

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KELLY JOANNA GONZÁLEZ LOZANO

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO CRÔNICA POR *Schistosoma mansoni* NA RESPOSTA
À QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA CONTRA A INFECÇÃO EXPERIMENTAL
AGUDA POR *Trypanosoma cruzi*.**

Alfenas/MG

2021

KELLY JOANNA GONZÁLEZ LOZANO

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO CRÔNICA POR *Schistosoma mansoni* NA RESPOSTA
À QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA CONTRA A INFECÇÃO EXPERIMENTAL
AGUDA POR *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas como requisito parcial obrigatório para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Santana Caldas

Coorientador: Prof. Dr. Romulo Dias Novaes

Alfenas /MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

González Lozano, Kelly Joanna
G643i Influência da infecção crônica por *Schistosoma mansoni* na resposta
à quimioterapia específica contra a infecção experimental aguda por
Trypanosoma cruzi. / Kelly Joanna González Lozano – Alfenas, MG,
2021.
80 f.: il. –

Orientador: Ivo Santana Caldas.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade
Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Benznidazol. 2. Infecções mistas. 3. Coinfecção. 4. Doença de
Chagas. 5. Esquistossomose. 6. Granulomas. I. Ivo Santana Caldas.
II. Título.

CDD- 616

KELLY JOANNA GONZÁLEZ LOZANO

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO CRÔNICA POR *Schistosoma mansoni* NA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA CONTRA A INFECÇÃO EXPERIMENTAL AGUDA POR
Trypanosoma cruzi.**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 25 de junho de 2021.

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Profa. Dra. Aline Pereira Castro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 25/06/2021, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Marcos da Matta Guedes, Usuário Externo**, em 25/06/2021, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Pereira Castro, Usuário Externo**, em 25/06/2021, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0536723** e o código CRC **C25081B5**.

*Dedico este trabajo a mi **hijo Alejandro**,
a mis **padres Alicia y Victor**,
a mi **hermana Francia**,
a mis **amigos y familiares de Colombia**,
y a todo el **personal de Brasil** cercano a mí,
quienes fueron mi sostén y motivación
durante este maravilloso proceso.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha família pelo apoio incondicional em tudo o processo de mestrado. Realmente não tivesse conseguido sem seu ajuda.

A meu orientador *Ivo Santana Caldas* quem foi enormemente compreensivo em meu processo de pós-graduação. Por me dar a oportunidade de trabalhar juntos e aprender de seus conhecimentos.

A meu co-orientador *Rômulo Dias Novaes* por transmitir seus saberes na área de histologia para a execução desta pesquisa.

A todos os professores, estudantes e servidores do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) por sempre me fazer sentir bem-vinda. Especialmente aos professores *Luiz Felipe Leomil, Livia Paranaíba, Livia de Figueiredo, Raquel Lopes Martins e Maria Ângela Rodrigues* por sua humanidade e por seu apoio em todo momento. E a meus companheiros de mestrado *Valquíria Fernandes, Ana Leticia, Diego Fernandes, Brenno Vilas e Paulo Carlstro* pelos momentos compartilhados juntos.

A *Adriana Teófilo* por seu carinho, minha segunda mãe no Brasil.

A *Camila Cabral Campos, Luana Sueli Silva, Raphaela da Rocha, Elda Gonçalves dos Santos, Diego Fernandes, Livia de Figueiredo, Raquel Lopes, Gilson Faria, Sérgio Caldas, Reggiani Vilela Gonçalves e Lorena Cera Bandeira* por sua colaboração nesta investigação.

A meus amigos da Colômbia, estrangeiros no Brasil e brasileiros, que foram minha família durante os últimos anos, especialmente a *Sandra Diaz, Lina Muñoz, Mailin Salazar, Jesús Cañas, Cindy Cristancho, Cristian Palacio, Andres Figueroa, Constanza Alvear, Carolina Trujillo, Elkin Torres, Yaciled Miranda, Johanna Daysi e Matheus de Souza* por seu amor e por sempre velar por meu bem-estar.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Pós-Graduação (PIB-Pós) da UNIFAL, à Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (PAEC) e pela oportunidade de estudo. Aos patrocinadores do projeto Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta do tratamento com benznidazol (BZL) na infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*, em camundongos com infecção crônica por *Schistosoma mansoni*. Foram utilizados 66 camundongos fêmeas *Balb/c* divididos em 6 grupos experimentais, sendo o grupo 1 (G1): Saudáveis, grupo 2 (G2): infectados por *S. mansoni*, grupo 3 (G3): infectados por *T. cruzi*, grupo 4 (G4): infectados por *T. cruzi* e tratados com BZL, grupo 5 (G5): coinfectados por *S.mansoni/T.cruzi* e grupo 6 (G6): coinfectados por *S.mansoni/T.cruzi* e tratados com BZL. Foram registrados os pesos, a mortalidade e a parasitemia dos animais e ao final do experimento foi coletado sangue para dosagem do BZL e análises de citocinas. Após, os animais foram eutanasiados para coleta de órgãos que foram pesados e fixados para análises histológicas. Análises de parasitismo cardíaco por qPCR também foram realizadas. Os resultados mostraram que os animais coinfectados apresentaram parasitemia até 5 vezes maiores daquelas observadas entre os camundongos infectados apenas com o *T. cruzi* (G5: 6×10^6 vs. G3: 1.3×10^6 tripomastigotas /0,1mL de sangue; $p < 0.05$), mas após o pico de parasitemia os animais coinfectados controlaram o parasitismo no miocárdio de forma mais eficaz ao G3 (G5: 39.48 vs. G3: 158.6 parasitos/25ng DNA tecidual; $p < 0.05$). Apesar da menor carga parasitária no miocárdio dos animais coinfectados no 13º dia de infecção por *T. cruzi*, a miocardite foi mais elevada nestes animais (G5: 284 vs. G3: 246 números de células no miocárdio; $p < 0.05$). O BZL, como esperado, controlou a parasitemia do *T. cruzi* entre os animais do G4, mas também foi eficiente em controlar a parasitemia mesmo entre os animais coinfectados pertencentes ao G6 (G4: 325 e G6: 417 média de tripomastigotas/0,1mL de sangue; $p > 0.05$). A avaliação do peso corporal e mortalidade também mostrou que o BZL promoveu melhora destes parâmetros entre os camundongos do G6 quando comparados com os animais coinfectados do G5, da mesma forma como ocorreu com a avaliação do parasitismo cardíaco e miocardite (G5 vs. G6, $p < 0.05$). A coinfeção reduziu a polarização dos perfis anti e pró-inflamatórios das citocinas induzidas pelos parasitos quando em situação de infecção simples e o BZL promoveu diminuição de citocinas antiinflamatórias em animais coinfectados sem efeito nas citocinas proinflamatórias. Os pesos do fígado e do baço foram exacerbados em animais coinfectados quando comparado com os outros grupos experimentais ($p < 0.05$). O BZL normalizou o peso do baço, ajudou a evitar a perda de hepatócitos e minimizou a inflamação no fígado (G5 vs. G6, $p < 0.05$), mas aumentou a hepatomegalia nos animais do G6 (G5: 0.089 vs. G6: 0.10g peso relativo médio do fígado; $p < 0.05$). A coinfeção ou o BZL não influenciaram no número de granulomas hepáticos, em sua área ou densidade celular (G5 e G6 vs. G2, $p > 0.05$), mas entre os coinfectados houve aumento das porcentagens de animais com granulomas pulmonares (G2: 40, G5: 60 e G6: 89% de animais com granulomas no pulmão) e intestinais (G2: 50, G5: 90 e G6: 75% de animais com granulomas intestino delgado). Todos os grupos com esquistossomose mostraram alta inflamação no intestino delgado, sem comprometimento significativo do intestino grosso. Por fim, a quantificação do BZL revelou que a coinfeção não influencia de forma significativa nos níveis do fármaco no sangue nos tempos testados (G4 vs. G6, $p > 0.05$). Os resultados permitem concluir que o tratamento com BZL é eficiente em minimizar a perda de peso corporal, mortalidade e esplenomegalia, além de suprimir o parasitismo e parasitemia de *T. cruzi* em camundongos coinfectados cronicamente com *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Benznidazol; infecções mistas; coinfeção; doença de Chagas; esquistossomose; granulomas.*

