em cerca de 10% dos pacientes de fase crônica, na qual ocorre megacólon ou megaesôfago. O surgimento dos sintomas pode ocorrer de 5 a 15 anos após a infecção (Coura et al, 2010). A associação entre a DC crônica e alterações do sistema nervoso central também vem sendo demonstrada (revisto em Py, 2011) incluindo a ocorrência de acidente vascular cerebral de origem cardioembólica ou não, além de alterações na microcirculação cerebral (revisto em Carod-Artal, 2007; Carod-Artal et al., 2010).

1.2. Quimioterapia para doença de Chagas

1.2.1. Drogas em uso clínico

Desde a descoberta da doença em 1909, várias substâncias foram testadas visando um tratamento eficiente. Os primeiros compostos testados experimentalmente foram o atoxyl (arsênico), a tintura de fucsina, o tártaro emético (antimonial pentavalente) e o cloreto de mercúrio. Todos se mostraram ineficazes (Coura & De Castro, 2002). Em 1967, foram introduzidos na terapêutica os nitrofuranos (Bock et al., 1969), sendo o nifurtimox o mais eficaz. Em 1972, o benznidazol, um derivado 2-nitroimidazólico, foi incluído no tratamento da DC. Atualmente, os pacientes contam apenas com estes dois medicamentos, o nifurtimox e o benznidazol, introduzidos na clínica mais de quatro décadas (Peterson et al., 1979). Durante os anos 80, DoCampo e colaboradores estudaram intensamente o mecanismo de ação de benznidazol e nifurtimox mostraram que a atividade tripanossomicida está ligada à formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos (DoCampo & Moreno, 1984). Para o nifurmitox, a atividade tripanossomicida foi associada ao estresse oxidativo devido a transformação da droga em um nitroânion radical por NTR-II, ciclo redox com oxigênio e produção de ROS (DoCampo & Stoppani, 1979; Moreno et al., 1982). Para o benznidazol, o dano oxidativo não foi considerado mecanismo chave da ação tripanossomicida, uma vez

que a detecção do nitroânion radical correspondente ocorria somente em concentrações muito mais elevadas em relação àquela tripanossomicida. A atividade do benznidazol foi associada à ligação covalente de metabólitos reduzidos do benznidazol a lipídeos, DNA e proteínas (Polak & Richle 1978; Diaz-de-Toranzo et al., 1988). Os diferentes modos de ação podem ser explicados pelo menor potencial de redução de benznidazol em comparação ao nifurtimox, levando a menor taxa de formação do nitroânion radical (DoCampo, 1990; Urbina, 2014).

No Brasil, a produção do nifurtimox foi descontinuada, sendo o benznidazol a principal alternativa de tratamento etiológico da DC. O benznidazol é eficaz principalmente quando utilizado para tratar a fase aguda, apresentando cerca de 70% de taxa de cura mas menos de 20% na fase crônica da doença (Coura et al., 2012). Devido à sua limitada absorção gastrointestinal é necessário a administração de elevadas doses desse fármaco (Lamas et al., 2006), podendo ocasionar efeitos adversos como manifestações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica (revisto em Oliveira et al., 2008). As reações adversas podem levar a interrupção do tratamento antes de completar o esquema terapêutico (Cançado, 2002; Coura & De Castro, 2002).

Nesse contexto, é fundamental o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença, e a busca por novas estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas.

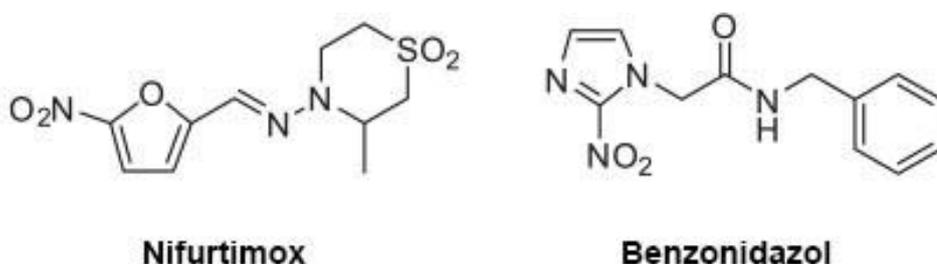


Figura 2. Estruturas químicas de Nifurtimox e Benznidazol.

Reproduzido de Maximiano et al., 2010.

1.2.2. Novas alternativas terapêuticas

Apesar do grande número de compostos avaliados experimentalmente, ainda é um desafio encontrar um tratamento capaz de resultar em cura parasitológica e impedir os danos causados pela progressão da doença. Algumas estratégias

terapêuticas têm se mostrado promissoras em testes pré-clínicos, como os inibidores da biossíntese de ergosterol (Molina et al., 2000; Urbina & Docampo, 2003), derivados nitroimidazólicos (Bahia et al., 2012) e imunomoduladores (Marino et al., 2004; Kroll-Palhares et al., 2008; Waghbi et al., 2009; Vilar-Pereira et al., 2012).

*Uma vez que o *T. cruzi* é dependente de ergosterol, enzimas envolvidas no metabolismo desta molécula têm sido investigadas como potenciais alvos para quimioterapia, há mais de vinte anos (Docampo et al., 1981; Urbina et al., 1988; revisto em Urbina, 2009). A enzima mais bem estudada é a C14 α -esterol demetilase (CYP51), que cataliza a remoção do grupo metil C14 resultando no acúmulo de 14 α -metil esteróis (Lepsheva et al., 2011; Yu et al., 2015). Os estudos de inibidores da CYP51 resultaram em dois compostos triazólicos que foram submetidos a ensaios clínicos de fase II para o tratamento de paciente crônicos: posaconazol - estudos (StopChagas - NCT01377480 e Chagasazol - NCT01162967) e ravuconazol - estudos com E1224 (pró-fármaco do ravuconazol) (NCT01489228) (Torrico, 2013). Contudo, a eficácia destes compostos nas doses e tempos de tratamento testados foi baixa, indicando a necessidade de mais estudos para testar diferentes doses e tempos de tratamento a fim de alcançar os efeitos desejados (revisto em Urbina, 2014 e em Salomão & De Castro, 2017).*

*Derivados nitroimidazólicos são uma classe farmacológica de compostos que possuem atividade contra tripanossomas (Sokolova et al., 2010). Estudos mostram que o fexinidazol possui efeito tanto sobre a fase aguda, quanto sobre a fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*, apresentando efeito sobre cepas resistentes ao benznidazol (Bahia et al., 2012). Além disso, em doses elevadas o tratamento com fexinidazol mostrou ser mais eficaz que o benznidazol sobre a taxa de cura e prevenção da inflamação cardíaca. O fexinidazol foi submetido a testes clínicos de fase II, na Bolívia, para pacientes portadores da doença de Chagas em fase crônica indeterminada. Os resultados foram promissores demonstrando que em doses baixas o composto apresentou alta eficácia, segurança e tolerabilidade aceitáveis (DNDi, 2017).*

*Diversas citocinas e quimiocinas apresentam papel importante na resposta inflamatória durante a infecção pelo *T. cruzi*. Estudos mostram que pacientes infectados apresentam elevados níveis de TGF- β quando comparados a indivíduos saudáveis, além disso, a concentração desse fator se encontra ainda maior em pacientes que possuem a forma cardíaca em comparação a pacientes com a forma*

indeterminada da doença (Araújo-Jorge et al., 2002). O TGF- β tem sido apresentado como potencial alvo terapêutico. O bloqueio via de TGF- β inibe a proliferação e diferenciação de formas intracelulares, como demonstrado em estudos *in vitro* (Waghabi et al., 2007). Já *in vivo*, a inibição da sinalização por TGF- β foi capaz de reduzir a parasitemia, melhorar a sobrevivência e a condução elétrica no coração de camundongos em modelo de DC aguda experimental (Waghabi et al., 2009).

Outra citocina que apresenta potencial como alvo terapêutico é o fator de necrose tumoral (TNF) que também se encontra elevado durante a infecção e está relacionado a gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica (Ferreira et al., 2003; Pereira et al., 2014). O uso da pentoxifilina, um inibidor da síntese de TNF- α , foi capaz de reduzir os sinais de depressão em camundongos C57BL/6 infectados que apresentaram níveis de TNF elevados (Vilar-Pereira et al., 2012). No coração, o tratamento com pentoxifilina em combinação com o benznidazol, reduziu a parasitemia e carga parasitária, diminuiu a expressão gênica de TNF e níveis de TNFR1 e apresentou efeitos benéficos sobre as anormalidades elétricas, sendo capaz de melhorar a função cardíaca (Vilar-Pereira et al., 2016).

1.3. Alterações no sistema nervoso central na doença de Chagas

Apesar da cardiomiopatia ser a principal manifestação clínica da DC alterações no SNC também são observadas. O *T. cruzi* invade células gliais incluindo astrócitos e células da microglia, enquanto que neurônios são raramente infectados (Revisto por Machado et al., 2012). Na fase aguda pode ocorrer a meningoencefalite e na fase crônica podem ocorrer o acidente vascular cerebral e danos cognitivos (revisto por Pittella, 1993; Carod-Artal et al., 2007; revisto por Py, 2011).

1.3.1. Meningoencefalite

A meningoencefalite é uma grave manifestação neurológica da DC que ocorre durante a fase aguda, atingindo principalmente crianças e pessoas imunossuprimidas na reativação da doença, podendo levar à morte dos pacientes (Pittella, 1993; Py, 2011). Análises histológicas de cortes de cérebro humano mostraram encefalite com presença de nódulos inflamatórios compostos por células mononucleares, células da glia e ninhos de *T. cruzi* (Pittella, 1993). Além disso, foi descrito em outro estudo em ratos, que o parasito consegue proliferar em células do sistema nervoso como os astrócitos, e que grande parte dos ninhos e nódulos

inflamatórios estão localizados na substancia cinzenta, provavelmente pela maior densidade capilar da região (da Mata et al., 2000).

Algumas moléculas foram descritas como importantes no desenvolvimento da meningoencefalite na DC. Algumas citocinas, como o TNF, são capazes de romper a barreira hematoencefálica (BHE) (De Vries et al., 1997). Dessa forma, é possível que durante a fase aguda da DC ocorra o rompimento da BHE, já que altos níveis de TNF são produzidos (Revisto por Machado et al., 2012).

*Em modelo experimental da DC foi visto que camundongos C3H/HE infectados pela cepa Colombiana apresentam meningoencefalite apenas na fase aguda da doença, com infiltrado de linfócitos, principalmente células T CD8⁺ não co-localizadas com antígenos de *T. cruzi* (Silva et al., 1999a). Outro estudo mostrou que receptores VLA-4 e VLA-5, fibronectina e laminina podem estar relacionados com a entrada e migração de células inflamatórias no SNC (Silva et al., 1999b). Ainda, utilizando camundongos C3H/HE infectados pela cepa Colombiana foi observado aumento da expressão de VCAM-1 em vasos sanguíneos rodeados por células inflamatórias VLA-4⁺, levando a meningoencefalite durante a fase aguda da DC experimental. Nesse modelo de estudo, experimentos funcionais demonstraram o papel da via VLA-4/VCAM-1 na entrada de células inflamatórias no SNC (Roffê et al., 2003).*

*A BHE compreende células endoteliais, pericitos, membrana basal e astrócitos, tendo as células endoteliais cerebrais, grande importância na regulação da permeabilidade da BHE (Rubin & Staddon, 1999). Uma das células alvo durante a infecção pelo *T. cruzi* são os astrócitos, que são as células gliais mais abundantes no SNC (Da Mata et al., 2000). Utilizando camundongos C3H/He infectados pela cepa Colombiana, susceptíveis à meningoencefalite, o pré-tratamento com IFN γ aumentou a infecção dos astrócitos, apesar de induzir aumento da produção de óxido nítrico (NO). O efeito de aumento da infecção de astrócitos foi bloqueado pelo uso de anti-TNF (anticorpo Infliximab) e parcialmente bloqueado por L-NAME, inibidor de NO, sugerindo que o IFN γ estimula a infecção de astrócitos pelo *T. cruzi*, o que pode contribuir para a persistência do parasito no SNC durante a DC (Silva et al., 2015).*

1.3.2. Acidente Vascular Cerebral

O comprometimento do SNC na DC também está associado a acidentes vasculares encefálicos (Carod-Artal et al., 2007). Fenômenos tromboembólicos ocorrem com frequência nos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, podendo estar relacionados ao acidente vascular cerebral (AVC). Evidências mostram que 17,5% de pacientes com DC apresentam AVC associado com a presença de trombos nas câmaras cardíacas (Aras et al., 2003). No entanto, 25% dos casos de AVC na DC não estão relacionados com o cardioembolismo (Carod-Artal et al., 2005, 2010). Cerca de 38,4% indivíduos assintomáticos mas com moderada disfunção do ventrículo esquerdo, desenvolvem o AVC, podendo ser o AVC isquêmico a primeira manifestação clínica da DC nestes pacientes (Carod-Artal et al., 2011).

Estudos recentes sugerem o envolvimento da resposta imune na isquemia cerebral, incluindo eventos que desencadeiam a interrupção do fluxo sanguíneo vascular, e dano cerebral (Meisel et al., 2005). A resposta imune gerada, mediada por IFN- γ e TNF, pode facilitar a contração e aumento da susceptibilidade do cérebro a isquemia (Faraco et al., 2013). Um importante mediador da disfunção endotelial é o fator de transcrição pro-inflamatório NF- κ B, expresso por células endoteliais e leucócitos, que leva à transcrição de genes pro-inflamatórios como a VCAM-1 e E-selectina (Csiszar et al., 2008). Isquemia cerebral induz a expressão de TNF, IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Maddahi & Edvinsson, 2010). Foi demonstrado que a redução da expressão dos fatores de transcrição GATA-3 e FoxP3, bem como da citocina IL-10 e a alta expressão de IFN- γ , TNF e iNOS, estão associados ao risco aumentado de AVC e morte em pacientes na fase crônica da DC (Guedes et al., 2016).

1.3.3. Dano cognitivo na doença de Chagas

Diversos estudos sustentam a existência de alterações comportamentais em pacientes com a forma crônica da DC (revisto em Silva et al., 2010). Porém, alterações associadas ao aprendizado podem estar relacionadas com o baixo nível de escolaridade, podendo influenciar as interpretações nos estudos em pacientes (Py, 2011). A depressão na DC tem sido associada principalmente com a baixa qualidade de vida em pacientes, apesar de estudos em animais sugerirem um papel

da inflamação no surgimento de sintomas depressivos, tanto na infecção aguda quanto na crônica causada pelo *T. cruzi* (Ozaki et al., 2011)

Citocinas inflamatórias têm sido apontadas como desencadeadoras de comportamento depressivo (Maes et al., 2009). Estudos em modelos experimentais demonstram que a infecção pelo *T. cruzi* resulta em comportamento depressivo induzido por citocina independente da inflamação do SNC. Camundongos C3H/He que são susceptíveis à meningoencefalite, na fase aguda com parasitismo persistente no SNC, bem como camundongos C57BL/6 que são resistentes à inflamação no SNC, quando infectados pela cepa Colombiana apresentaram sinais de depressão nas fases aguda e crônica da DC. O tratamento com inibidor da receptação de serotonina (fluoxetina), ou com benznidazol interrompeu o comportamento depressivo causado pela infecção. Em camundongos C57BL/6 a infecção crônica gerou aumento dos níveis de TNF no soro mas não no SNC. O uso de moduladores de TNF (influximab – anticorpo anti-TNF e pentoxifilina) foi capaz de reduzir sinais de comportamento depressivo na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Vilar-Pereira et al., 2012).

Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pela cepa Colombiana apresentavam sinais de depressão como imobilidade em testes de suspensão de cauda e nado forçado, ansiedade quando submetidos ao teste de labirinto elevado e teste de campo aberto, e comprometimento da coordenação motora no teste de rotarod. Porém estes animais não mostraram dano neuromuscular, nem alteração da temperatura e peso, sugerindo que a depressão observada não estava associada ao “sickness behaviour” (Vilar-Pereira et al., 2015). O “sickness behaviour” corresponde a mudanças psicológicas e comportamentais, como consequência da resposta imune inata associada com infecções por diferentes patógenos ou trauma tecidual (revisito por Dantzer, 2009; Maes et al., 2009).

1.4. Alterações da microcirculação na DC

1.4.1. Alterações microvasculares cardíacas

A patogênese da cardiomiopatia chagásica é resultado de diversos processos fisiopatológicos, levando à disfunção cardíaca apesar da parasitemia reduzida na fase crônica da doença. As lesões microvasculares, constantemente presentes na evolução da DC experimental, têm sido observadas antes do aparecimento de

degeneração ou fibrose miocárdicas significativas (Morris et al., 1989). As alterações microvasculares, como microaneurismas, constrição vascular, agregação plaquetária e formação de trombos, parecem ter papel importante no desenvolvimento das alterações cardíacas (revisto em Rossi et al., 2010). Estudos sugerem que a inflamação de microvasos cardíacos relacionada à infecção pelo T. cruzi induz a síntese de citocinas pro-inflamatórias, moléculas de adesão vascular e moléculas vasoativas como endotelina (ET-1) e tromboxano A₂ (TXA₂) (Petkova et al., 2009; Ashton et al., 2007; Martins et al., 2013).