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effectiveness to the treatment with benznidazole (BZL) in acute infection by *Trypanosoma cruzi*, in mice with chronic infection by *Schistosoma mansoni*. For the experiment, 66 Balb/c mice divided into 6 experimental groups were used, the group 1 (G1): Healthy; group 2 (G2): infected by *S. mansoni*; group 3 (G3): infected by *T. cruzi*, group 4 (G4): infected by *T. cruzi* and treated with BZL, group 5 (G5): co-infected by *S. mansoni/T.cruzi* and group 6 (G6): co-infected by *S. mansoni/T. cruzi* end treated with BZL. Weight, mortality and parasitaemia of animals were registered and, at the end of the experiment, blood was collected for the dosage of BZL and cytokine analysis. The animals were sacrificed, organs were weighed and fixed for histological analysis, and a cardiac parasitism qPCR analyses were performed. The results showed that the co-infected animals had parasitaemia 5 times higher than those observed among infected mice by *T. cruzi* (G5: 6×10^6 vs. G3: 1.3×10^6 trypomastigotes/0,1mL of blood; $p < 0.05$), but after the peak of parasitaemia, the co-infected animals effectively controlled the parasitism in the myocardium more effectively than G3 (G5: 39.48 vs. G3: 158.6 parasites/25ng DNA tissue; $p < 0.05$). Despite the lower parasite load in the myocardium of co-infected animals on the 13th day of infection with *T. cruzi*, myocarditis was higher in these animals (G5: 284 vs. G3: 246 number of cells in the myocardium; $p < 0.05$). The BZL, as expected, controlled parasitaemia by *T. cruzi* among animals of G3, but it is also effective in controlling the parasitaemia even among the co-infected animals belonging to G6 (G4: 325 e G6: 417 means of trypomastigotes/0,1mL of blood; $p > 0.05$). The evaluation of body weight and mortality also showed that BZL promoted an improvement in these parameters among G6 mice when compared to co-infected animals from G5, in the same way as occurred with the evaluation of cardiac parasitism and myocarditis (G5 vs. G6, $p < 0.05$). The co-infection reduces the polarization of the anti-inflammatory and pro-inflammatory profiles of cytokines induced by parasites in a situation of simple infection, and BZL promoted a decrease in anti-inflammatory cytokines in co-infected animals with a single effect on inflammation. Liver and spleen weights were exacerbated in co-infected animals when compared to other experimental groups ($p < 0.05$). The BZL normalized spleen weight, helped prevent hepatocyte loss and minimized liver inflammation (G5 vs. G6, $p < 0.05$), but increased hepatomegaly in G6 animals (G5: 0.089 vs. G6: 0.10g mean relative weight of the liver; $p < 0.05$). Co-infection or BZL did not influence the number of hepatic granulomas, their area or cell density (G5 e G6 vs. G2, $p > 0.05$), but among the co-infected there was an increase in the percentages of animals with pulmonary granulomas (G2: 40, G5: 60 and G6: 89% of animals with granulomas in the lung) and intestinal (G2: 50, G5: 90 and G6: 75% of animals with granulomas in the small intestine). All groups with schistosomiasis showed high inflammation in the small intestine, with no significant changes in the large. Finally, the quantification of BZL showed that the co-infection did not significantly influence drug levels in blood among the analysed times (G4 vs. G6, $p > 0.05$). The results allow us to conclude that treatment with BZL is efficient in minimizing body weight loss, mortality and splenomegaly, in addition to suppressing *T. cruzi* parasitism and parasitaemia in mice chronically co-infected with *S. mansoni*.

Keywords: *Benznidazol; mixed infections; coinfection; Chagas disease; schistosomiasis; granulomas.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>S. mansoni</i>	17
Figura 2 - Desenvolvimento no tempo dos perfis imunológicos contra o <i>S. mansoni</i>	20
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 4 - Resposta imune inicial contra o <i>T. cruzi</i>	27
Figura 5 - Distribuição geográfica de <i>S. mansoni</i> e <i>T. cruzi</i> no Brasil.	30
Figura 6 - Desenho experimental <i>in vivo</i>	35
Figura 7 - Representação da medida da área granulomatosa realizada no software Image-Pro® plus 4.5.	40
Figura 8 - Representação da medida de densidade celular de um granuloma no software Image-Pro® plus 4.5.	41
Figura 9 - Ganho de peso dos camundongos após infecção com 2500 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>T. cruzi</i> em relação ao primeiro dia de pesagem.	46
Figura 10 - Curvas de parasitemia de camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> ou coinfectados	48
Figura 11 - Dosagem citocinas no plasma de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	49
Figura 12 - Quantificação da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> no coração pelo método de PCR em tempo real quantitativa em camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	51
Figura 13 - Densidade celular (<i>dcel</i>) no coração de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	52
Figura 14 - Fotos histológicas representativas do coração de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	53
Figura 15 - Peso relativo médio dos baços de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	54
Figura 16 - Peso relativo médio dos fígados de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	55
Figura 17 - Densidade celular (<i>dcel</i>) (hepatócitos e células intersticiais) no fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	56
Figura 18 - Fotos histológicas representativas do fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	57

Figura 19 - Número de granulomas (<i>N°gran</i>) hepáticos de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	58
Figura 20 - Área granulomatosa e densidade celular de granulomas (<i>dgran</i>) hepáticos de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	58
Figura 21 - Porcentagem de células mononuclear e polimorfonucleares nos granulomas do fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	59
Figura 22 - Número de granulomas (<i>N°gran</i>) pulmonares de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	60
Figura 23 - Área dos granulomas no pulmão e densidade celular (<i>dcel</i>) nos granulomas pulmonares de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	61
Figura 24 - Fotos histológicas representativas do intestino delgado de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	62
Figura 25 - Concentração média de benznidazol em amostras do plasma por tempo de camundongos 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> , 13 dias com <i>T. cruzi</i> e tratados 9 dias consecutivos com benznidazol.	64

LISTA DE TABLAS

Tabela 1 - Características dos grupos experimentais.....	34
Tabela 2 - Mortalidade de camundongos experimentalmente infectados por <i>T. cruzi</i> , por <i>S. mansoni</i> ou coinfectados e submetidos ou não ao tratamento com benznidazol.	47
Tabela 3 - Análise qualitativa da intensidade da inflamação no miocárdio de camundongos submetidos a diferentes condições experimentais.	52
Tabela 4 - Animais com granulomas no pulmão 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	60
Tabela 5 - Animais com granulomas no intestino delgado 88 dias após-infecção com o <i>S. mansoni</i> e 13 dias com <i>T. cruzi</i>	61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Arg-1	Arginase-1
Bregs	Células B reguladoras
BZL	Benznidazol
CD	Células dendríticas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPqRR	Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou
Ct	Ciclo threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTUs	Unidades Discretas de Tipagem
g	Grama
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
mg	Miligrama
mL	Mililitros
NFX	Nifurtimox
ng	Nanograma
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
°C	Grau Celsius
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real
rpm	Rotações por minuto
T.A.	Temperatura ambiente
Th	Células T helper
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
Tregs	Células T reguladoras
UV	Ultravioleta
Vol	Volumem
α	Alfa
γ	Gámma
μg	Micrograma
MI	Microlitros
μm	Micrometros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	ASPECTOS GERAIS DO <i>Schistosoma mansoni</i> (SAMBON, 1907).....	17
2.1.1	Ciclo de vida.....	17
2.1.2	Esquistossomose mansônica.....	19
2.1.3	Resposta imune na esquistossomose.....	20
2.1.4	Tratamento na esquistossomose.....	21
2.2	ASPECTOS GERAIS DO <i>Trypanosoma cruzi</i> (CHAGAS, 1909).....	22
2.2.1	Ciclo de vida.....	23
2.2.2	Doença de Chagas.....	25
2.2.3	Resposta imunológica do hospedeiro vertebrado contra <i>T. cruzi</i>	26
2.2.4	Tratamento na doença de Chagas.....	29
2.3	EFEITOS DA COINFECCÃO POR <i>T. cruzi</i> E <i>S. mansoni</i> EM CAMUNDONGOS. ESTUDOS EXPERIMENTAIS.....	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL.....	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	ANIMAIS E ÉTICA.....	34
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTO <i>IN VIVO</i>	34
5.2.1	Grupos experimentais.....	34
5.2.2	Procedimento <i>in vivo</i>	34
5.2.2.1	Características dos parasitas e infecções experimentais.....	36
5.2.2.2	Detecção de parasitas.....	36
5.2.2.3	Tratamento com benznidazol.....	37
5.2.2.4	Mensuração do peso.....	37
5.2.2.5	Mortalidade.....	37
5.2.2.6	Necropsia e coleta das amostras.....	37
5.2.2.6.1	Coleta de sangue.....	37
5.2.2.6.2	Eutanásia e extração de órgãos.....	38
5.3	HISTOLOGIA.....	38
5.3.1	Processamento histológico.....	38
5.3.2	Análise histopatológica e estereológica.....	39
5.4	ANÁLISES DA DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS.....	41
5.5	ANÁLISES DO PARASITISMO TECIDUAL POR PCR.....	42