As alterações de permeabilidade nos capilares cardíacos associadas à congestão, estase e infiltração de células mononucleares e à vasoconstrição, caracterizaram o primeiro sinal de comprometimento microvascular durante a DC experimental (Torres, 1941). Estudo clínico de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica demonstrou redução do lúmen vascular com aumento da espessura da íntima e hipertrofia da média, congestão venosa e dilatação dos capilares no miocárdio, sugerindo que a isquemia pode ser um mecanismo envolvido na progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (Laranja et al., 1956). Estudos experimentais em camundongos mostraram diversas alterações nos vasos coronarianos, como constrição vascular focal, formação de microaneurismas, dilatação e proliferação microvascular (Facto et al., 1985). Necrose miocitolítica focal e difusa e aumento da espessura da membrana basal de capilares e evidências de hipóxia tecidual também foram observadas na DC (Rossi & Carobrez, 1985; Ferrans et al., 1988).

1.4.2. Alterações microvasculares cerebrais

As alterações microcirculatórias cerebrais na DC, descritas em humanos (Carod-Artal et al., 2010) podem ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do AVC. Em modelo experimental de DC aguda nosso grupo demonstrou pela primeira vez, que a infecção pelo T. cruzi leva à diminuição da densidade capilar funcional cerebral, aumenta o rolamento (“rolling”) e adesão de leucócitos nas vênulas cerebrais, resulta na formação de agregados plaquetários. Além disso, a infecção causa disfunção endotelial, como avaliado pela resposta a acetilcolina. Esses resultados sugerem a participação das alterações microvasculares nas manifestações nervosas da DC (Nisimura et al., 2014).

1.5. Interação leucócito-endotélio

No SNC a resposta inflamatória é iniciada no plexo coroide, localizado nos ventrículos cerebrais é o responsável pela formação do líquido cefalo raquidiano (LCR), e o primeiro regulador da resposta imune no SNC. O plexo coroide é formado por uma camada de células epiteliais que formam uma barreira física entre o parênquima do plexo que é altamente vascularizado e o LCR produzido por essas células. Células inflamatória que migram das vênulas para o parênquima do plexo coroide, são impedidas de atingir o LCR pela barreira física de células epiteliais. Durante a neuroinflamação as propriedades dessa barreira são alteradas pela ação de quimiocinas, facilitando a passagem de células imunes residentes para o LCR. Células dendríticas residentes induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos leucócitos dentro do LCR. A partir desse momento, os vasos sanguíneos tornam-se inflamados induzindo uma segunda onda de migração de células imunes, agora, através da BHE (revisto em Pinheiro et al., 2016).

O processo de migração transendotelial de leucócitos através da BHE resulta de uma combinação entre moléculas de adesão celular e de sinalização, expressas tanto pelas células endoteliais do tecido quanto pelas próprias células inflamatórias. Este processo envolve as etapas de rolamento, adesão e diapedese de leucócitos através da camada endotelial das vênulas (Minshall & Malik, 2006; revisto em Pinheiro et al., 2016).

A permeabilidade vascular é regulada por mediadores inflamatórios que são secretados por células ativadas e que atuam também sobre a resposta inflamatória. Dentre os mediadores inflamatórios, as quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão celular e o NO, participam desses processos (Pantoni et al., 1998; McQuaid & Keenan, 1997).

As moléculas de adesão celular mais importantes no endotélio são a VCAM-1, responsável por mediar a adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio vascular, e ICAM-1, importante para estabilização de interações célula-célula e responsável por facilitar a transmigração de leucócitos através do endotélio vascular em processos inflamatórios (Etienne-Manneville et al., 1999; revisto em Barreiro et al., 2002; revisto em Pinheiro et al., 2016). ICAM-1, mas não VCAM-1, é expressa de maneira constitutiva em células em repouso. Ambas as moléculas são

induzidas pela ativação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF (Carlos & Harlan, 1994).

A expressão de ICAM-1 se encontra aumentada no endotélio vascular do SNC de camundongos C3H/He e C57BL/6 durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*. Já a expressão de VCAM-1 no endotélio vascular se encontra aumentada em camundongos C3H/He, mas não em C57BL/6, durante a infecção aguda. Experimentos de bloqueio demonstraram o papel funcional de VCAM-1 e VLA-4 no desenvolvimento da meningoencefalite (Roffê et al., 2003).

Outra importante proteína envolvida na migração e infiltração de células inflamatórias é a proteína quimioatrativa de monócitos MCP-1 (CCL2) (revisto em Pinheiro et al., 2016). Em modelo de DC aguda foi descrito que camundongos knock-out para MCP-1 apresentavam maior número de ninhos de amastigotas, e número reduzido de infiltrado de leucócitos no tecido cardíaco e no fígado quando comparados a animais não infectados. Além disso, macrófagos peritoneais de camundongos knock-out para MCP-1 mostraram atividade tripanossomicida reduzida (Paiva et al., 2009).

1.6. Óxido nítrico e o endotélio vascular

O endotélio vascular sintetiza o óxido nítrico, um mediador com ação vasodilatadora e inibidor da agregação plaquetária, a partir de L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). O NO atua na regulação do tônus vascular, e pressão sanguínea, previne a agregação plaquetária e inibe a proliferação de células musculares lisas da parede vascular. NO participa ainda da geração de ânions superóxido, levando a formação de espécies reativas de oxigênio que estão associadas a alterações vasculares em diversas patologias. No endotélio, encontramos duas formas de NOS, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A eNOS é altamente regulada, constitutivamente ativa e dependente de múltiplos fatores, incluindo Ca^{2+} , fosforilação em múltiplos resíduos e modificações lipídicas pós traducionais. A produção de NO ocorre principalmente a partir do estresse de cisalhamento causado pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais (shear stress). A iNOS é expressa em resposta ao estímulo imunológico e é regulada ao nível transcricional, produzindo altos níveis de NO (Sessa, 2004; Moncada & Higgs, 2006).

Na DC já foi descrito que altos níveis de NO são produzidos pela iNOS, atuando sobre o controle do parasita (Silva et al., 2003). Além disso foi descrito em modelo experimental de DC crônica usando macacos rhesus que altos níveis séricos de NO estão associados à gravidade da cardiomiopatia chagásica (Carvalho et al., 2012). Foi demonstrado ainda, uma redução na expressão e função de eNOS e redução do relaxamento vascular dependente de NO na aorta de animais infectados pelo *T. cruzi* (Silva et al., 2016).

1.7. Estatinas

As estatinas são drogas utilizadas na clínica para hipercolesterolemia, devido a inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima necessária para a biossíntese de colesterol, que catalisa a redução de HMG-CoA para mevalonato. Sendo assim, apresentam efeitos importantes na prevenção de doenças cardiovasculares.

Os primeiros inibidores da biossíntese de esteróis foram descobertos em 1971 em culturas de fungo *Penicillium citrinum*, que produziam uma substância inibidora da biossíntese de colesterol, com capacidade de promover disfunção metabólica na biossíntese de esteróis e/ou isoprenóides em microorganismos que necessitavam desses compostos para o seu crescimento (Endo, 1992).

A mevastatina foi a primeira substância isolada, a partir de *Pythium ultimum*. Devido a sua toxicidade hepática seu desenvolvimento clínico foi interrompido (Endo, 2009). Em seguida, a lovastatina foi isolada de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber*, se diferenciando da mevastatina pela substituição de um grupo metil. A lovastatina se mostrou muito eficaz na inibição da HMG-CoA redutase, e por não apresentar efeitos hepatotóxicos foi aprovada para uso terapêutico pela Food and Drug Administration (FDA) em 1987 (Campo & Carvalho, 2007).

Atualmente contamos com diversas estatinas, tanto de origem natural, quanto modificadas quimicamente. Essa classe de drogas se tornou a mais eficiente na redução dos níveis de colesterol (Liao & Laufs, 2005).

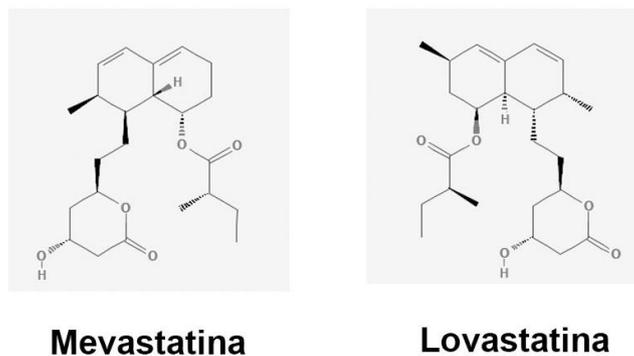


Figura 3: Estruturas químicas de Mevastatina e Lovastatina.

Reproduzido de Banco de Dados de Química – Open Chemistry Database (Pubchem).

1.7.1. Efeitos pleiotrópicos

Estudos recentes mostram que as estatinas além da inibição da síntese do colesterol, possuem efeitos pleiotrópicos, como a melhora da função endotelial, aumento da estabilidade das placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e da inflamação, além de inibir a resposta trombogênica (revisto em Bedi et al., 2016)

As estatinas, inibindo a HMG-CoA redutase, também inibem a síntese de isoprenóides, que funcionam como âncoras de lipídios para a modificação pós-traducionais de diversas proteínas importantes para a sinalização intracelular como proteína G, lamina nucleares e proteínas ligantes de guanosinas trifosfato (GTP), Ras e também Rho, Rab, Rac, Ral e Rap (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997). Dados experimentais mostram evidências de que a inibição da isoprenilação de Rho é responsável por muitos dos efeitos não dependentes de colesterol das estatinas, como ação sobre células da parede vascular (Singh et al., 1999) e sobre leucócitos (Mundy et al., 1999).

O endotélio vascular é importante para regulação da contratilidade da parede vascular controlando o fluxo sanguíneo, na regulação da resistência vascular e na modulação da resposta inflamatória. Uma característica importante da disfunção endotelial é a diminuição da síntese e atividade do NO derivado de endotélio, já que atua sobre o relaxamento vascular (revisto em Liao & Laufs, 2005), inibição da agregação plaquetária (Radomski et al., 1992), proliferação do musculo liso vascular (Garg & Hassid, 1989), e interação leucócito-endotélio (Gauthier et al., 1995).

Estudos mostram que as estatinas são capazes de restaurar a função endotelial antes de alcançarem uma redução significativa nos níveis de colesterol (Anderson et al., 1995; O'Driscoll et al., 1997). Ainda, estatinas são capazes de restaurar a atividade da eNOS na presença de hipóxia, condição que leva à disfunção endotelial (Laufs et al., 1997).

Estudos recentes sugerem que as estatinas possuem propriedades anti-inflamatórias, podendo reduzir o número de células inflamatórias capazes de penetrar no espaço subendotelial para formar placas ateroscleróticas (Vaughan et al., 2000; Ross, 1999). Tal mecanismo ainda não foi completamente elucidado, mas parece estar relacionado à inibição de moléculas de adesão celular como a ICAM-1, envolvida no recrutamento de células inflamatórias (Niwa et al., 1996).

Análise dos dados de testes clínicos utilizando estatinas para o tratamento do acidente vascular cerebral (AVC), mostraram evidências de que as estatinas são capazes de reduzir a frequência do AVC, mesmo quando o evento não está relacionado aos altos níveis de colesterol (Crouse et al., 1998). Esses efeitos benéficos podem estar ligados aos efeitos pleiotrópicos sobre a função endotelial e plaquetária (revisto em Liao & Laufs, 2005).

O tonus cerebrovascular e o fluxo sanguíneo são regulados pelo NO derivado de endotélio. Estudos experimentais utilizando camundongos que não produzem eNOS (eNOS^{-/-}), mostram que esses camundongos apresentam infartos cerebrais mais graves após a oclusão (Huang et al., 1996). Camundongos tratados profilaticamente com estatinas exibiram maior fluxo sanguíneo cerebral e menor área de infarto após a oclusão cerebrovascular. Porém, não foi observado aumento do fluxo sanguíneo cerebral, nem neuroproteção em camundongos que não possuíam eNOS (Endres et al., 1998). Sendo assim, os efeitos benéficos das estatinas sobre o AVC, devem estar relacionados a sua capacidade de regular a expressão e atividade da eNOS (revisto em Liao & Laufs, 2005).

1.7.2. Efeitos na doença de Chagas experimental

*Os efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre a DC vem sendo estudados desde 1993, quando Urbina e colaboradores mostraram que o tratamento com lovastatina quando combinado com cetoconazol era capaz de potencializar os efeitos tripanossomicidas do cetoconazol tanto in vitro quanto in vivo durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.*

Estudos mostraram que o tratamento de cães infectados pelo T. cruzi com sinvastatina, aumentou a parasitemia mas reduziu os níveis de interferon- γ (IFN- γ) e TNF tanto no soro quanto no tecido cardíaco. Obsevou-se redução da inflamação e da fibrose cardíaca durante a infecção aguda e fases iniciais da infecção crônica da DC experimental (Melo et al., 2011). Em outro estudo, foi verificado que o tratamento com sinvastina foi capaz de reduzir a parasitemia, e aumentar a sobrevivência dos animais, além de diminuir o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco e reduzir a expressão de mediadores inflamatórios em modelo experimental de DC aguda em camundongos (Silva et al, 2012).

Foi descrito ainda o efeito da lovastatina sobre formas epimastigotas de T. cruzi nas quais o tratamento, foi capaz de causar lise celular devido a despolarização mitocondrial, aumento da concentração de cálcio no citosol e permeabilização da membrana do reservossoma, um mecanismo referido como “necroptose” (Kessler et al., 2013).

A fim de estudar o efeito in vitro das estatinas sobre a ativação endotelial durante a interação com o T. cruzi, culturas de células endoteliais foram tratadas com sinvastatina e benznidazol antes da interação com o T. cruzi. Ambas as drogas preveniram o aumento da expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, através da diminuição da ativação da via de NF- κ B, mostrando que o tratamento resultou na prevenção da ativação endotelial induzida pela infecção por T. cruzi (Campos-Estrada et al., 2015).

1.8. Justificativa

Cerca de 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo T. cruzi (WHO, 2017). Apesar da cardiomiopatia ser a principal manifestação da doença a meningoencefalite é uma importante manifestação em crianças durante a fase aguda da doença e em pacientes imunodeprimidos em situação de reagudização. Alterações vasculares, incluindo alterações da microcirculação ocorrem no cérebro de pacientes com doença de Chagas (Carod-Artal et al., 2010). Em 2014, nosso grupo demonstrou importante microvasculopatia cerebral, com alteração da microcirculação funcional em modelo experimental de infecção aguda pelo T. cruzi em camundongos. Nesse contexto, é importante a busca de estratégias terapêuticas que possam minimizar os danos causados pelo T. cruzi sobre as alterações

microvasculares cerebrais. As estatinas apresentam efeito tripanossomicida (Urbina et al., 1993) e anti-inflamatório no coração de animais infectados pelo T. cruzi (Silva et al., 2012) e apresentam efeito protetor da microcirculação no cérebro em modelo experimental de malária cerebral (Reis et al., 2012). O benznidazol é a droga referência para o tratamento da DC com potente ação tripanossomicida e é fundamental o entendimento do efeito desta droga sobre a microvasculopatia cerebral. Assim, no presente estudo nos propomos a avaliar no cérebro de camundongos infectados pelo T. cruzi o efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre a microcirculação funcional cerebral e moléculas envolvidas na interação leucócito-endotélio e migração de células inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da lovastatina e do benznidazol sobre a microcirculação cerebral, moléculas envolvidas na migração de células inflamatórias, em modelo experimental de doença de Chagas aguda em camundongo.

2.2 Objetivos Específicos

- 1. Avaliar o efeito do tratamento com lovastatina, benznidazol em monoterapia ou em combinação com lovastatina sobre parâmetros parasitológicos (parasitemia e parasitismo) e clínicos durante a infecção.*
- 2. Investigar o efeito da lovastatina, benznidazol e da combinação das duas drogas sobre a microcirculação funcional cerebral utilizando microscopia intravital.*
- 3. Avaliar o efeito dos tratamentos propostos sobre o fluxo sanguíneo cerebral total através da fluxometria (Laser Speckle).*
- 4. Avaliar o efeito dos tratamentos sobre o infiltrado de células inflamatórias no tecido cerebral através de imuno-histoquímica.*
- 5. Investigar através de Western blot, o efeito da lovastatina sobre a expressão de moléculas envolvidas na inflamação cerebral (MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1) e na função endotelial (eNOS) no cérebro dos animais.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos machos Swiss Webster (18-20 g) foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e após 7 dias de adaptação em estantes com temperatura e umidade controladas, foram inoculados intraperitonealmente com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (Tc II) (Zingales et al., 2009). A eutanásia dos animais foi realizada no 15º dia pós-infecção (dpi), em 8 experimentos independentes, contendo de 3 a 5 animais por grupo. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (Licenças LW-40/13 e L-021/2016).