5.5.1	Extração de DNA de tecido cardíaco de camundongos	42
5.5.2	Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do ciclo threshold (Ct) comparativo	43
5.5.3	PCR em tempo real quantitativa	43
5.6	ANÁLISES DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO BZL	44
5.6.1	Análises em High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	45
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6	RESULTADOS.	46
6.1	A INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> PROMOVE A PERDA DE PESO DOS ANIMAIS E O BZL EVITA ESTA PERDA MESMO QUANDO COINFECTADOS POR <i>S. mansoni</i>	46
6.2	NÃO FOI OBSERVADA MORTALIDADE ENTRE OS ANIMAIS TRATADOS COM BZL E A COINFECÇÃO NÃO ACENTUOU A MORTALIDADE ENTRE OS CAMUNDONGOS.	47
6.3	A PARASITEMIA POR <i>T. cruzi</i> É MAIS ELEVADA ENTRE CAMUNDONGOS COINFECTADOS E O BZL É CAPAZ DE REDUZIR A PARASITEMIA MESMO NESTA CONDIÇÃO.	47
6.4	O TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COINFECTADOS <i>S. mansoni/T. cruzi</i> COM BZL É EFICIENTE EM REDUZIR A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLASMA DE MANEIRA SIMILAR AO TRATAMENTO MINISTRADO EM ANIMAIS COM INFECÇÃO SIMPLES.	49
6.5	O TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COINFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> E <i>T. cruzi</i> COM BZL É EFICIENTE EM SUPRIMIR O PARASITISMO CARDÍACO DOS ANIMAIS DE MANEIRA SIMILAR A INFECÇÃO SIMPLES.	50
6.6	MUDANÇAS NO REMODELAMENTO MORFOLÓGICO E GRANULOMAS DO CORAÇÃO, BAÇO, FÍGADO, PULMÃO E INTESTINO.....	51
6.6.1	A coinfeção com <i>S. mansoni</i> e <i>T. cruzi</i> acentua a miocardite em camundongos, mas o tratamento com BZL reduz a miocardite nestes animais.....	51
6.6.2	A esplenomegalia é acentuada em animais coinfectados não tratados e o BZL previne o aumento deste órgão devido à coinfeção.	54
6.6.3	A hepatomegalia e redução no número de hepatócitos é acentuada nos animais coinfectados, nestes animais, o tratamento com BZL não preveniu a hepatomegalia, mas evitou a perda de hepatócitos e reduziu inflamação nas áreas distantes aos granulomas...55	55
6.6.4	A coinfeção com <i>T. cruzi</i> e/ou BZL não influencia no número de granulomas esquistossomos no fígado e na sua área ou densidade celular.....	58
6.6.5	A coinfeção com o <i>T. cruzi</i> aumenta o número de animais com granulomas no pulmão e induz aumento da área granulomatosa com diminuição da densidade celular dos mesmos, especialmente nos tratados com o BZL.....	59
6.6.6	A coinfeção aumenta o número de animais com granulomas no intestino delgado.	61
6.6.7	Os animais coinfectados e tratados apresentaram menor inflamação no intestino delgado quando comparado com os outros grupos com <i>S. mansoni</i>	62
6.8	A COINFECÇÃO COM <i>S. mansoni</i> E <i>T. cruzi</i> NÃO ALTERA AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO BZL EM CAMUNDONGOS.	64
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

As infecções mistas entre parasitas helmintos e protozoários são amplamente relatadas em humanos (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2015; BRIAND *et al.*, 2005; MULU *et al.*, 2013; OLIVERA *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2016), principalmente em áreas de maior pobreza, desnutrição e/ou com carência de sistemas sanitários (MATA, 1982). Os parasitas oportunistas destas áreas frequentemente são responsáveis por doenças de alto impacto na saúde pública devido às suas altas taxas de mortalidade e morbidade em humanos, como é o caso da esquistossomose e a doença de Chagas, doenças causadas pelo helminto do gênero *Schistosoma* e pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, respectivamente (OMS, 2021a, 2021b).

A esquistossomose é uma doença crônica produzida pelos ovos do parasita que ficam presos em diferentes órgãos do hospedeiro vertebrado quando são liberados pelas fêmeas adultas, gerando reações inflamatórias granulomatosas que podem causar danos graves nos tecidos subjacentes. As principais espécies causadoras da esquistossomose são o *Schistosoma japonicum* no Oriente Médio, o *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma guineenses*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma intercalatum* na África, o *Schistosoma mansoni* na América do Sul, Antilhas e também na África (OMS, 2021b) e *Schistosoma malayensis*, endêmica na Malásia (GREER; OW-YANG; YONG, 1988).

Por outro lado, o *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, a qual afeta 6-7 milhões de pessoas a nível mundial (OMS, 2021a) e tem um custo anual de aproximadamente 7.19 bilhões de dólares (LEE *et al.*, 2013a). A doença de Chagas é endêmica em 21 países (OMS, 2021a), encontrando-se em grande parte do México, América Central e América do Sul. E também, está disseminada em países não endêmicos da América do Norte e Europa, por meio da migração de milhares de indivíduos infectados nas últimas décadas (DIAS, 2015).

O Benznidazol (**BZL**) e o Nifurtimox (**NFX**) são os únicos fármacos para o tratamento contra a doença de Chagas aprovados em humanos, sendo o BZL o medicamento usado no Brasil (ARAUJO, 2013). Além ser escassos, os tratamentos para a doença de Chagas têm uma eficácia restrita em algumas situações clínicas e apresentam diversos efeitos colaterais na saúde que, muitas vezes, levam aos pacientes a abandonarem o tratamento (OLIVERA *et al.*, 2017). De tal modo, a doença de Chagas tem uma grande repercussão a nível socioeconômico no Brasil, e também em todas as regiões onde a doença está presente, porque quando os pacientes não são tratados e a doença de Chagas evolui a um quadro clínico crônico, pode-se desenvolver

formas graves da doença, principalmente relacionadas ao sistema cardíaco e/ou gastrointestinal (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Assim, a doença de Chagas em última instância leva a situações de incapacidade, altos gastos clínicos e no pior dos casos, à morte dos pacientes chagásicos (LUQUETTI; PORTO, 1997).

Algumas publicações já tem reportado espécies de *Schistosoma* em coinfeção natural com outros agentes infecciosos em humanos com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e com o *Plasmodium* spp., sobretudo na África (BRIAND *et al.*, 2005; BUSTINDUY *et al.*, 2014). No caso da esquistossomose mansônica, nome que recebe a doença causada pela espécie *S. mansoni*, em coinfeções experimentais com o protozoário *T. cruzi* em camundongos, se evidenciam a superposição dos padrões imunológicos que alteram a resistência do hospedeiro contra ambos parasitas (GENARO; BRENER; COELHO, 1986; KLOETZEL *et al.*, 1973; MABBOTT, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2016; TELLES, 1990). Isso ocorre porque os perfis imunológicos gerados por esses parasitas são diferentes. De um lado, o *S. mansoni*, que é um parasita extracelular, em sua fase crônica estimula o desenvolvimento de um perfil imune Th2 em seu hospedeiro (PEARCE *et al.*, 1991). Enquanto que, a proteção do hospedeiro contra uma infecção letal pelo protozoário intracelular *T. cruzi* está mediada por um perfil imune Th1 (KUMAR; TARLETON, 2001).

Neste trabalho pleiteamos a hipótese que, apesar da variação da resposta imunológica, os danos causados na fase crônica pelos ovos de *S. mansoni* em diferentes órgãos que são importantes para a metabolização do BZL como o fígado e o intestino (PERIN *et al.*, 2017) podem influenciar na resposta ao tratamento antichagásico na fase aguda da enfermidade. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta ao tratamento antiparasitário específico com BZL na infecção aguda por *T. cruzi* em camundongos com infecção crônica por *S. mansoni*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS DO *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907).

2.1.1 Ciclo de vida

O *S. mansoni* é um parasita platelminto com dimorfismo sexual (os vermes se diferenciam em fêmeas e machos) e heteroxênico (precisam mais de um hospedeiro para complementar seu ciclo de vida), que têm como hospedeiros definitivos vertebrados mamíferos e como hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria* (família Planorbidae) (FILES; CRAM, 1949).

As cercarias, formas infecciosas para mamíferos, ficam livres na água quando deixam o molusco e são atraídas para o hospedeiro vertebrado devido ao distúrbio da água e/ou componentes da pele (e.g. ácidos graxos livres) (Figura 1) (LEE *et al.*, 2013b). Quando conseguem atingir ao hospedeiro vertebrado, as cercarias passam pelas diferentes camadas da pele até alcançar os vasos sanguíneos dérmicos e/ou sistema linfática, transformando-se em esquistossômulos durante esse processo (Figura 1) (KOLÁŘOVÁ *et al.*, 2013).

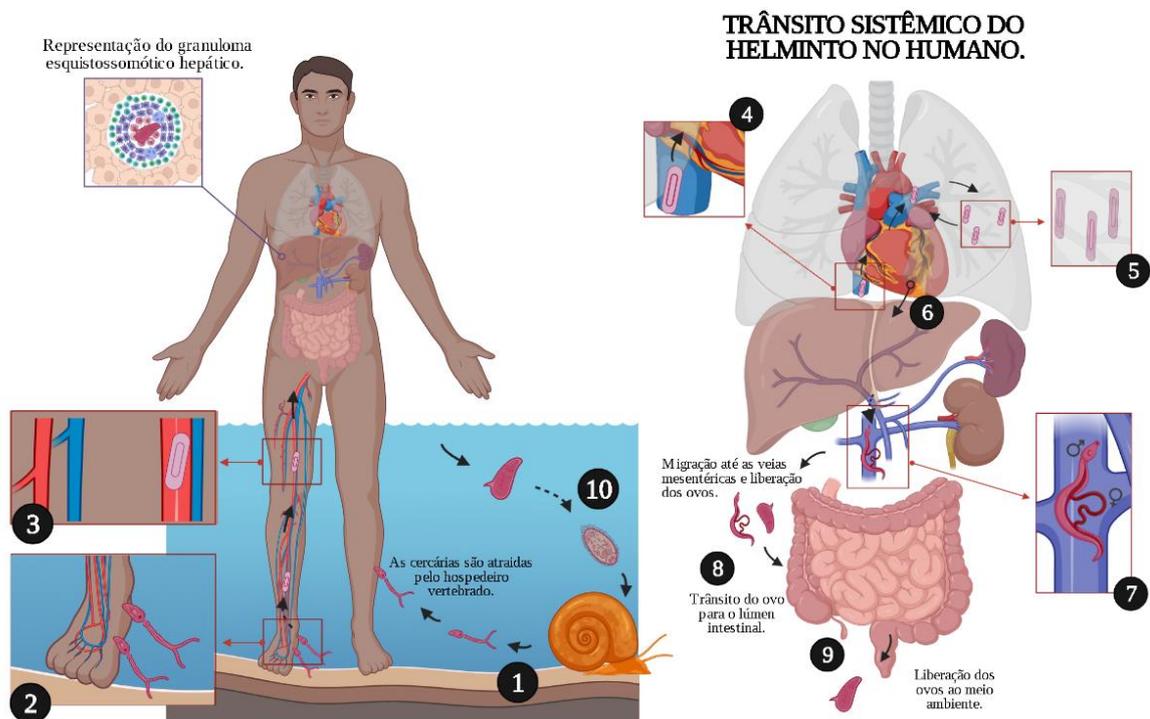


Figura 1 - Ciclo de vida de *S. mansoni*.

Fonte: Autoria própria. Imagem elaborada pela autora com BioRender.com.

Legenda: (1) A cercaria saem do caramujo e fica livre na água, (2) As cercarias penetram a pele do hospedeiro vertebrado convertendo-se em esquistossômulos, (3) que viajam através da vasculatura e (4) entram no coração e depois ao pulmão; (5) Os parasitas no pulmão são arrastados para o lado esquerdo do coração e (6) depois chegam ao fígado; (7) Os vermes formam casais na veia porta e posteriormente, (8) viajam às veias mesentéricas onde são liberados os ovos que atravessaram a parede do intestino; (9) Os ovos saem do hospedeiro vertebrado junto com as fezes; (10) Os miracídios saem do ovo e infectam um caramujo *Biomphalaria*.