3.2 Tratamento

Os fármacos utilizados em monoterapia, ou em combinação foram benznidazol (BZ) (Lafepe) e lovastatina (LOV) (Sandoz). O tratamento foi realizado por 14 dias consecutivos, com início no dia seguinte à infecção (1 dpi). As drogas foram administradas nas seguintes doses: 20 mg/kg/dia lovastatina (Silva et al, 2012), 100 mg/kg/dia benznidazol (Olivieri et al., 2002), dose recomendada para animais, 50 mg/kg/dia benznidazol (BZ/2) (Cevey et al., 2015)

e combinação LOV+BZ/2. Os animais foram divididos em dez grupos:

NINT: não infectados e não tratados

NI+LOV: não infectados e tratados com 20 mg/kg/dia lovastatina

NI+BZ: não infectados e tratados com 100 mg/kg/dia benznidazol

NI+BZ/2: não infectados e tratados com 50 mg/kg/dia benznidazol

NI+LOV+BZ/2: não infectados e tratados com 20 mg/kg/dia lovastatina + 50 mg/kg/dia benznidazol

YNT: infectados e não tratados

Y+LOV: infectados e tratados com 20 mg/kg/dia lovastatina

Y+BZ: infectados e tratados com 100 mg/kg/dia benznidazol

Y+BZ/2: infectados e tratados com 50 mg/kg/dia benznidazol

Y+LOV+BZ/2: infectados e tratados com 20 mg/kg/dia lovastatina + 50 mg/kg/dia benznidazol

3.3 Avaliação da parasitemia, peso e sobrevida

A parasitemia foi acompanhada diariamente a partir do 5 dpi segundo o método de Pizzi-Brenner (Brenner, 1962), a pesagem foi realizada 3 vezes por semana e a sobrevida foi monitorada diariamente até 15 dias pós-infecção (dpi). As análises foram realizadas em 8 experimentos independentes com 3-5 animais por grupo experimental.

3.4 Escore clínico

Os animais foram acompanhados clinicamente através de um escore clínico (Reis et al., 2012; Irwin, 1968) no qual foi atribuída uma pontuação de acordo com a resposta do animal aos seguintes parâmetros: alteração das fezes (sólidas ou pastosas = normal, líquida = alterado), lacrimação, fechamento das pálpebras, atividade locomotora (ausência de mobilidade na parte traseira do corpo ao se locomover), temperatura corporal (avaliação de aumento de temperatura de maneira comparativa, através do contato com o dorso da mão do operador), alerta (escape ao toque), força ao agarrar (perda de força ao agarrar na grade da caixa avaliado pela ação do operador em tentar remover o animal), abdômen contraído, alteração na respiração (respirando mais rápido ou mais lento que o normal), piloereção e tônus corporal. Para cada alteração observada foi atribuído um ponto.

3.5 Microscopia intravital

A microcirculação cerebral foi analisada através de microscopia intravital (Microscópio Olympus BX5-1WL, Melville, NY, EUA) do leito vascular cerebral nos animais controle, e infectados em 15 dpi. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) e foi realizada uma craniotomia para a criação de janela craniana. Em seguida, injetou-se 100µl dextran 5% conjugado a FITC pela veia da cauda dos animais para

que o leito vascular pudesse ser analisado. As imagens foram adquiridas com o programa Archimed 3.7.0 e as contagens de capilares espontaneamente perfundidos foram realizadas com oculares em aumento de 100x através do software Saisam (Microvision, França) (Araújo et al., 2012; Nisimura et al., 2014).

Foi quantificado o número de capilares espontaneamente perfundidos (vasos com diâmetro menor que 10 μm). Para cada campo, foi feita a contagem de capilares durante um minuto, obtendo-se ao final o número de capilares por mm^2 . Foram quantificados os capilares que estavam continuamente perfundidos por FITC/dextran e a quantificação foi expressa como densidade capilar funcional média (Araujo et al., 2012; Nisimura et al., 2014).

Utilizando-se injeção de 100 μl de rodamina 6G (0,3 mg/kg) via intravenosa, analisamos o rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas da microcirculação, com aumento de 200x. Três secções de segmentos de vênulas aleatórias (30 a 100 μm de diâmetro e 100 μm de comprimento) foram observadas. Foram considerados leucócitos rolando, aqueles que atravessaram 100 μm em tempo menor do que as hemácias durante 30 segundos de observação (Araujo et al., 2012; Nisimura et al., 2014).

3.6 Fluxometria à laser

A partir da janela craniana descrita acima, foi realizada a avaliação do fluxo sanguíneo cerebral do córtex cerebral através de laser speckle com contraste de imagem – LSCI (Perimed, Estocolmo, Suécia), em o comprimento de onda de 785 nm (Cordovil et al., 2012; Eriksson et al., 2014).

Após a microscopia intravital, com o animal ainda anestesiado, o mesmo foi colocado debaixo do feixe de raios laser a uma distância de 10 cm (recomendada pelo fabricante) entre a superfície cerebral e o emissor de luz laser. As imagens foram analisadas utilizando o software do mesmo fabricante (PIMSoft, Perimed, Estocolmo, Suécia) sendo ajustadas para gravar 16 imagens por segundo.

3.7 Análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina

Apesar do estudo ser focado em 15 dpi, realizamos a análise histológica do cérebro dos animais em 8 (pico da parasitemia), 15 (microvasculopatia e estresse oxidativo no cérebro) (Nisimura et al., 2014) e 22 dpi (presença de fibrose cardíaca) (Oliveira et al., 2012), para a caracterização do modelo de estudo. Os cérebros foram removidos e seccionados pelo plano sagital e congelados em nitrogênio líquido. Foram feitos cortes de 7 µm de espessura utilizando um criostato Leica CM 1850 cryostat (Leica, Wetzlar, Alemanha). As lâminas contendo os cortes foram fixadas em acetona (Merck) resfriada à -20°C por 10 minutos, e depois lavadas duas vezes em PBS (Gibco, LifeTechnologies). Os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer (Hematoxilina 0,1%; Iodato de sódio 0,02%; Alúmen de amônia ou potássio 5%; ácido cítrico 0,1% e Hidrato de Cloral 5%) durante 20 minutos. E desidratados em diluições seriadas de etanol. Posteriormente, foram corados com Eosina-Floxina (Eosina 0,1%; Floxina 0,001%; Ácido acético glacial 0,004% em álcool etílico 95%) durante 2 minutos, lavados rapidamente em álcool 95%, desidratados em banhos de álcool absoluto, clarificadas em banhos de xilol e as lâminas montadas em meio de montagem. As análises foram realizadas através de microscopia de campo claro para avaliação da presença de ninhos e de células inflamatórias (Microscópio Zeiss).

3.8 Imuno-histoquímica

Os cérebros dos animais foram coletados em 15 dpi, congelados em isopentano resfriado por nitrogênio líquido e mantidos em nitrogênio líquido até a utilização. Os cérebros foram seccionados pelo plano sagital em cortes de 7 µm de espessura utilizando um criostato Leica CM 1850 cryostat (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram fixados em acetona (Merck) resfriados à -20°C por 10 minutos, e depois lavados duas vezes em PBS (Gibco, LifeTechnologies) com 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em seguida, foi feito o bloqueio de peroxidase endógena em PBS contendo 3% de peróxido de hidrogênio PA (ProQuimio) e 0,3% de soro de carneiro, por um tempo de 20 minutos à temperatura ambiente e depois lavados duas vezes com PBS. Os receptores Fcγ dos cortes foram bloqueados por 20 minutos com a solução de bloqueio do Kit Impress HRP

anti-rat IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e incubados separadamente com anticorpos primários feitos em rato contra o receptor de superfície F4/80 de macrófagos e células da micróglia (BioLegend, San Diego, CA, EUA) e contra a molécula de superfície CD3 presente em linfócitos (BioLegend, San Diego, CA, EUA), os dois foram usados na concentração de 1:300, por 16-18 horas à 4°C. Após esse tempo, os cortes foram lavados três vezes em PBS e foram colocados na solução contendo anti-IgG de rato, marcada com peroxidase e adsorvida em camundongo, presente no Kit Immpress HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, os cortes foram lavados e revelados utilizando o kit DAB Peroxidase Substrate, 3`3 diaminobenzidine, (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Foram realizados dois experimentos independentes sendo n=3 por grupo experimental. Imagens foram capturadas no microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus fluo-res-cent por com uma câmera digital Zeiss AxioCam HRc e utilizando o programa Axio-vision 4.8.

3.9 Extração e dosagem de proteínas

Cem miligramas de tecido encefálico (tendo sido removido o cerebelo e bulbo olfatório) dos animais foram pesados e adicionados em 1 ml de tampão de lise [Tris HCl 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1% Triton X-100, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoridro (PMSF) em H₂O, pH 7,6] acrescido de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich) seguido por sonicação.

A dosagem de proteínas foi feita através de espectrofotometria utilizando o kit BCA (Thermo Scientific Pierce), conforme as instruções do fabricante. A absorbância do total de proteínas das amostras foi comparada a curva padrão de BSA. Os extratos foram mantidos a -80°C.

3.10 Western Blot

Entre 20 e 100 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra composto por 80 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 12% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0,05% azul de bromofenol, submetidas à ação do temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

(SDS-PAGE) Gel de empacotamento (stacking): 5% Bis/Acrilamida, 0,19M Tris (pH8, 8), 0,2% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% TEMED; Gel de corrida: 10% ou 12 % Bis/Acrilamida; 0,37M Tris (pH6, 8); 0,2 % SDS; 0,1 % persulfato de amônia e 0,04% TEMED). O campo elétrico de 100 Volts foi aplicado sobre esse gel o que separou as proteínas de acordo com seu peso molecular.

Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Para inibir as ligações dos anticorpos com proteínas inespecíficas foi feito bloqueio destas ligações com solução contendo TBST (Tris 50 mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%) e 5% de leite em pó desnatado (Molico) por 1 hora. Como controle interno utilizamos o GAPDH (Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase). Os anticorpos primários foram incubados overnight a 4°C, com excessão do anticorpo anti GAPDH que foi incubado por 1 h a temperatura ambiente, assim como os anticorpos secundários. Todos os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio. As especificações com relação ao uso dos anticorpos encontram-se na Tabela 1. A revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific) e filmes de Raios-X. A densitometria foi realizada com o programa Image Studio Lite Ver 4.0.

Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas no Western blot

	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Concentração de proteína</i>
<i>Anticorpo primário IgG de cabra anti ICAM-1</i>	<i>Abcam</i>	<i>1:1000</i>	<i>20µg</i>
<i>Anticorpo primário IgG de coelho anti VCAM-1</i>	<i>Abcam</i>	<i>1:1000</i>	<i>20µg</i>
<i>Anticorpo primário IgG de coelho anti MCP-1</i>	<i>Abcam</i>	<i>1:1000</i>	<i>20µg</i>
<i>Anticorpo primário IgG de coelho anti eNOS</i>	<i>Abcam</i>	<i>1:1000</i>	<i>100µg</i>
<i>Anticorpo primário IgG de camundongo anti GAPDH</i>	<i>Ambion</i>	<i>1:40000</i>	<i>-</i>
<i>Anticorpo secundário de cabra anti- IgG de coelho conjugado a peroxidase</i>	<i>Thermo Scientific</i>	<i>1:10000</i>	<i>-</i>
<i>Anticorpo secundário de cabra</i>	<i>Thermo</i>	<i>1:10000</i>	<i>-</i>

<i>anti- IgG camundongo conjugado a peroxidase</i>	<i>Scientific</i>		
--	-------------------	--	--

3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste one-way ANOVA (pós teste Tukey) ou teste t não pareado (Mann-Whitney), os valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os cálculos foram realizados utilizando software excel e prisma.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com lovastatina e benznidazol sobre parasitemia, peso e sobrevida

Camundongos Swiss Webster inoculados com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* por via intraperitoneal não tratados (YNT), apresentaram alta parasitemia com o pico ocorrendo no 8 dpi (Figura 4A). No grupo Y+LOV, tratado com 20 mg/kg/dia lovastatina, houve tendência de aumento dos níveis de parasitemia em relação ao grupo infectado e não tratado (YNT), enquanto no grupo infectado tratado com 100 mg/kg/dia, Y+BZ a parasitemia foi zerada (acompanhamento por microscopia de luz). Nos grupos Y+BZ/2 (50 mg/kg/dia BZ) e Y+LOV+BZ/2 a parasitemia foi muito baixa. Observamos uma diminuição no peso dos animais durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em 10 dpi os animais YNT pesavam em média 31,2 g, enquanto que os animais controles pesavam em média 35,5g. Os tratamentos não foram capazes de recuperar o peso dos animais que apresentaram: Y+LOV 30,5 g, Y+BZ 30,9 g, Y+BZ/2 30,4 g e Y+LOV+BZ/2 31,2 g, todos significativamente menores ($p < 0.05$), em relação ao grupo controle não infectado não tratado (NINT). Essa redução no peso dos animais foi mantida até 15 dpi (Figura 4B).

O início da mortalidade ocorreu em 13 dpi e somente 36% dos animais infectados não tratados (YNT) e 40% dos animais infectados tratados com lovastatina (Y+LOV) sobreviveram até 15 dpi (Figura 4C). Os tratamentos com benznidazol nas duas doses utilizadas foram capazes de inibir a morte dos animais e a combinação com lovastatina manteve o efeito do benznidazol.

As análises foram realizadas em 8 experimentos independentes com 3-5 animais por grupo experimental.

4.2 Efeito do tratamento com benznidazol e sua associação à lovastatina sobre sinais clínicos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*

Nossos resultados mostraram que os animais infectados pelo *T. cruzi* não tratados ou tratados com lovastatina, apresentaram alterações clínicas progressivas,

*enquanto animais controle não infectados não tratados não exibiram nenhum sinal de alteração clínica (Figura 5A). Constatamos que não haviam alterações clínicas no pico da parasitemia (8 dpi). As alterações começaram a ser observadas no 9 dpi. No 10 dpi a média da pontuação do grupo YNT foi de 0,5, enquanto a pontuação do grupo infectado tratado com lovastatina foi de 0,8. No 15 dpi os animais YNT pontuavam 3,2 enquanto os Y-LOV pontuaram 3,4. Ou seja, os sinais clínicos desses grupos foram se agravando progressivamente até a morte do animal. Os animais infectados tratados com benznidazol (50 ou 100 mg/kg/dia) e em associação com a lovastatina não apresentaram pontuação (0), ou seja, nenhum sinal de alteração clínica durante a infecção aguda por *T. cruzi*.*

As análises foram realizadas em 8 experimentos independentes com 3-5 animais por grupo experimental.

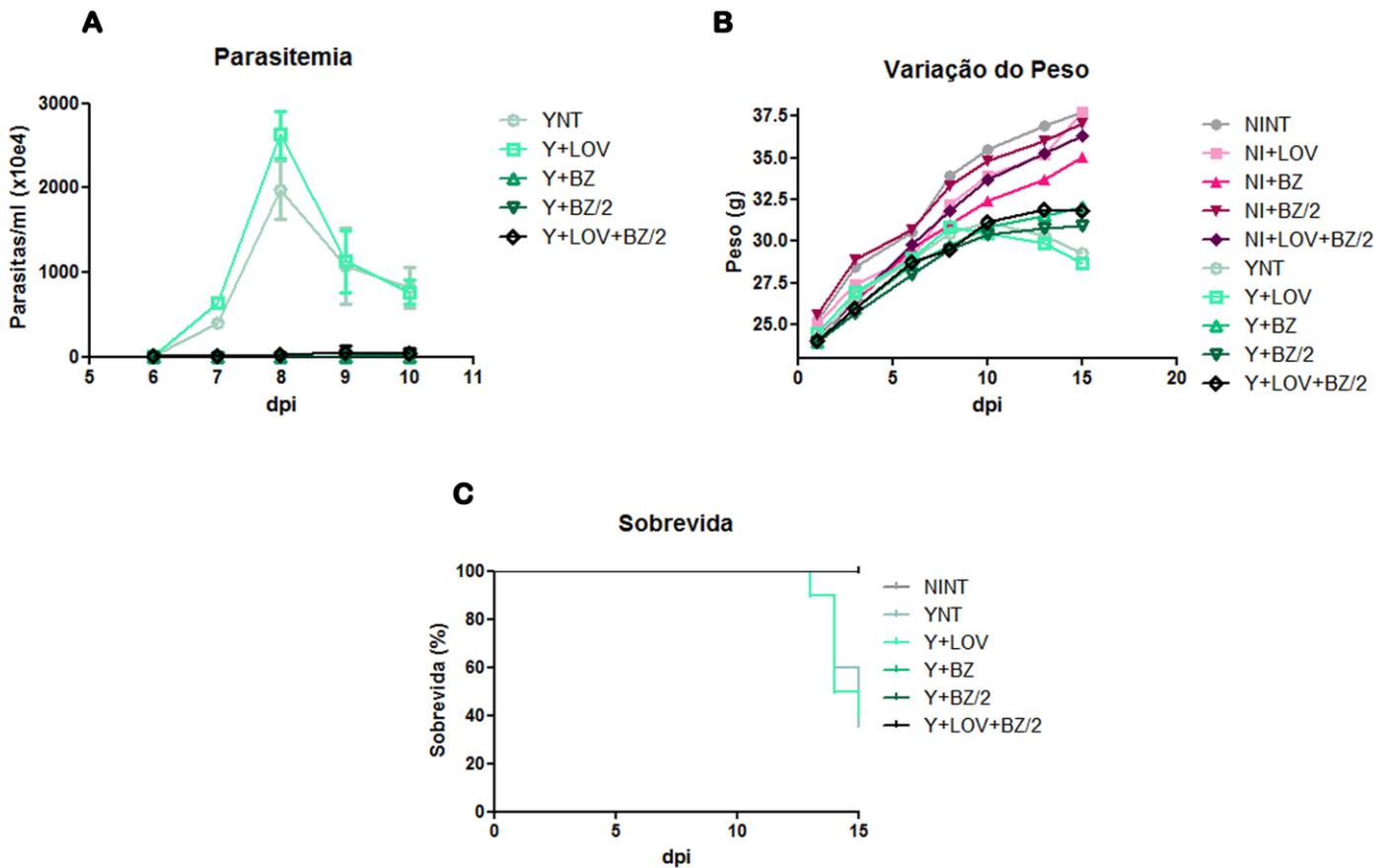


Figura 4: Caracterização do modelo experimental (Swiss Webster/cepaY), mostrando a parasitemia dos animais infectados (A), variação do peso (B) e sobrevida (C). NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 8 experimentos independentes. *One-Way ANOVA*, pós teste: Tukey. n=5/grupo/experimento

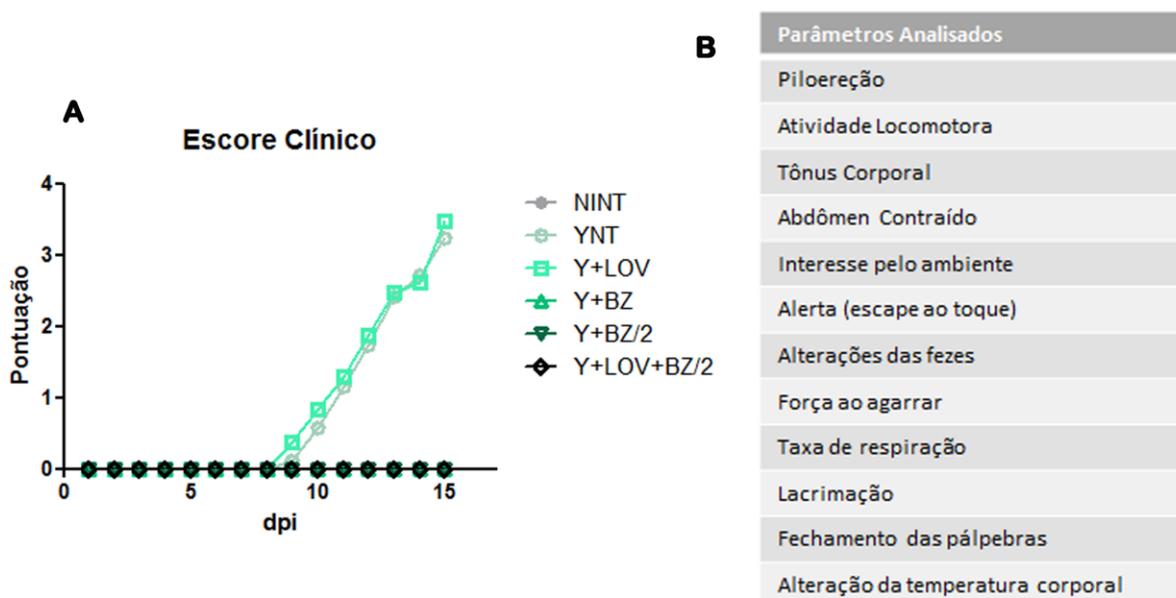


Figura 5: Escore Clínico para caracterização do grau das alterações clínicas. Gráfico da pontuação dos animais (D) e tabela dos parâmetros analisados (E). NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 8 experimentos independentes. *One-way ANOVA*, pós teste: Tukey. n=5/grupo/experimento

4.3 Efeito do tratamento com benznidazol e de sua associação à lovastatina sobre a densidade capilar funcional cerebral durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

A videomicroscopia intravital permite a visualização dos capilares espontaneamente perfundidos marcados por FITC-dextran como pode ser observado na Figura 6 A-F. Nossos resultados (Figura 6G e Tabela 2) demonstraram que os animais infectados não tratados (YNT) apresentaram redução no número de capilares espontaneamente perfundidos no cérebro em 15 dpi (quando comparados ao grupo controle não infectado não tratado (NINT)). Os animais infectados tratados com lovastatina não apresentaram alteração no número de capilares espontaneamente perfundidos quando comparados ao YNT. Esta rarefação capilar funcional não foi observada nos animais infectados tratados com 100 mg/kg/dia benznidazol (Y+BZ), 50 mg/kg/dia benznidazol (Y+BZ/2) (Figura 6E) e 50 mg/kg/dia de benznidazol em associação a lovastatina (Y+LOV+BZ/2) em 15 dpi, sugerindo que benznidazol é capaz prevenir a redução da densidade capilar funcional mesmo quando metade da dose é utilizada. A lovastatina não altera o efeito benéfico do benznidazol sobre este parâmetro, quando em combinação com essa droga.

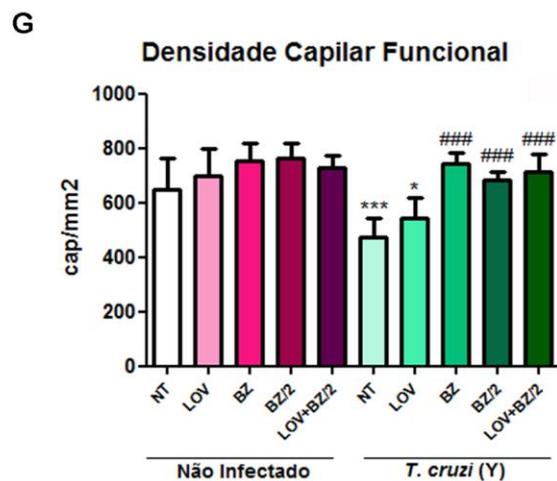
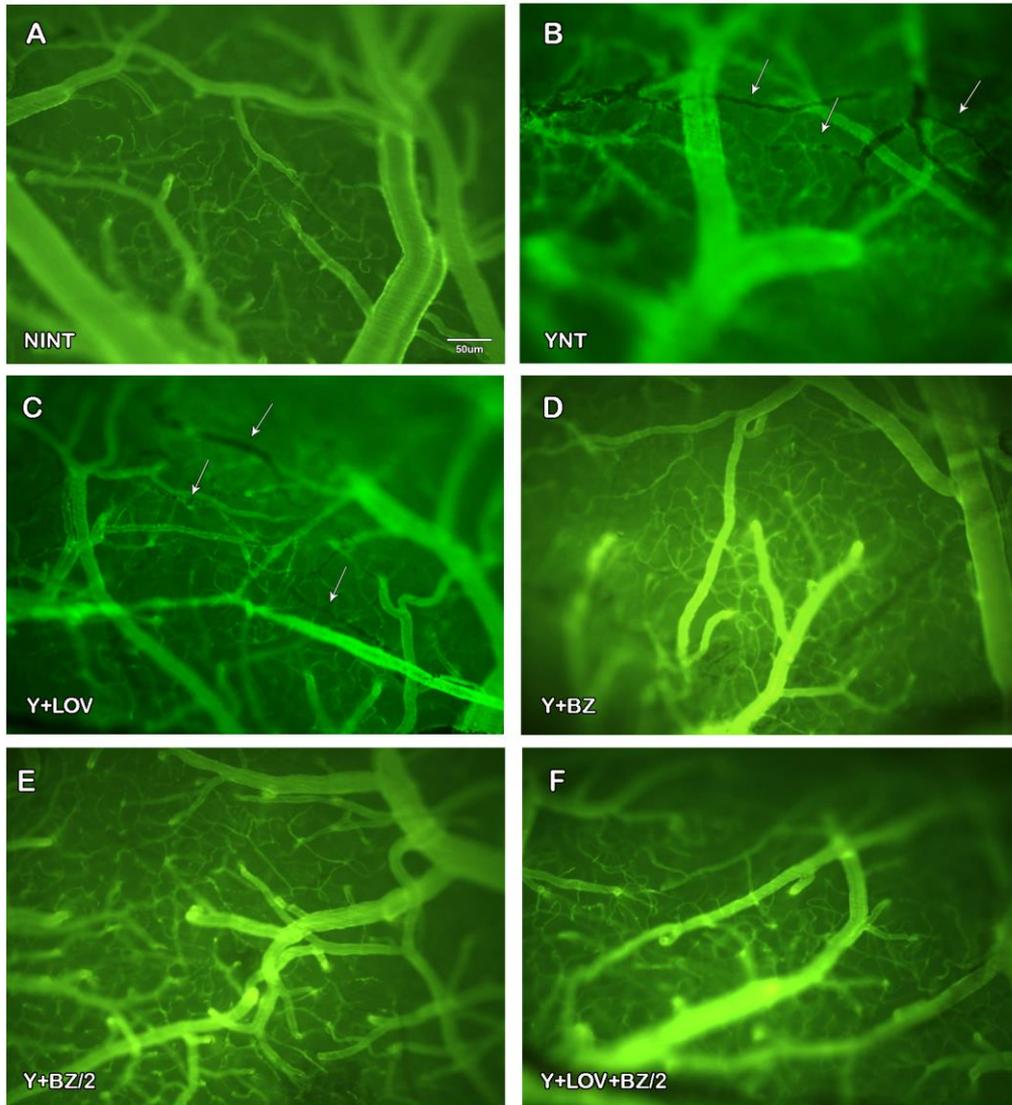


Figura 6: Análise da densidade capilar funcional por microscopia intravital, mostrando os capilares no cérebro dos animais em 15 dpi. Setas indicam capilares não perfundidos. Gráfico indica número de capilares espontaneamente perfundidos (G). NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dia pós infecção. Os dados são apresentados como a média±desvio padrão de 4 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação com NT infectado). * ou #: $p < 0.05$, ** ou ##: $p < 0.01$, *** ou ###: $p < 0.001$. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. n=3-4/grupo/experimento

4.4 Efeito do tratamento com benznidazol e de sua associação com a lovastatina sobre as interações leucócito-endotélio na microcirculação cerebral durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

A análise por microscopia intravital mostrou aumento da interação leucócito-endotélio nas vênulas cerebrais nos animais infectados (Figura 7 A-F). As análises do rolamento de leucócitos (Figura 7G e Tabela 2) demonstraram que o grupo YNT apresentou aumento de cerca de 6 vezes no número de leucócitos rolando nas vênulas quando comparados ao grupo controle NINT. O grupo Y+LOV não apresentou alteração quando comparado ao grupo YNT, porém os grupos Y+BZ, Y+BZ/2 e Y+LOV+BZ/2 apresentaram número reduzidos de leucócitos rolando quando comparados ao grupo YNT, mostrando que estes esquemas de tratamentos foram capazes de impedir o rolamento de leucócitos.

As análises de adesão de leucócitos (Figura 7H e Tabela 2) demonstraram que o número de leucócitos aderidos nas vênulas cerebrais foi superior nos animais YNT, cerca de 12 vezes maior do que no grupo NINT. O grupo Y+LOV e Y+BZ/2 não apresentaram alteração no número de leucócitos aderidos quando comparados a YNT. Já os grupos Y+BZ, Y+LOV+BZ/2 apresentaram redução deste parâmetro quando comparados ao grupo YNT.

Esses resultados sugerem que o tratamento com benznidazol na dose de 100 mg/kg/dia, e 50mg/kg/dia de benznidazol associados a lovastatina são capazes de impedir o aumento tanto do rolamento quanto da adesão leucocitária, que ocorrem em animais infectados pelo *T. cruzi*. Vale ressaltar que apenas o rolamento de leucócitos foi reduzido no grupo Y+BZ/2, mas não a adesão, quando comparado ao grupo YNT, sugerindo que a combinação das drogas, apesar da tendência de redução no grupo Y+BZ/2, é mais eficaz que o tratamento apenas com 50mg/kg/dia do benznidazol sobre a interação leucócito-endotélio.

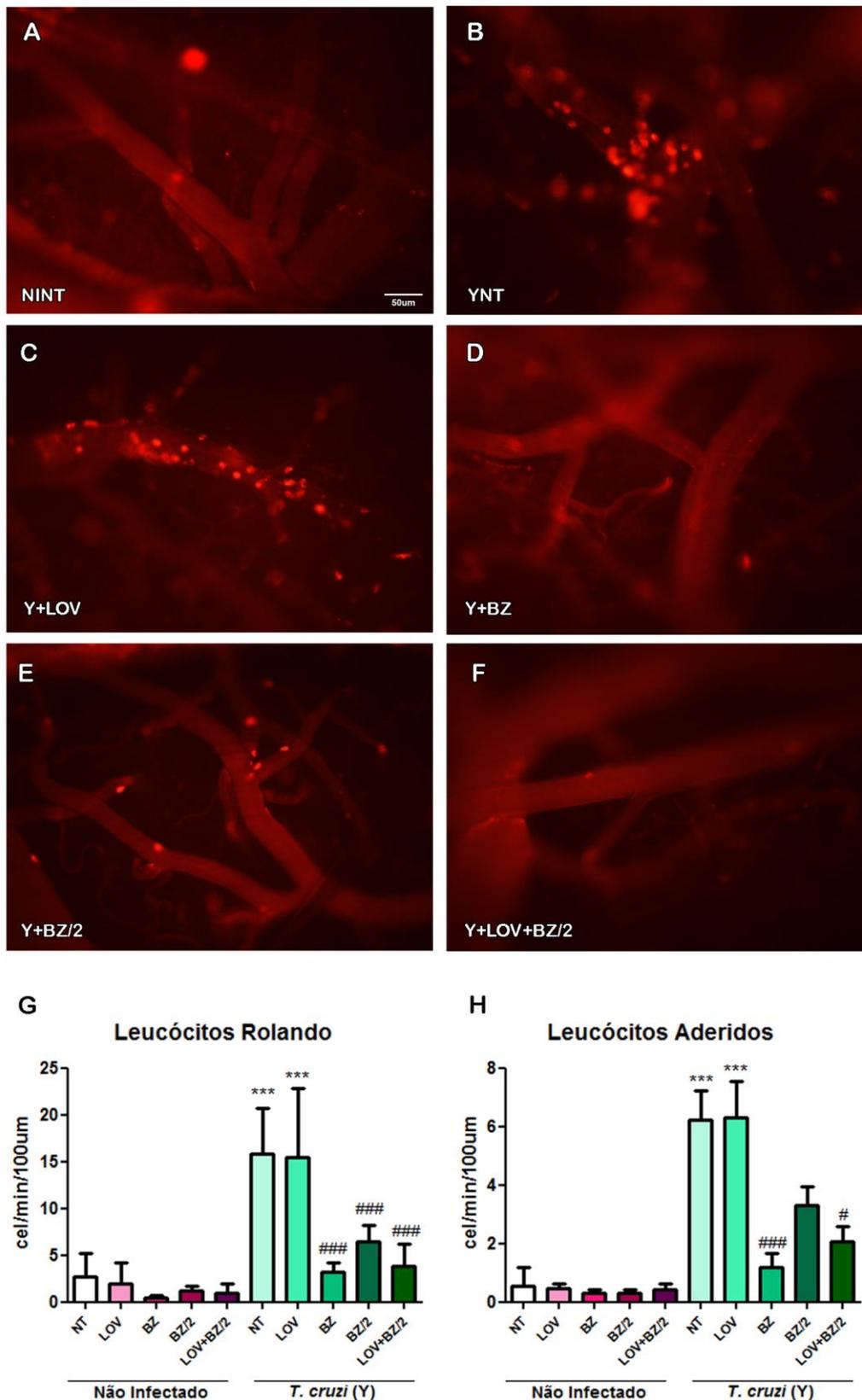


Figura 7: Análise da interação leucócito-endoetelio por microscopia intravital, mostrando a presença de leucócitos nas venulas do cérebro dos animais em 15 dpi. Gráfico indica número de leucócitos rolando (G) e número de leucócitos aderidos (H). NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 4 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação NT infectado). * ou #: $p < 0.05$, ** ou ##: $p < 0.01$, *** ou ###: $p < 0.001$. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. $n = 3-4$ /grupo/experimento

4.5 Resumo dos resultados de microscopia intravital

Tabela 2 - Densidade capilar funcional e interação leucócito endotélio por microscopia intravital 15 dias pós infecção.