Os esquistossômulos que chegam ao lado direito do coração, são distribuídos de forma assíncrona para os pulmões (Figura 1) (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008; WEERAKOON *et al.*, 2015). Em camundongos, os primeiros esquistossômulos no pulmão aparecem ao redor do dia 3 após a infecção experimental e começam a diminuir depois do dia 6 (RHEINBERG *et al.*, 1998), devido à sua migração através das veias pulmonares até as câmaras cardíacas esquerdas (NATION *et al.*, 2020) (Figura 1). Depois, o parasita consegue ingressar ao sistema hepático e durante esse processo, se transformam em vermes machos e fêmeas juvenis. No sistema porta-hepático, os vermes se aderem às paredes intravasculares, por meio de uma ventosa que possuem em sua área ventral, para se alimentar de sangue em orientação contrária ao fluxo sanguíneo onde continuam sua maturação (BLOCH, 1980). A fêmea entra em um canal ou sulco que tem o macho, formando um casal para conseguir a reprodução sexuada (Figura 1). Essa união é essencial para a maturação da fêmea, pois induz a expressão de genes específicos que estimulam seu crescimento e vitelogênese (NIRDE *et al.*, 1983).

A fecundação e formação dos ovos ocorrem na veia porta. Após, os helmintos adultos migram contra a corrente sanguínea até os vasos mesentéricos onde os ovos são expelidos através da ventosa ventral da fêmea (Figura 1) (LINDER, 2017). Estima-se que uma fêmea de *S. mansoni* consegue liberar perto de 300 ovos por dia (MOORE; SANDGROUND, 1956). Os ovos tem que atravessar a parede intestinal desde as veias mesentéricas até o lúmen do intestino para conseguir sair junto com as fezes do hospedeiro para o meio ambiente (Figura 1). Após 40 dias da infecção, os primeiros ovos são vistos nas fezes do hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 1986). Os ovos que não conseguem atravessar a parede intestinal são arrastados pela corrente sanguínea e ficam retidos em diferentes órgãos onde produzem granulomas (Figura 1), os quais são focos inflamatórios responsáveis pelas formas clínicas mais importantes da esquistossomose (GRYSEELS *et al.*, 2006).

Quando os ovos de *S. mansoni* alcançam o lúmen intestinal e são expelidos, ocorre eclosão quando atingem uma coleção de água, momento onde saem os miracídios (Figura 1). Livres no meio aquático, os miracídios nadam atraídos por seu hospedeiro intermediário que habita normalmente em corpos de água doce, com pouca correnteza ou parada, para dar seguimento à reprodução assexuada no platelminto (Figura 1). No Brasil, a transmissão de *S. mansoni* depende das espécies de caramujos *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818); *Biomphalaria tenagophila* (D'orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (TELES, 2005). Após a penetração dos miracídios nos caramujos, tem início um complexo processo de alterações morfológicas que darão origem as cercárias passando primeiro por esporocisto. Um único miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008).

O ciclo evolutivo do helminto continua quando as cercárias deixam o molusco, ficam livres na água e conseguem infectar um novo hospedeiro vertebrado (Figura 1).

2.1.2 Esquistossomose mansônica

O *S. mansoni* produz a esquistossomose mansônica, uma doença comumente conhecida pelos brasileiros como barriga d'água, xistose ou doença do caramujo (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A fase aguda da esquistossomose mansônica é caracterizada por sintomas gerais inespecíficos (LAMBERTUCCI, 1993), e pode ser dividida em pré ou pós-postural. No período prépostural, antes do começo da eliminação de ovos nas fezes, as manifestações clínicas como prostração e eosinofilia podem surgir alguns dias após a exposição cercariana ou depois de algumas semanas de infecção, coincidindo com a eliminação de ovos fecais, o que pode provocar dores abdominais e diarreia, acompanhada de muco e sangue (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008). Também, a migração dos parasitas nas primeiras semanas da infecção pode provocar a febre Katayama, que é uma reação de hipersensibilidade (DOHERTY; MOODY; WRIGHT, 1996) e lesões eritematosas ou purpúricas na pele devido à entrada das cercarias no hospedeiro (dermatite cercariana) (LAMBERTUCCI, 1993). Já na fase aguda pós-postural, há presença de granulomas grandes em vários órgãos tais como o fígado, intestinos e pulmões, caracterizados por ter alto componente exsudativo, eosinófilos e uma periferia pouco delimitada. É frequente a necrose central ou um halo de necrose periovular (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008).

Por outro lado, a fase crônica da esquistossomose pode dividir-se em habitual ou leve e em formas graves ou avançadas. A primeira ocorre em 90% dos pacientes, sendo muitas vezes assintomáticos. Enquanto que, as formas graves se desenvolvem em 4% a 10% dos pacientes e está relacionada com a migração dos ovos do parasita e ao desenvolvimento de esquistossomoses hepatoesplênica, intestinal e/ou ectópica (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008).

Nas esquistossomoses hepatoesplênica pode-se manifestar uma inflamação inicial que incluem um aumento acentuado do lobo esquerdo do fígado e esplenomegalia nodular ou, fibrose tardia, que se desenvolvem anos mais tarde no curso da infecção resultando de uma deposição maciça de colágeno nos espaços periportais, levando a uma fibrose periportal patognomônica ou “pipestem” fibroses. A fibrose leva à oclusão progressiva das veias porta, hipertensão portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastrointestinais (GRYSEELS *et al.*, 2006). A ascite e o sangramento de varizes são duas complicações graves e comuns nesta fase, que podem resultar na morte do paciente (WEERAKOON *et al.*, 2015).