Grupos	Número de capilares espontaneamente perfundidos (média ± desvio padrão)	Número de leucócitos rolando (média ± desvio padrão)	Número de leucócitos aderidos (média ± desvio padrão)
NINT	648,8 ± 113,9	2,7 ± 2,5	0,5 ± 0,7
NI+LOV	698,3 ± 98,7	2,0 ± 2,1	0,5 ± 0,7
NI+BZ	752,5 ± 67,2	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,3
NI+BZ/2	762,5 ± 55,5	1,2 ± 0,5	0,3 ± 0,3
NI+LOV+BZ/2	728,7 ± 45,5	1,0 ± 1,0	0,4 ± 0,5
YNT	471,3 ± 73,2 ***	15,8 ± 4,8 ***	6,2 ± 3,6 ***
Y+LOV	543,9 ± 72,2 *	15,5 ± 7,4 ***	6,3 ± 4,2 ***
Y+BZ	742,5 ± 40,5 ###	3,2 ± 1,0 ###	1,2 ± 1,2 ###
Y+BZ/2	682,2 ± 31,0 ###	6,4 ± 1,8 ###	3,3 ± 1,6
Y+LOV+BZ/2	715,7 ± 61,8 ###	3,9 ± 2,4 ###	2,1 ± 1,2 #

* quando comparados a NINT; # quando comparados a YNT sendo * ou # $p \leq 0,05$, ** ou ## $p \leq 0,01$, *** ou ### $p \leq 0,001$

4.6 Efeito do tratamento com benznidazol e sua associação com a lovastatina sobre o fluxo sanguíneo cerebral durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

O fluxo sanguíneo cerebral foi medido através do Laser Speckle, sendo os resultados apresentados como unidades arbitrárias de perfusão (APUs) (Figura 8). Os valores basais do fluxo sanguíneo cerebral total do grupo NINT (Figura 8A) foi $218,1 \pm 34,6$ APUs. Em 15 dpi, foi observada uma diminuição no fluxo sanguíneo cerebral total nos animais YNT (Figura 8B) que chegou a $162,7 \pm 30,7$ APUs. Os grupos Y+LOV e Y+BZ/2 não apresentaram alteração nesse parâmetro quando comparado ao grupo YNT apresentando fluxo sanguíneo de $151,6 \pm 24,7$ e $195,2 \pm 24,5$ APUs, respectivamente. Já os grupos Y+BZ (Figura 8D) e Y+LOV+BZ/2 (Figura

8F) apresentaram maior fluxo sanguíneo cerebral quando comparados ao YNT, ($221,23 \pm 25,70$; $195,19 \pm 24,47$; $224,46 \pm 23,68$), sugerindo que esses tratamentos foram capazes de impedir a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral total nos animais infectados. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão.

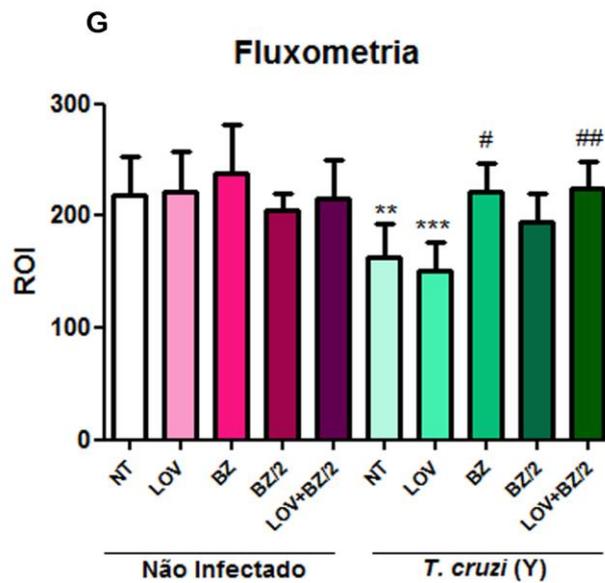
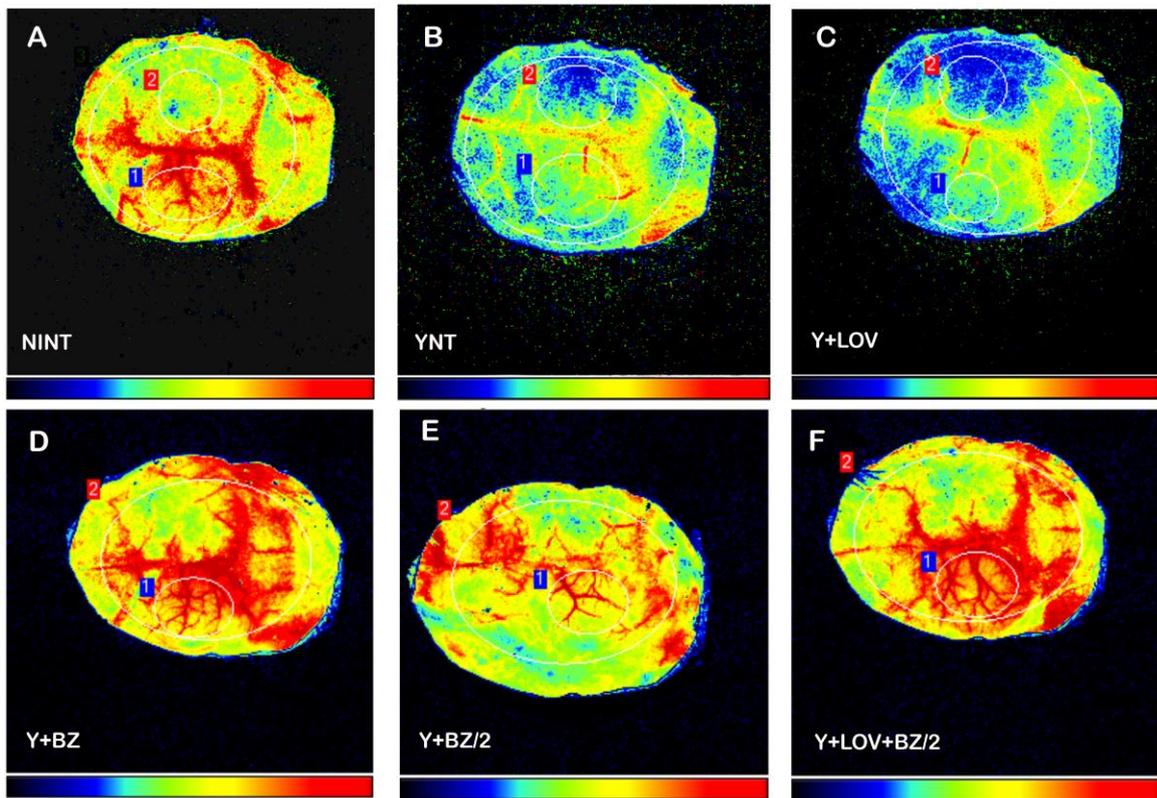


Figura 8: Fluxometria através do Laser Speckle, mostrando o fluxo sanguíneo no cérebro dos animais em 15 dpi. As cores quentes indicam áreas com maior fluxo sanguíneo e cores frias áreas com menor fluxo sanguíneo. Gráfico indica fluxo sanguíneo cerebral através de unidade arbitrária de perfusão (APU) (G). NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação NT infectado). 1 símbolo: $p < 0.05$, 2 símbolos: $p < 0.01$, 3 símbolos: $p < 0.001$. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. $n = 3-4$ /grupo/experimento

4.7 Efeito do tratamento com benznidazol e sua associação com a lovastatina sobre o número de células F4-80⁺ e CD3⁺ no tecido cerebral de animais infectados pelo *T. cruzi*.

O foco do presente estudo foi o dpi 15, por ser o tempo em que ocorrem as principais alterações da microcirculação cerebral na DC aguda experimental (Nisimura et al., 2014). No entanto, para a caracterização do modelo de estudo, realizamos a análise de cortes histológicos corados com H&E do tecido cerebral de animais não infectados e infectados pelo *T. cruzi* em 8, 15 e 22 dpi. Nossos resultados demonstraram a presença de ninhos de amastigotas no 15 dpi (Figura 9D) e a presença de nódulos de resolução com células inflamatórias circundando ninhos de amastigotas em 22 dpi (Figuras 9E e F).

Como observamos aumento do rolamento e adesão de leucócitos nas vênulas cerebrais bem como, a presença de células inflamatórias no cérebro dos animais infectados, procuramos avaliar as populações de células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) no tecido cerebral e o efeito dos tratamentos com lovastatina e benznidazol.

Observamos que a população de células CD3⁺ se encontrava elevada no grupo YNT em 15 dpi (Figura 10B) quando comparado ao controle NINT (Figura 10A). O tratamento com lovastatina resultou em uma tendência de redução do número de células CD3⁺ em relação ao grupo YNT. No entanto, todos os tratamentos que envolveram benznidazol (Figura 10D-F) foram capazes reduzir, de fato, o número de células CD3⁺ quando comparados ao grupo YNT. Mostrando assim, que esses esquemas de tratamento foram eficazes na redução do número de linfócitos no tecido cerebral e que a lovastatina não alterou o efeito do benznidazol.

Ao analisamos a quantidade de células F4-80⁺ verificamos que a infecção pelo *T. cruzi* causa um aumento no número de células F4-80⁺ no tecido cerebral em 15 dpi (Figura 11B) quando comparado ao grupo NINT (Figura 11A). Esse aumento foi prevenido por todos os esquemas de tratamento propostos (Figura 10C-F), mostrando que foram eficazes na redução do número de macrófagos no tecido cerebral e que a lovastatina não alterou o efeito do benznidazol.

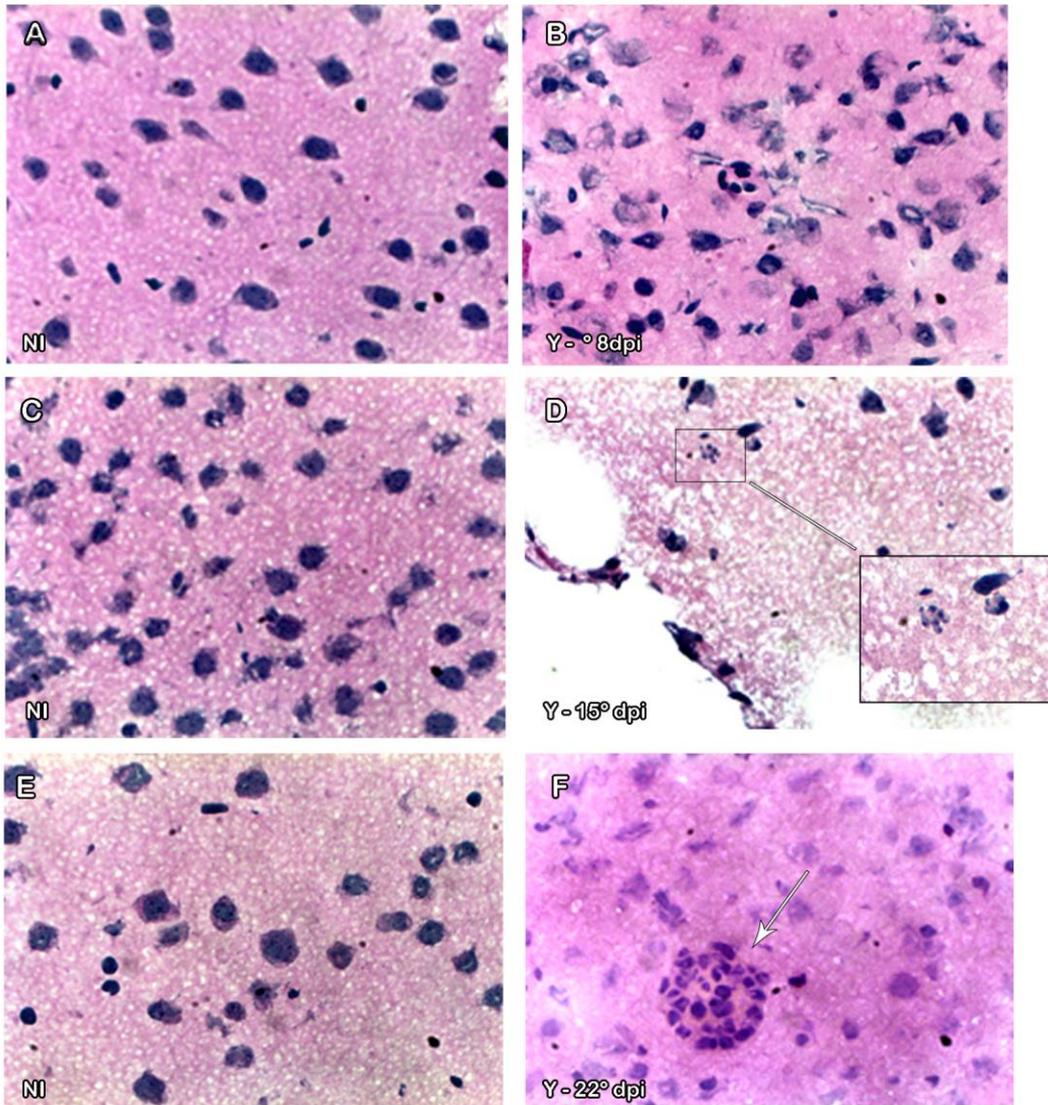


Figura 9: Análise de cortes histológicos do tecido cerebral de animais não infectados (A,C,E) e infectados no 8º(B), 15º, mostrando em destaque a presença de ninhos de parasitas (D) e 22ºdpi, mostrando a presença de nódulo inflamatório em resolução indicado pela seta (F). NI: não infectados, Y: infectados pelo *T.cruzi*. n=3-4/grupo

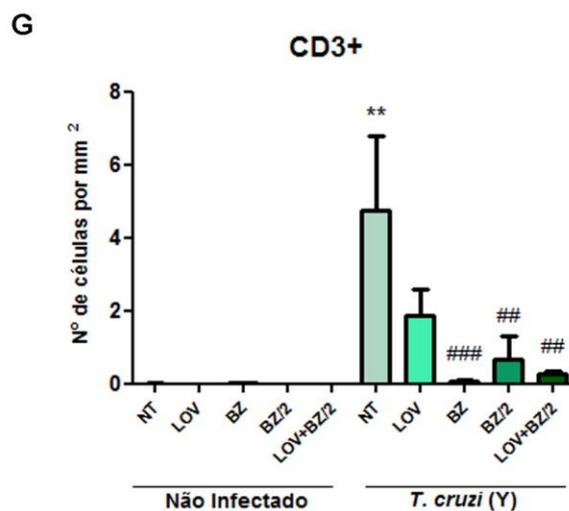
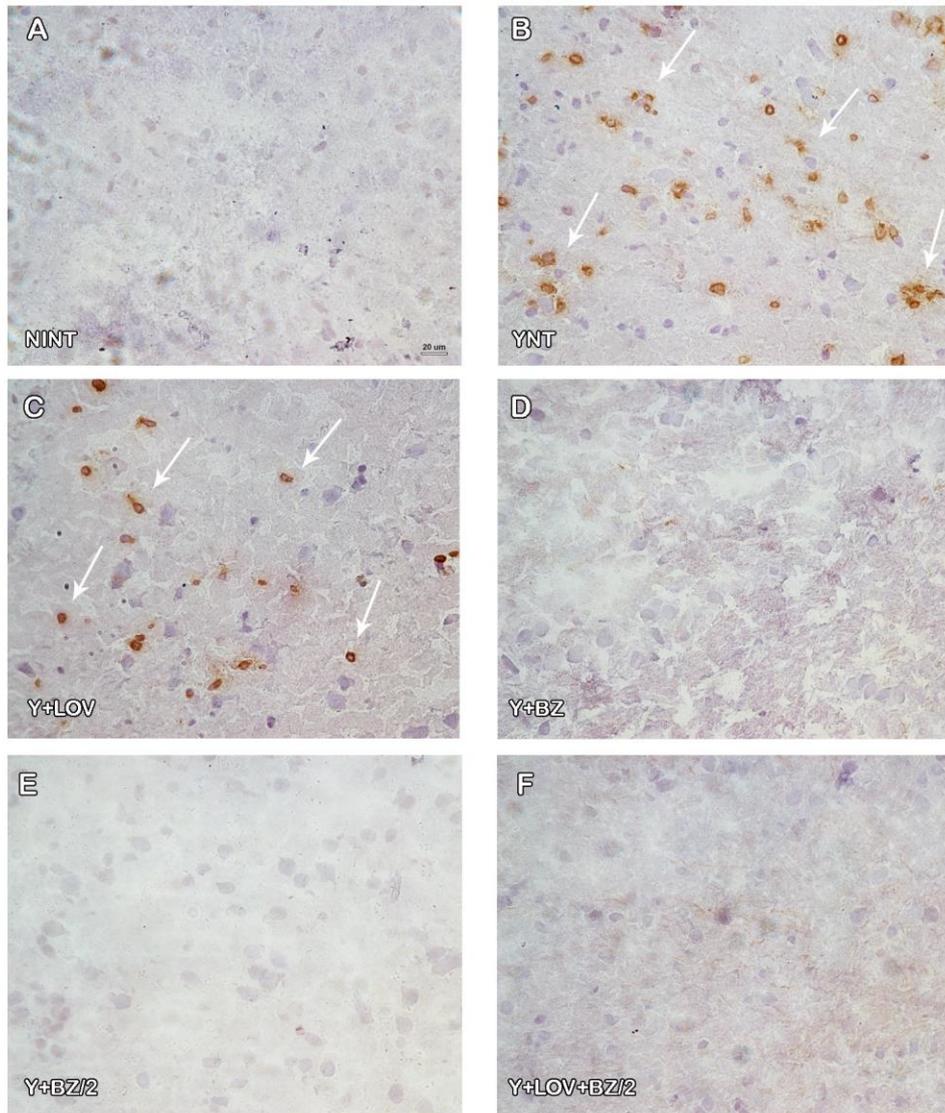