Na esquistossomose intestinal pelo *S. mansoni*, há uma inflamação granulomatosa na parede do intestino devido à migração dos ovos do parasita. Os sintomas mais comuns são a dor abdominal crônica o intermitente, perda do apetite e diarreia com ou sem sangue. E na esquistossomose ectópica, os pulmões e o plexo venoso cerebral ou espinhal (neuro-esquistossomose) podem ser afetados pelo depósito de ovos (GRYSEELS *et al.*, 2006). Além dessas morbidades específicas, a esquistossomose está associada a condições generalizadas debilitantes, como desnutrição, anemia, retardo do crescimento e comprometimento do desenvolvimento na infância (KING; DANGERFIELD-CHA, 2008; WEERAKOON *et al.*, 2015).

2.1.3 Resposta imune na esquistossomose

A infecção pelo *S. mansoni* tem uma fase aguda que dura em torno de um a três meses e desaparece através de um tratamento específico ou evolui (se não tratada) para uma fase crônica (Figura 2) (KATZ; ALMEIDA, 2003).

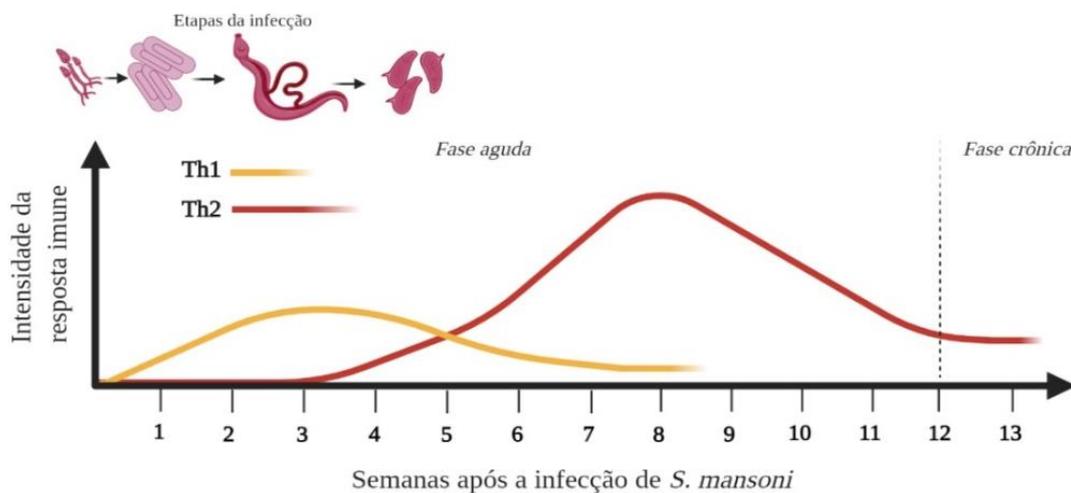


Figura 2 - Desenvolvimento no tempo dos perfis imunológicos contra o *S. mansoni*.

Fonte: Adaptado de PEARCE; MACDONALD, 2002. Imagem elaborada pela autora com BioRender.com.

Legenda: Desenvolvimento dos perfis imunológicos em resposta a infecções por *S. mansoni*. A diminuição da intensidade do perfil imune Th1 e o início do perfil Th2 acontecem aproximadamente cinco semanas após a infecção, coincidindo com as posturas de ovos.

A penetração de cercárias inicia uma reação Th1 (ou perfil de células T helper 1), que dura aproximadamente cinco a seis semanas em camundongos (Figura 2) (PEARCE; MACDONALD, 2002). Por volta do dia 28 há um alto nível de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ e IL-2, mas há um desvio para uma resposta imune de perfil Th2, que coincide com a ovoposição dos helmintos (Figura 2), aumentando os níveis de citocinas como IL-4 e IL-5 por volta do dia 49 após infecção com *S. mansoni* (PEARCE *et al.*, 1991).

O Perfil Th2 é incentivado por um complexo grupo de antígenos imuno-estimulantes secretados pelos ovos de *S. mansoni* chamados antígenos solúveis de ovos, **SEA** (*soluble egg antigens*). Assim, as SEA podem influenciar nas células dendríticas (**DCs**) de seus hospedeiros para estimularem o desenvolvimento da via dos linfócitos T auxiliares 2 (ou células T helper, **Th2**) (MACDONALD *et al.*, 2001). Ainda que o perfil Th2 possa ser induzido por diferentes tipos de células, o esgotamento das DCs pode interromper gravemente esse processo.

O resultado do desvio para um perfil Th2, é a formação de granulomas ao redor dos ovos que ficam ancorados nos diferentes órgãos quando não conseguem sair pelas fezes (Figura 1). Esses granulomas estão caracterizados pelo acúmulo de macrófagos M2 tendo um papel protetor contra a doença (HERBERT *et al.*, 2004). Nos granulomas do fígado, uma pequena porcentagem dos macrófagos AA são residentes desse órgão, pelo que, o recrutamento de monócitos da corrente sanguínea (monócitos *Ly6C^{hi}*) domina como mecanismo para aumentar o número de macrófagos nesse ambiente (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Em camundongos, as respostas granulomatosas são maiores cerca de 8 a 10 semanas após a infecção, antes de diminuir gradualmente em magnitude. Essa diminuição corresponde a uma redução na proliferação e capacidade de resposta dos linfócitos e representa a transição da doença aguda para a crônica. A esquistossomose crônica é caracterizada por altos níveis circulantes de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (**IL-10**) e/ou Fator de Crescimento Transformante β (**TGF- β**) e pela profunda expansão de células T reguladoras (**Tregs**) e células B (**Bregs**), que funcionam para suprimir as atividades potencialmente deletérias de células T auxiliares e assim, a patologia granulomatosa e limitada (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018).

2.1.4 Tratamento na esquistossomose

O praziquantel (**PZQ**), um derivado da pirazinoisoquinolina, é o tratamento de escolha desde os anos 70 para tratar a esquistossomose (SEUBERT; POHLKE; LOEBICH, 1977). O PZQ é adequado para tratamentos individuais e em larga escala já que tem uma boa eficácia, tolerabilidade e tem um simples esquema de administração (ANDREWS *et al.*, 1983).