Figura 10: Análise do número de células CD3+ por imunohistoquímica no encéfalo dos animais em 15 dpi (A-F). Gráfico indica o número de células marcadas por mm² (G). A marcação em marrom indicada pelas setas mostra as células CD3+ NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 2 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação NT infectado). * ou #: $p < 0.05$, ** ou ##: $p < 0.01$, * ou ### $p < 0.001$. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. $n = 3$ /grupo/experimento**

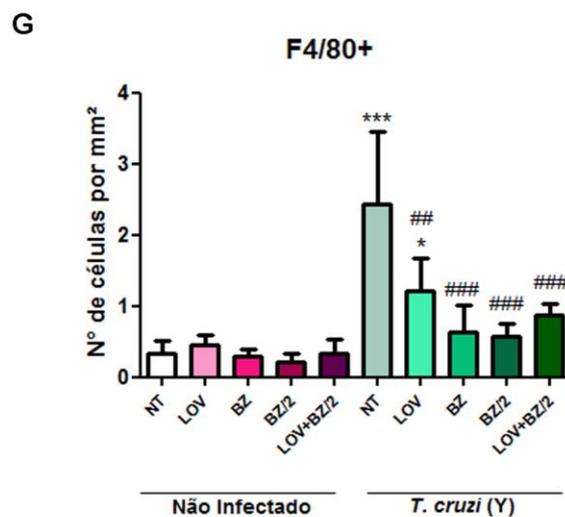
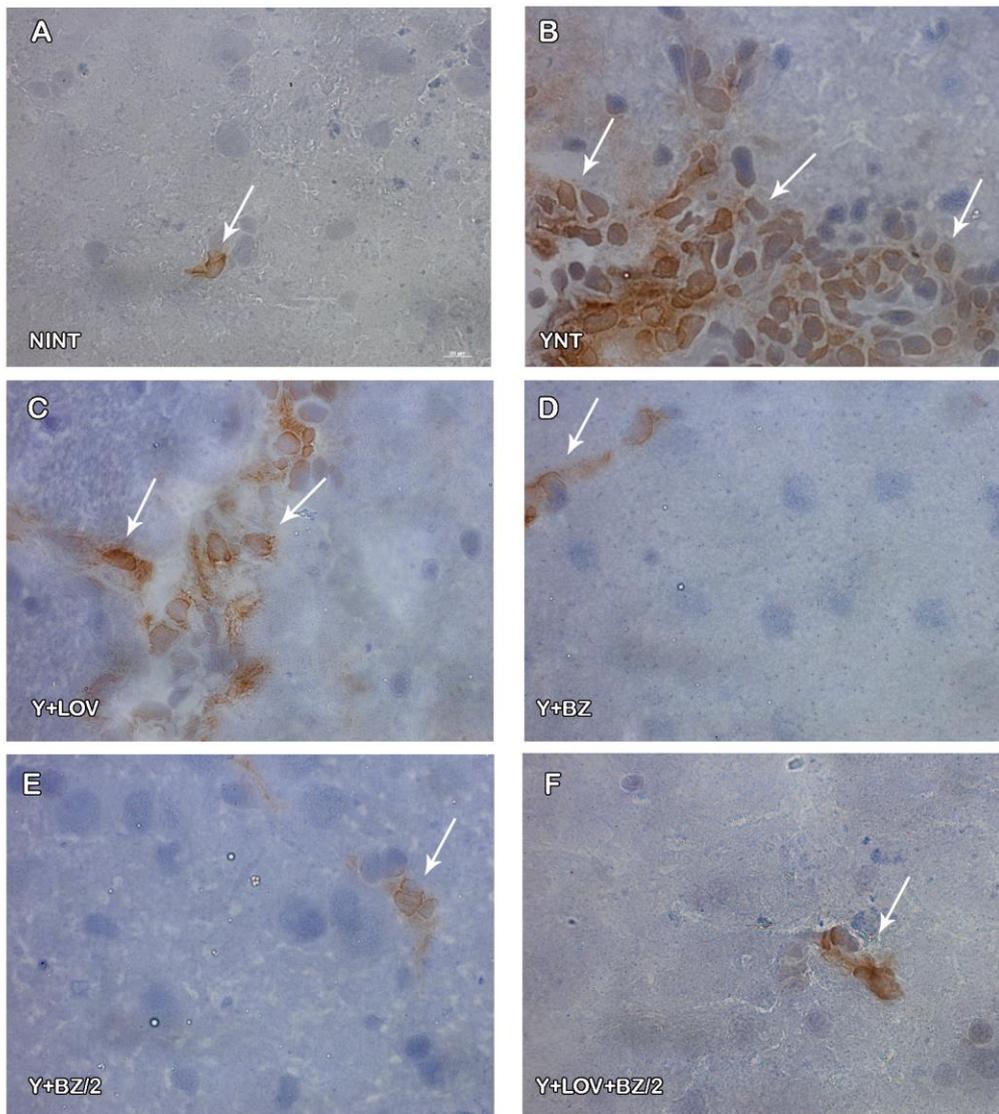


Figura 11: Análise do número de células F4-80+ por imunohistoquímica no encéfalo dos animais em 15 dpi (A-F). Gráfico indica o número de células marcadas por mm² (G). A marcação em marrom indicada pelas setas mostram as células F4-80+ NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, BZ: tratados com benznidazol (100mg), BZ/2: tratados com benznidazol (50mg), dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 2 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação NT infectado). * ou #: $p < 0.05$, ** ou ##: $p < 0.01$, *** ou ###: $p < 0.001$. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. $n = 3$ /grupo/experimento

Tabela 3 - Quantificação de células inflamatórias no tecido cerebral

Grupos	Número de células CD3 ⁺ (média ± desvio padrão)	Número de células F4-80 ⁺ (média ± desvio padrão)
NINT	-	0,3 ± 0,2
NI+LOV	-	0,4 ± 0,1
NI+BZ	-	0,3 ± 0,1
NI+BZ/2	-	0,2 ± 0,1
NI+LOV+BZ/2	-	0,3 ± 0,2
YNT	4,7 ± 4,5 **	2,1 ± 1,2 ***
Y+LOV	1,8 ± 1,3	1,2 ± 0,5 ##
Y+BZ	0,1 ± 0,1 ###	0,6 ± 0,3 ####
Y+BZ/2	0,7 ± 1,5 ##	0,5 ± 0,2 ####
Y+LOV+BZ/2	0,2 ± 0,2 ##	0,9 ± 0,2 ####

* quando comparados a NINT; # quando comparados a YNT sendo * ou # p≤0,05, ** ou ## p≤0,01, *** ou #### p≤0,001

4.8 Efeito do tratamento com lovastatina sobre moléculas envolvidas na interação leucócito-endotélio e na migração de células inflamatórias para o tecido encefálico durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

Uma vez que observamos aumento da interação leucócito-endotélio e aumento do infiltrado de células CD3⁺ e F4-80⁺, avaliamos a expressão das moléculas ICAM-1, VCAM-1 e MCP-1.

A análise da expressão de ICAM-1 (Figura 12A), VCAM-1 (Figura 12B) MCP-1 (Figura 12C) foi realizada por Western Blot. A expressão de ICAM-1 aumentou com a infecção e não reduziu após o tratamento com lovastatina. Observamos uma tendência de aumento na expressão de VCAM-1 em camundongos infectados quando comparado ao controle não infectado em 15 dpi e após o tratamento com lovastatina houve uma tendência de diminuição da expressão dessa proteína. Não verificamos alteração nos níveis de MCP-1 durante a infecção.

Para essa análise foram utilizados n = 3-4 animais por grupo em dois experimentos independentes.

4.9 Efeito do tratamento com lovastatina sobre a expressão proteica da oxido nítrico sintase endotelial no tecido encefálico durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

*Sabendo-se que NO está envolvido na regulação do tônus vascular, e que nesse modelo ocorre disfunção endotelial e estresse oxidativo no cérebro dos animais infectados (Nisimura et al., 2014) buscamos estudar se havia alteração na expressão da eNOS. Enzima responsável pela síntese de óxido nítrico no endotélio e pelo controle do tônus vascular. A análise da expressão da eNOS (Figura 13), foi realizada por Western Blot. A infecção aguda causada pelo *T. cruzi* aumentou a expressão dessa proteína no cérebro dos animais infectados em 15 dpi, no entanto o tratamento com lovastatina não teve efeito sobre essa alteração.*

Para essa análise foram utilizados n=3-4 animais por grupo em dois experimentos independentes.

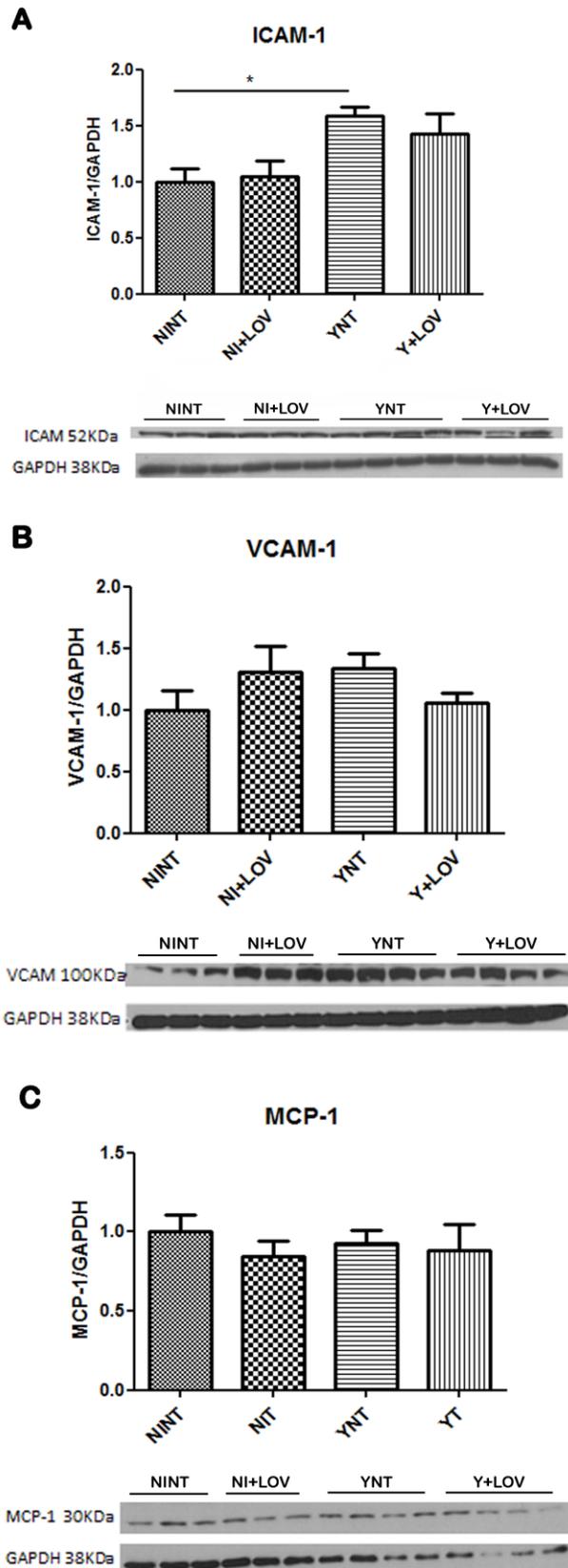


Figura 12: Western Blot do tecido encefálico mostrando o efeito da infecção pelo *T.cruzi* sobre expressão de proteínas envolvidas na migração de células inflamatórias: ICAM-1 (A), VCAM-1 (B), e MCP-1 (C) em 15 dpi. NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes. *One-Way* ANOVA, pós teste: Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ n=3-4/grupo/experimento

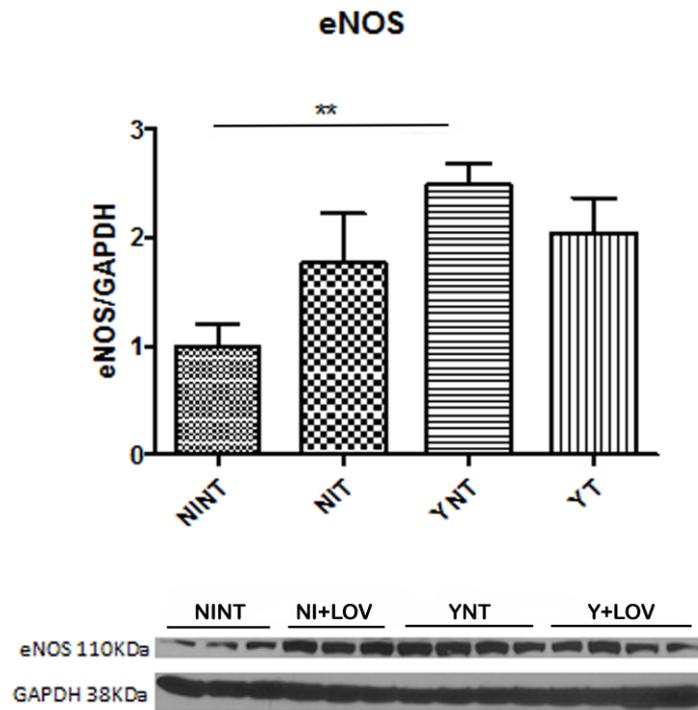


Figura 13: Western blot do tecido encefálico mostrando o efeito da infecção pelo *T.cruzi* sobre expressão da óxido nítrico sintase endotelial em 15 dpi. NI: não infectado, Y: infectados, NT: não tratados, LOV: tratados com lovastatina, dpi: dias pós infecção. Os dados são apresentados como média±desvio padrão de 2 experimentos independentes. One-Way ANOVA, pós teste: Tukey. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, * $p<0.001$**

5 DISCUSSÃO

No presente estudo investigamos o papel da lovastatina (LOV) e do benznidazol (BZ) em monoterapia ou em combinação, sobre a microvasculopatia e inflamação no cérebro de camundongos Swiss Webster durante a infecção aguda com a cepa Y de *T. cruzi*. Avaliamos o número de capilares espontaneamente perfundidos, o fluxo sanguíneo cerebral, a interação leucócito-endotélio (rolamento e adesão), infiltrado inflamatório e expressão de moléculas envolvidas na migração e de células inflamatórias e da enzima eNOS responsável pela produção de NO e controle da função endotelial.

A infecção de animais machos com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y, resultou no pico da parasitemia em 8 dpi e em uma taxa de sobrevivência de 36% em 15 dpi, corroborando resultados prévios de estudos utilizando o mesmo modelo (Menezes, 1968; Nisimura et al., 2014).

Os protocolos de tratamento foram adaptados a partir de estudos prévios do efeito de estatinas e benznidazol bem como de terapias combinadas, durante a fase aguda da DC experimental (Urbina et al., 1993; Silva et al., 2012). Os tratamentos foram iniciados 1 dia após a infecção e mantidos diariamente até 15 dpi.

O tratamento com LOV (20 mg/kg/dia) apresentou uma tendência de aumento na parasitemia e não alterou a sobrevivência dos animais infectados em comparação com os animais infectados não tratados, corroborando os dados de Urbina e colaboradores (1993). Quando o tratamento foi realizado apenas com BZ (50 mg/kg/dia) observamos expressiva redução da parasitemia. A combinação de LOV com BZ (50 mg/kg/dia), também reduziu expressivamente a parasitemia, sugerindo que a lovastatina não alterou o efeito do BZ. Da mesma forma, assim como o tratamento com BZ nas duas concentrações, o tratamento combinado resultou em 100% de sobrevivência dos animais infectados em 15 dpi. Urbina e colaboradores (1993), estudando o efeito da terapia combinada de LOV com cetoconazol, demonstraram que LOV potencializou o efeito de cetoconazol, utilizando o mesmo esquema de tratamento do presente estudo. Uma vez que a menor dose de BZ utilizada no presente estudo, foi capaz de praticamente zerar a parasitemia em 8 dpi e manter 100% dos animais vivos em 15 dpi, estudos utilizando doses menores de

BZ em combinação com LOV na dose utilizada no presente estudo, estão em andamento, para que possamos avaliar um possível efeito sinérgico da LOV.

O tratamento com sinvastatina também na dose de 20 mg/kg/dia em modelo de DC aguda utilizando camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana, ao contrário do observado no presente estudo, foi capaz de reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência dos animais infectados e tratados (Silva et al., 2012).

*Nossos dados demonstraram que o tratamento com BZ em sua dose usual (100 mg/kg/dia) foi capaz de zerar a parasitemia quando realizamos o tratamento abortivo (iniciado com 24 h de infecção), similar ao observado em estudos prévios utilizando o mesmo modelo em que o tratamento foi realizado imediatamente após a infecção (Olivieri et al., 2006; Guedes-da-Silva et al., 2016). Já o tratamento com a metade da dose de BZ (50 mg/kg/dia) resultou em redução expressiva da parasitemia mas não zerou. Trabalhos do nosso grupo utilizando o mesmo modelo experimental, demonstraram que o tratamento com 62,5 mg/kg/dia de benznidazol (Bz) iniciado um dia antes do pico da parasitemia (7 dpi), reduziu mas também não zerou a parasitemia (Olivieri et al., 2002). Em um estudo de fase aguda tardia, o tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa CL do *T. cruzi*, com BZ nas doses de 10 e 30 mg/kg/dia foi capaz de reduzir a parasitemia mas não foi capaz de zerar a mesma, o que foi observado no tratamento com a dose usual de 100 mg/kg/dia (Khare et al., 2015).*

Verificamos também uma redução no peso de todos os animais infectados e não tratados, porém tal redução não foi impedida por nenhum dos tratamentos utilizados. Os animais infectados apresentaram redução no peso entre 10 a 15 dpi, conforme previamente descrito em modelo de infecção aguda pela cepa Y em camundongos Swiss Webster (Garzoni et al., 2004; Waghbi et al., 2009; Nisimura et al., 2014).

A análise de sinais clínicos característicos de infecção aguda foi realizada através da aplicação do escore (Irwin, 1968; Reis et al., 2012). Os sinais avaliados foram alteração das fezes, lacrimação, fechamento das pálpebras, atividade locomotora, temperatura corporal, alerta (escape ao toque), força ao agarrar, abdome contraído, taxa de respiração, piloereção e tônus corporal. Os animais infectados não tratados começaram a apresentar alterações nos parâmetros clínicos em 9 dpi, assim como os animais tratados com LOV. Todos os esquemas de

tratamento envolvendo BZ foram capazes de impedir o aparecimento dessas alterações.

*O presente estudo demonstrou que há alteração na microcirculação funcional cerebral na DC aguda experimental através de microscopia intravital, conforme já descrito anteriormente pelo nosso grupo (Nisimura et al., 2014). Nossas análises mostraram diminuição do número de capilares espontaneamente perfundidos e aumento do rolamento e adesão de leucócitos no cérebro dos animais infectados em 15 dpi. O tratamento com LOV em monoterapia apresentou uma tendência de melhora da densidade capilar funcional mas não teve efeito sobre o aumento da interação leucócito-endotélio induzidos pela infecção, ao contrário do que foi observado em modelo experimental de malária cerebral em camundongos infectados com *P. berghei* (Reis et al., 2012). Neste modelo de malária cerebral o tratamento com LOV na mesma dose utilizada em nosso estudo, foi capaz de reverter os danos microcirculatórios cerebrais, reduzindo a rarefação capilar funcional e reduzindo rolamento e adesão de leucócitos causados pela infecção (Reis et al., 2012). Porém neste estudo, o tratamento foi iniciado após os animais apresentarem sinais clínicos, ou seja, 3 ou 6 dias após a infecção com *P. berghei* o que corresponderia ao 9 dpi no nosso estudo e não 1 dpi. Apesar da LOV ser uma droga com ação anti-inflamatória (Liao & Laufs, 2005), em nosso modelo, não foi capaz de reduzir a inflamação microvascular no cérebro dos animais. Já BZ em ambas as doses utilizadas e em combinação com LOV foi capaz de prevenir a diminuição da densidade capilar funcional e o aumento do rolamento e adesão de leucócitos. O tratamento com 50 mg/kg/dia de BZ em monoterapia apresentou tendência em impedir o aumento da adesão leucocitária induzida pela infecção, porém quando combinado com LOV apresentou uma redução significativa no número de leucócitos aderidos ao endotélio vascular, assim como o tratamento com 100 mg/kg/dia de BZ. Estes resultados sugerem que a combinação com LOV é benéfico capaz de potencializar o efeito da droga tripnocida quando utilizada em dose reduzida.*

Outra metodologia utilizada em nosso estudo foi a fluxometria, que analisa em tempo real o fluxo sanguíneo cerebral através de um equipamento de contraste de imagem a laser denominado laser speckel (LSCI). Essa técnica permite a análise do fluxo sanguíneo em superfícies extensas sem a necessidade de administrar marcadores sistêmicos. O LSCI mede a velocidade média das hemácias, a perfusão

e o comportamento vascular do tecido desejado (Cordovil et al., 2012). Neste estudo, foi possível avaliar pela primeira vez o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em modelo experimental de DC através de LSCL. Observamos uma diminuição no FSC dos animais infectados pelo *T. cruzi* em 15 dpi. Foi ainda, a primeira vez que foi avaliado o efeito de tratamentos quimioterápicos sobre o FSC em animais infectados pelo *T. cruzi*. Apesar da LOV ter efeitos benéficos sobre a função vascular (Liao e Lauf et al., 2005), em nosso modelo esse tratamento não teve efeito sobre a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral induzida pela infecção. Quando combinamos LOV com a dose usual do BZ verificamos que o tratamento foi capaz de prevenir a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral total. O tratamento com metade da dose de BZ em monoterapia não foi capaz de prevenir alterações no fluxo sanguíneo cerebral, apesar de uma tendência de melhora ter sido observada. Sugerindo que a combinação entre as drogas apresenta efeitos benéficos sobre as alterações da microcirculação cerebral. No contexto da DC humana, alternativas que favoreçam a redução da dose usual de BZ poderiam contribuir para a diminuição dos efeitos adversos desta droga, que algumas vezes levam os pacientes a descontinuarem o tratamento (Castro et al., 2006).

Os acidentes vasculares cerebrais que ocorrem devido a infecção pelo *T. cruzi* são principalmente do tipo isquêmico podendo estar associados a arritmias, falha congestiva, aneurisma apical e trombo mural. Porém podem ainda ser independentes da cardiomiopatia (Carod-Artal et al., 2005, 2007). Nesse contexto, uma possível explicação poderia ser o comprometimento da microcirculação, já descrito na DC em humanos (Carod-Artal et al., 2010), e do fluxo sanguíneo cerebral. Apesar de nossos dados demonstrarem através de microscopia intravital, intensa alteração da microcirculação funcional cerebral com aumento de rolamento e adesão de leucócitos e diminuição do número de capilares espontaneamente perfundidos, durante a fase aguda da DC, eles sugerem que a vasculopatia cerebral pode contribuir para as alterações do SNC observadas na DC durante a fase crônica. Nesse sentido, pretendemos futuramente avaliar tais alterações durante esta fase da doença.

A meningoencefalite na DC aguda apesar de rara, é uma importante manifestação principalmente em crianças e pessoas imunossuprimidos (Pittella, 1993). Em humanos caracterizada pela distribuição multifocal de células inflamatórias e pela presença de nódulos inflamatórios em resolução (Pittella, 1993;

*Silva et al., 1999a; Da Mata et al., 2000). Nossos dados de caracterização do modelo de estudo, demonstraram que no tecido cerebral dos animais infectados (ratos) a partir de 15 dpi, é possível observar ninhos de amastigotas e em 22 dpi a presença de nódulos inflamatórios em resolução com células inflamatórias ao redor destes ninhos (Da Mata et al., 2000). Através de imuno-histoquímica, avaliamos em 15 dpi a presença de células CD3⁺ (linfócitos) e F4-80⁺ (macrófagos e células da micróglia) no cérebro dos animais. Verificamos que as duas populações estão presentes em grande quantidade no tecido cerebral de animais infectados. Não observamos células CD3⁺ nos animais não infectados, porém, mesmo que raras, nos animais não infectados, células F4-80⁺ estavam presentes. Já foi descrito que camundongos imunocompetentes C3H/He infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* apresentam infiltrados inflamatórios no tecido cerebral compostos principalmente por linfócitos T CD8⁺, e também por macrófagos e células T CD4⁺ em menor quantidade, durante a fase aguda da infecção (Silva et al., 1999a).*

Nossos dados demonstram que o tratamento com LOV apresenta tendência de redução no número de células CD3⁺, e é capaz de reduzir de maneira significativa o número de células F4-80⁺, corroborando dados da literatura que demonstram ação anti-inflamatória desta droga (Liao & Laufs, 2005). Nossos resultados demonstraram que todos os esquemas de tratamento com BZ foram capazes de reduzir tanto o número de células F4-80⁺ quanto o de CD3⁺, no cérebro dos animais em 15 dpi.

Em modelo de DC aguda foi demonstrado, anteriormente, que BZ na dose de 62,5 mg/kg/dia, próximo a metade da dose, foi capaz de induzir a expansão de esplenócitos CD8⁺, sendo esse aumento ainda maior quando analisado o número de linfócitos T totais no baço dos animais infectados e tratados em 14 dpi (Olivieri et al., 2002). Nossos resultados, no entanto, mostram que em 15 dpi, os tratamentos com BZ diminuíram o número de linfócitos totais no cérebro dos animais em 15 dpi, induzido pela infecção. Nesse estudo de Olivieri e colaboradores (2002), o tratamento foi iniciado em 7 dpi resultando em níveis elevados de parasitemia o que justificaria uma forte resposta inflamatória. Nos nossos esquemas de tratamento as drogas foram administradas após 24 horas de infecção, sendo assim o efeito tripanossomicida do BZ no início da infecção foi abortivo e pode ter inibido a resposta inflamatória consequentemente levado a redução no número de linfócitos e macrófagos no tecido cerebral em 15 dpi.

Uma vez que observamos aumento do rolamento e da adesão de leucócitos, buscamos entender quais moléculas poderiam estar envolvidas na interação leucócito-endotélio. Demostramos que no nosso modelo houve aumento da expressão de ICAM-1 durante a infecção aguda, porém observamos uma tendência de aumento nos níveis de VCAM-1 em animais infectados, e não verificamos alteração na expressão de MCP-1, sugerindo que esta molécula não está envolvida na migração de células inflamatórias para o tecido encefálico em nosso modelo de estudo. Em modelo utilizando camundongos C3H/He e C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana foi descrito na fase aguda foi descrito aumento da porcentagem de vasos sanguíneos positivos para molécula de adesão celular ICAM-1 no cérebro dos animais. Além disso, houve aumento da expressão de VCAM-1 em camundongos C3H/He mas não em C57BL/6. Após estudos funcionais, demonstrou-se uma relação entre a expressão dessa proteína e a meningoencefalite nos camundongos C3H/He (Roffê et al., 2003).

O tratamento com LOV proposto não foi capaz de impedir o aumento da expressão proteica de ICAM-1 durante a infecção aguda pelo T. cruzi, ao contrário do que foi observado em modelo experimental de malária cerebral após o tratamento com LOV, que foi capaz de reduzir a expressão gênica de ICAM-1 em camundongos (Reis et al., 2012). No entanto, observamos uma tendência de redução dos níveis de VCAM-1 nos animais infectados tratados com LOV em comparação ao grupo não tratado.

Nosso grupo descreveu recentemente o comprometimento da função endotelial da microcirculação cerebral durante a DC aguda experimental, no mesmo modelo utilizado em nosso estudo, revelando que a infecção pelo T. cruzi resulta em prejuízo da reatividade vascular a acetilcolina. Os animais apresentavam vasoconstrição em resposta ao estímulo durante a infecção enquanto que os animais controle apresentaram a função endotelial preservada, respondendo ao estímulo resultando em vasodilatação (Nisimura et al., 2014). A acetilcolina tem ação sobre receptores muscarínicos em células endoteliais e musculares lisas levando ao aumento dos níveis cálcio intracelular, que irá ativar a eNOS e a liberação de NO induzindo assim a formação de cGMP em células musculares lisas. O cGMP induz a redução dos níveis de cálcio intracelular e leva ao relaxamento vascular (revisto em Khazaei et al., 2008). Uma vez que nossos resultados mostraram a diminuição da densidade capilar funcional, da função endotelial (Nisimura et al., 2014) e do fluxo

sanguíneo cerebral, buscamos estudar a expressão proteica da eNOS, responsável pela produção de NO no endotélio vascular. Observamos aumento da expressão de eNOS no cérebro dos animais infectados, apesar da diminuição da densidade capilar funcional e diminuição do fluxo sanguíneo cerebral. O aumento na expressão de eNOS durante a infecção, pode ser um mecanismo de feedback positivo, uma vez que recentemente também foi descrito que a infecção pelo T. cruzi resulta em diminuição da resposta a acetilcolina em modelo de aorta isolada e na diminuição da expressão e atividade da eNOS. Observaram redução da fosforilação do sítio ativo da enzima (eNOS^{Ser1177}) e aumento da fosforilação no sítio de inativação (eNOS^{Thr495}) (Silva et al., 2016). Sendo assim, no nosso modelo, apesar do aumento da expressão dessa enzima, é possível que a mesma não esteja sendo ativada e conseqüentemente não produza NO, contribuindo assim para o dano a função vascular.

Apesar da literatura descrever o efeito vasoprotetor de LOV através de sua ação sobre a eNOS em doenças cardiovasculares incluindo AVC (Huang et al., 1996), o tratamento com esta droga, no presente estudo, resultou em uma tendência de diminuição dos níveis dessa enzima, no tecido cerebral dos animais infectados. A análise do efeito combinado com BZ está em andamento.

Sendo assim, os dados pré-clínicos do presente estudo sugerem que BZ protege a microcirculação cerebral durante a infecção aguda pelo T. cruzi quando usado em monoterapia ou em combinação com LOV. Além disso, nossos dados que demonstraram tendência de melhora em alguns dos parâmetros avaliados quando a LOV foi utilizada em monoterapia, apontam para a necessidade de análise estatística mais detalhada para a elaboração de uma estratégia experimental que confirme ou não essa tendência.

6 CONCLUSÕES

De acordo com nossos dados concluímos que:

- 1. Os tratamentos com BZ em monoterapia e em combinação com a LOV foram capazes de reduzir a parasitemia nos animais, ao contrario do tratamento com LOV em monoterapia, que apresentou tendência de aumento nos níveis de parasitas circulantes.*
- 2. O tratamento abortivo com BZ na dose usual, metade da dose e em combinação com a LOV, impediu o surgimento dos sinais clínicos, mas não foi capaz de impedir a perda de peso nos animais infectados.*
- 3. BZ em monoterapia foi capaz de inibir a rarefação capilar funcional observada nos animais infectados e a LOV quando em terapia combinada não alterou o efeito do BZ. O tratamento dos animais infectados apenas com LOV apresentou tendência de aumento da densidade capilar funcional.*
- 4. Os tratamentos com BZ em monoterapia e em combinação com a LOV reduziu o rolamento de leucócitos na microcirculação cerebral de animais infectados. Já o tratamento apenas com LOV não teve esse efeito.*
- 5. O tratamento com BZ reduziu a adesão de leucócitos, verificada nos animais infectados, apenas quando sua dose usual foi utilizada. O mesmo foi observado utilizando o tratamento combinado. Quando foi utilizada metade da dose de BZ, foi observada uma tendência de redução da adesão leucocitária e o tratamento com LOV em monoterapia não alterou esse parâmetro.*
- 6. BZ em sua dose usual, assim como a teria combinada, impediu a redução do fluxo sanguíneo cerebral nos animais infectados. O tratamento com metade da dose de BZ apresentou tendência de melhora, e o tratamento com LOV em monoterapia não foi capaz de impedir essa alteração.*

7. *No modelo Swiss Webster infectado pela cepa Y, a infecção aguda pelo T. cruzi resulta na presença de ninhos de amastigotas e de células inflamatórias no tecido encefálico dos animais.*
8. *A infecção aguda pela cepa Y do T. cruzi induz a migração de células CD3+ para o tecido encefálico de camundongos. Os diferentes tratamentos com BZ em monoterapia reduziram o número de células CD3+. Quando utilizado a terapia combinada a LOV não alterou o efeito do BZ. Já o tratamento com LOV em monoterapia apresentou uma tendência de redução no número dessas células.*
9. *Todos os tratamentos utilizados, inclusive o tratamento com LOV em monoterapia, foram capazes de inibir o aumento de células F4-80+ observado nos animais infectados.*
10. *A infecção pelo T. cruzi foi capaz de induzir aumento nos níveis de ICAM-1 e apresentou uma tendência de aumento de VCAM-1, mas não de MCP-1 no tecido encefálico de camundongos. O tratamento com LOV não foi capaz de alterar os níveis de ICAM-1, mas apresentou tendência de diminuição dos níveis de VCAM-1 em animais infectados quando comparados ao controle não tratado.*
11. *A infecção pelo T. cruzi causa aumento nos níveis de eNOS no tecido encefálico de camundongos, sendo o tratamento com LOV incapaz de alterar os níveis de eNOS.*

Finalmente, concluímos que o BZ em monoterapia ou em combinação com LOV protege a microcirculação cerebral e inibe a migração de células inflamatórias para o SNC. Os resultados obtidos para o tratamento com LOV em monoterapia ainda precisam ser analisados de maneira mais aprofundada para esclarecer as tendências de melhora observadas em alguns dos parâmetros avaliados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *New Engl. J. Med.* 332:488–93, 1995.

Aras R, da Matta JA, Mota G, Gomes I, Melo A. Cerebral infarction in autopsies of chagasic patients with heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 81(4):414-6, 411-3, 2003.

Araújo CV, Estado V, Tibiriçá E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR gamma activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res.* 84(2):218-21, 2012.

Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Mde L, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardial pathology. *J Infect Dis.* 186(12):1823-8, 2002.

Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreale E, Ribeiro I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1870, 2012

Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 157(7):1233-45, 2002

Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P. Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389(7):695-712, 2016.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27:347-82, 1973.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosomacruzi*. *Rev Inst Med Trop.* 4:389-96, 1962.

Campo VL, Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova.* 30 (2), pp. 425-430, 2007.

Campos-Estrada C, Liempi A, González-Herrera F, Lapier M, Kemmerling U, Pesce B, Ferreira J, López-Muñoz R, Maya JD. Simvastatin and Benznidazole-Mediated Prevention of Trypanosoma cruzi-Induced Endothelial Activation: Role of 15-epi-lipoxin A4 in the Action of Simvastatin. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(5):e0003770, 2015.

Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 44(1):29-37, 2002.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1;84(7):2068-101, 1994.

Carod-Artal FJ, Ribeiro Lda S, Vargas AP. Awareness of stroke risk in chagasic stroke patients. *J Neurol Sci*. 263(1-2):35-9, 2007.

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Falcao T. Stroke in asymptomatic Trypanosoma cruzi-infected patients. *Cerebrovasc Dis*, 31(1):24-8, 2011.

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Horan TA, Nunes LG. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas disease. *Stroke*. 36(5):965-70, 2005.

Carod-Artal FJ. Trypanosomiasis, cardiomyopathy and the risk of ischemic stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 8(5):717-28, 2010.

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 25(8):471-9, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <http://www.cdc.gov/chagas/> acessado dia 18 de Fevereiro de 2017 as 10:40.

Cevey AC, Mirkin GA, Penas FN, Goren NB. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent Trypanosoma cruzi strain. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 12;6(1):12-22, 2015.

Chagas C. Nova tripanozoniase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1(2):159-218, 1909.

Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Köhler O, de Moraes R, Tibiriçá E. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res.* 83(3):376-9, 2012.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45(3):286-96, 2012.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115(1-2):5-13, 2010.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1):3-24, 2002.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 110(3):277-82, 2015.

Crouse JR, Byington RP, Furberg CD. HMG-CoA reductase inhibitor therapy and stroke risk reduction: an analysis of clinical trials data. *Atherosclerosis.* 138:11–24, 1998.

Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *J Appl Physiol.* 105(4):1333-41, 2008.

Da Mata JR, Camargos MR, Chiari E, Machado CR. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull.* 53(2):153-62, 2000.

Dantzer R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America.* 29(2):247–264, 2009.

de Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* 1(1):3, 2002.

De Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol.* 49:143–155; 1997.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 29(6):313-26, 2009.

Diaz-de-Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44:880-1, 1988.

DNDi. <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>, acesso 18/04/2017.

Docampo R, Moreno SN, Turrens JF, Katzin AM, Gonzalez-Cappa SM, Stoppani AO. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1981;3(3):169-80, 1981.

Docampo R, Moreno SN. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis*. 1984 Mar-Apr;6(2):223-38.

Docampo R, Stoppani AOM. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197: 317-21, 1979.

Docampo R. Sensitivity of parasite to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical-Biological Interactions*, 73:1-27, 1990

Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*. 33(11):1569-82, 1992.

Endres M, Laufs U. HMG-CoA reductase inhibitor and risk of stroke. *Nervenarzt*. 69(8):717-21, 1998.

Eriksson S, Nilsson J, Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Med Devices (Auckl)*. 7:445-52, 2004.

Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, Couraud PO. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF- α secretion. *J Immunol*. 163(2):668-74, 1999.

Factor SM, Cho S, Wittner M, Tanowitz H. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 34(2):246-53, 1985.

Ferrans VJ, Milei J, Tomita Y, Storino RA. Basement membrane thickening in cardiac myocytes and capillaries in chronic Chagas' disease. *Am J Cardiol.* 1;61(13):1137-40, 1988.

Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(3):407-11, 2003.

Flávia Pires Maximiano, Guilherme Hideki Yoshizane Costa e Jacqueline de Souza. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol *Quim. Nova,* 33(8): 1714-1719, 2010.

Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 43(3):532-41, 1999.

Francisco Javier Carod-Artal a Antonio Pedro Vargas b Thiago Falcao Stroke in Asymptomatic *Trypanosoma cruzi* -Infected Patients. *Cerebrovasc Dis* 2011;31:24–28

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 83(5):1774-7, 1989.

Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KT. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside. *Exp Neurol.* 263:235-43, 2015.

Garzoni LR, Caldera A, Meirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E, Urbina JA. Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 23(3):273-85, 2004.

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(10):1652-9, 1995.

Guedes PM, de Andrade CM, Nunes DF, de Sena Pereira N, Queiroga TB, Machado-Coelho GL, Nascimento MS, Do-Valle-Matta MA, da Câmara AC, Chiari E,

Galvão LM. *Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients*. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(4):e0004669, 2016.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, Meuser MB, Demarque KC, Fulco TO, Araújo JS, Da Silva PB, Da Silva CF, Patrick DA, Bakunova SM, Bakunov SA, Tidwell RR, Oliveira GM, Britto C, Moreira OC, Soeiro MN. *In Vitro and In Vivo Trypanosomicidal Action of Novel Arylimidamides against Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 60(4):2425-34, 2016.

Hall A. *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. *Science* 1998 279:509–14

Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. *Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine*. *J Cereb Blood Flow Metab*. 16(5):981-7, 1996.

Irwin S *Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse*. *Psychopharmacologia*. 13: 222–257, 1968.

Jorg ME, Zalazar Rovira I. *Encephalopathic forms of chronic Chagas disease seen in Argentina*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 76(4):353-60, 1981.

Julio Urbina. *Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62: 149–156, 2014.

Khare S, Liu X, Stinson M, Rivera I, Groessl T, Tuntland T, Yeh V, Wen B, Molteni V, Glynn R, Supek F. *Antitrypanosomal Treatment with Benznidazole Is Superior to Posaconazole Regimens in Mouse Models of Chagas Disease*. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(10):6385-94, 2015.

Khazaei MR, Habibi-Rezaei M, Karimzadeh F, Moosavi-Movahedi AA, Sarrafnejhad AA, Sabouni F, Bakhti M. *Microglial cell death induced by glycated bovine serum albumin: nitric oxide involvement*. *J Biochem*. 144(2):197-206, 2008.

Kroll-Palhares K, Silvério JC, Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, Carvalho CM, Pinto LM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. *TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during Trypanosoma cruzi infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(4):375-85, 2008.

Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 272(50):31725-9, 1997.

Lepesheva GI, Villalta F & Waterman MR. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). *Advances in Parasitology*, 75: 65-87, 2011.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigbert BM, Leedade GF, Loeblich AR, Lom F, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljanzy G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool* 27: 37-58, 1980.

Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* 168(2):649-59, 1988.

Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:89-118, 2005.

Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin Immunopathol.* 34(6): 753–770, 2012.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev.* 20(2):53-65, 2012.

Maddahi A, Edvinsson L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *J Neuroinflammation.* 7:14, 2010.

Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, G α tecki P, Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med.* 29: 10-66, 2012

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

(RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 14;110(11):1443-9, 2004.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. *Bull World Health Organ.* 94(2):103-10, 2016.

McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Physiol.* 82(2):369-76, 1997.

Melo L, Caldas IS, Azevedo MA, Gonçalves KR, da Silva do Nascimento AF, Figueiredo VP, de Figueiredo Diniz L, de Lima WG, Torres RM, Bahia MT, Talvani A. Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2):325-31, 2011.

Menezes H. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 10(1):1-4, 1968.

Meyer H, Oliveira MX. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures; a 4-year study. *Parasitology.* 39(1-2):91-4, 1948.

Mietelska-Porowska A, Wojda U. T Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers. *J Immunol Res.* (4)626-540, 2017.

Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol.* 107-44, 2006.

Molina I et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine,* 370: 1899-1907, 2014.

Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(1):150-5, 2000.

Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 176:213-54, 2006.

Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys*, 218: 585-591, 1982.

Morris SA, Weiss LM, Factor S, Bilezikian JP, Tanowitz H, Wittner M. Verapamil ameliorates clinical, pathologic and biochemical manifestations of experimental chagasic cardiomyopathy in mice. *J Am Coll Cardiol*. 14(3):782-9, 1989.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 286(5446):1946-9, 1999.

Nisimura LM, Estado V, de Souza EM, Reis PA, Lessa MA, Castro-Faria-Neto HC, Pereira MC, Tibiriçá E, Garzoni LR. Acute Chagas disease induces cerebral microvasculopathy in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(7):e2998, 2014.

Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol*. 18(11):669-75, 1996.

O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation*. 95(5):1126-31, 1997.

Oliveira MD, Nagao-Dias AT, de Pontes VMO, de Souza Jr AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev. patol. Trop*. 37(3):209-228, 2008.

Olivieri BP, Cotta-De-Almeida V, Araújo-Jorge T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(12):3790-6, 2002.

Olivieri BP, de Souza AP, Cotta-de-Almeida V, de Castro SL, Araújo-Jorge T. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. *Exp Parasitol*. 114(3):228-34, 2006.

Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silvério JC, Gibaldi D, Pyrrho Ados S, Benjamim CF, Lannes-Vieira J, Bozza MT. CCL2/MCP-1 controls

parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 86(5):1239-46, 2009.

Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18(4):503-13, 1998.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA, Lannes-Vieira J. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 109(3):289-98, 2014.

Peterson FJ, Mason RP, Hovsepian J, Holtzman JL. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem,* 254(10): 4009-4014, 1979.

Pinheiro MAL, Kooij G, Mizze MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, Schwaninger M, Engelhardt B, Vries HE. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 461–471, 2016.

Pittella JE. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 35(2):111-6, 1993.

Polak A, Richle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 72:45-54, 1978.

Py MO. Neurologic manifestations of Chagas disease. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 11(6):536-42, 2011.

Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 107(3):745-9, 1992.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 26(2):275-91, 2012.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 375(9723):1388-402, 2010.

Reis PA, Estato V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, Bozza PT, Bozza FA, Tibiriça EV, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC. Statins Decrease

Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria PLoS Pathog. 8(12): e1003099, 2012.

Roffê E, Silva AA, Marino AP, dos Santos PV, Lannes-Vieira J. Essential role of VLA-4/VCAM-1 pathway in the establishment of CD8+ T-cell-mediated *Trypanosoma cruzi*-elicited meningoencephalitis. *J Neuroimmunol.* 142(1-2):17-30, 2003.

Ross SD, Allen IE, Connelly JE, Korenblat BM, Smith ME, Bishop D, Luo D. Clinical outcomes in statin treatment trials: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 59(15):1793-802, 1999.

Rossi MA, Carobrez SG. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *Br J Exp Pathol.* 66(2):155-60, 1985.

Rossi MA, Tanowitz HB, Malvestio LM, Celes MR, Campos EC, Blefari V, Prado CM. Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(8): e674, 2010.

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 22:11-28, 1999.

Salomão K, De Castro SL (2017) Capítulo 8: Recent advances in drug development for Chagas disease: two magic words, combination and repositioning. In: *Different Aspects on Chemotherapy of Trypanosomatids*, Leon L & Torres-Santos EC (Eds.), Nova Science Publishers, NY, ISBN 978-1-53610-850-7, pp. 181-226.

Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci.* 117(Pt 12):2427-9, 2004.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 54(6):845-52, 2012.

Silva AA, Roffê E, Lannes-Vieira J. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 32(5):593-600, 1999b.

Silva AA, Roffe E, Marino AP, dos Santos PV, Quirico-Santos T, Paiva CN, Lannes-Vieira J. Chagas' disease encephalitis: intense CD8+ lymphocytic infiltrate is

restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol.* 92(1):56-66, 1999a.

Silva AA, Vilar-Pereira G, Souza SA, Silva RR, Rocha SM, LannesVieira J. *Trypanosoma cruzi*-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. *J Neuroparasit* 1: 1-13, 2010.

Silva GM, Chambela MC, Sousa AS, Sangenis LH, Xavier SS, Costa AR, Brasil PE, Hasslocher-Moreno AM, Saraiva RM. Impact of pharmaceutical care on the quality of life of patients with Chagas disease and heart failure: randomized clinical trial. *Trials.* 13(1):244, 2012.

Silva JF, Capettini LS, da Silva JF, Sales-Junior P, Cruz JS, Cortes SF, Lemos VS. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vascul Pharmacol.* 82:73-81, 2016.

Silva RR, Mariante RM, Silva AA, dos Santos AL, Roffê E, Santiago H, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 10(2):e0118600, 2015.

Silva RR, Shrestha-Bajracharya D, Almeida-Leite CM, Leite R, Bahia MT, Talvani A. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(4):513-21, 2012.

Soeiro MN, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology.* 140(8):929-51, 2013.

Sokolova AY, Wyllie S, Patterson S, Oza SL, Read KD, Fairlamb AH. Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(7):2893-900, 2010.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51(6):524-39, 2009.

Teixeira AL Jr, Teixeira MM. Ischaemic stroke in chagasic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75(3):510, 2004.

Torrice F. In: *Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, November 13-17 2013, Washington DC.

Urbina JA, Lazard K, Marchan E, Visbal G, Aguirre T, Piras MM, Piras R, Maldonado RA, Payares G, de Souza W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(3):580-91, 1993.

Urbina JA, Vivas J, Ramos H, Larralde G, Aguilar Z, Avilán L. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 30: 185-195, 1988.

Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:311-8, 2009.

Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol.* 62(1):149-56, 2015.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11(18):2295-322, 1997.

Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 35(1):1-10, 2000.

Vilar-Pereira G, Resende Pereira I, de Souza Ruivo LA, Cruz Moreira O, da Silva AA, Britto C, Lannes-Vieira J. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(7):4297-309, 2016.

Vilar-Pereira G, Ruivo LA, Lannes-Vieira J. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(8):1042-50, 2015.

Vilar-Pereira G, Silva AA, Pereira IR, Silva RR, Moreira OC, de Almeida LR, de Souza AS, Rocha MS, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide

and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain Behav Immun.* 26(7):1136-49, 2012.

Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, Bailly S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(11):4694-701, 2009.

Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré C Soeiro M, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feige JJ, Bailly S. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(8):2905-10, 2007.

Woolsey AM, Burleigh BA. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol.* 6(9):829-38, 2004.

World Health Organization (2017) Chagas' disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Wkly Epidemiol Rec* 34:334–336, Available:<http://www.who.int/wer/2010/wer8534.pdf>.

Yu X, Cojocar V, Mustafa G, Salo-Ahen OM, Lepesheva GI, Wade RC. Dynamics of CYP51: implications for function and inhibitor design. *Journal of Molecular Recognition*, 28(2): 59-73, 2015.