O mecanismo de ação do PZQ em esquistossomos é geralmente agrupado em três categorias: (1) contração muscular; (2) dano tegumentar e (3) alterações metabólicas (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995). O PZQ inibe a função da bomba sódio/potássio do parasita levando à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica (NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999).

Em relação à eficácia do PZQ, após o tratamento com 40 mg/kg a porcentagem de cura varia de 60% a 85-90%. A eficácia do fármaco é calculada mediante as mudanças nos padrões de excreção dos ovos de *Schistosoma* e, entre os parâmetros usados para o cálculo estão a taxa de cura (pacientes sem excreção de ovos depois do tratamento/pacientes com excreção de ovos antes do tratamento) e/o porcentagem médio da redução de ovos excretados depois do tratamento (DOENHOFF; PICA-MATTOCCIA, 2006). As falhas terapêuticas com PZQ nas infecções por *Schistosoma* podem estar relacionadas com o efeito insuficiente do fármaco nas etapas mais jovens do parasita com relação aos vermes adultos (XIAO; CATTO; WEBSTER, 1985) pois, no momento que um indivíduo se submete ao tratamento, alguns parasitas imaturos podem sobreviver e continuar a produzir morbidade (CAFFREY, 2015).

Entre os efeitos secundários registrados para o PZQ, 50% dos pacientes podem apresentar dor abdominal, náusea, vômito, anorexia e diarreia. Ocasionalmente é observado diarreia com sangue. Outros sintomas podem ser a dor de cabeça, tontura, sonolência, prurido, erupções e menos específicos, a febre ou fadiga (ANDREWS, 1985).

Em relação à sua farmacocinética, o PZQ tem uma absorção de 80% quando é administrado via oral e de 100% quando é por via intravenosa (ANDREWS, 1985). A biodisponibilidade do medicamento pode ser melhorada pela ingestão de alimentos com alto conteúdo de carboidratos (1,962.18 ng/mL) e lipídios (1,095.44 ng/mL), havendo um aumento significativo da concentração em plasma do PZQ quando comparado com indivíduos em jejum (318.81 ng/mL) (ANDREWS, 1985). Outro fator que pode influenciar tanto na biodisponibilidade do PZQ em plasma como em sua eliminação no sangue, é a presença de *S. mansoni* no hospedeiro. Quando são comparados camundongos infectados vs. saudáveis, a infecção leva a uma menor concentração do PZQ em plasma acompanhado de uma baixa taxa de eliminação do mesmo. As alterações no metabolismo do medicamento em indivíduos infectados podem estar associadas à patologia que se apresenta no fígado na esquistossomose visto que, é o órgão principal da metabolização do PZQ (ANDREWS, 1985).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

O parasita *T. cruzi* é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente à ordem Kinetoplastida, que tem uma grande variabilidade genética. As cepas do *T. cruzi* estão agrupadas em VII Unidades Discretas (distintas) de Tipagem (DTUs) (TcI – TcVI e TcBat) (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016; ZINGALES, 2018; ZINGALES *et al.*, 2009), e têm como conceito o conjunto de populações de isolados de *T. cruzi* que são geneticamente semelhantes e podem ser identificadas por marcadores genéticos (JANSEN *et al.*, 2017).

Os humanos podem adquirir a infecção por *T. cruzi* de diferentes maneiras (BONNEY *et al.*, 2019) que, dependendo da região, têm um nível de importância distinta. Em países não endêmicos, a transmissão congênita, as infecções por transfusão de sangue e/ou por transplantes de órgãos infectados com *T. cruzi* são as formas mais importantes para contrair a DOENÇA DE CHAGAS. Nos países endêmicos, aqueles que ficam na América Central e Sul, as transmissões vetoriais e orais são as principais (HOTEZ *et al.*, 2013).

No Brasil, devido aos programas de controle vetorial peri e intradomiciliar dos triatomíneos, a transmissão oral, que se dá por meio da ingestão de alimentos contaminados com as formas infectantes do *T. cruzi*, vem ganhando relevância na disseminação do parasita no país, tornando-se em grande parte, com vários surtos da DOENÇA DE CHAGAS nos últimos anos, a responsável da continuação da zoonose no Brasil (DOMINGUES *et al.*, 2015; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; VARGAS *et al.*, 2018).

2.2.1 Ciclo de vida

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, alterando sua permanência entre hospedeiros vertebrados e hospedeiros invertebrados, insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), popularmente chamados de “barbeiro” (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Quando o barbeiro deposita fezes com tripomastigotas metacíclicos (formas infectantes para os vertebrados) próximo à picada por onde se alimentou, eles penetram na epiderme (Figura 3). Alternativamente os tripomastigotas metacíclicos podem penetrar nas membranas mucosas caso sejam carregados pelas mãos contaminadas (Figura 3) (GARCIA; AZAMBUJA, 1991). Recentemente se demonstrou que os tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de detectar a presença de células mamíferas e mudar seus padrões de motilidade melhorando assim sua eficiência de invasão (ARIAS-DEL-ANGEL *et al.*, 2020).

Depois de entrar no vertebrado, as primeiras células a ser infectadas pelos tripomastigotas metacíclicos são as células nucleadas locais, incluindo as células do sistema imune residentes ou recrutadas ao sítio da infecção após a entrada do parasita no hospedeiro (Figura 3), usando pelo menos duas estratégias diferentes (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Em uma das estratégias, o parasita induz a exocitose do lisossoma próximo ao sítio de ligação dependente de cálcio (Ca^{+}) para sua entrada, que simula um processo de lesão e reparo da membrana plasmática da célula hospedeira (FERNANDES *et al.*, 2011); o qual resulta ser um mecanismo importante de *T. cruzi* para poder atingir a infecção em células não fagocíticas (ANDRADE; ANDREWS, 2005). E, outro mecanismo de entrada do

parasita é pela fagocitose/endocitose nas células hospedeiras levando à formação de fagossomas (TARDIEUX *et al.*, 1992).

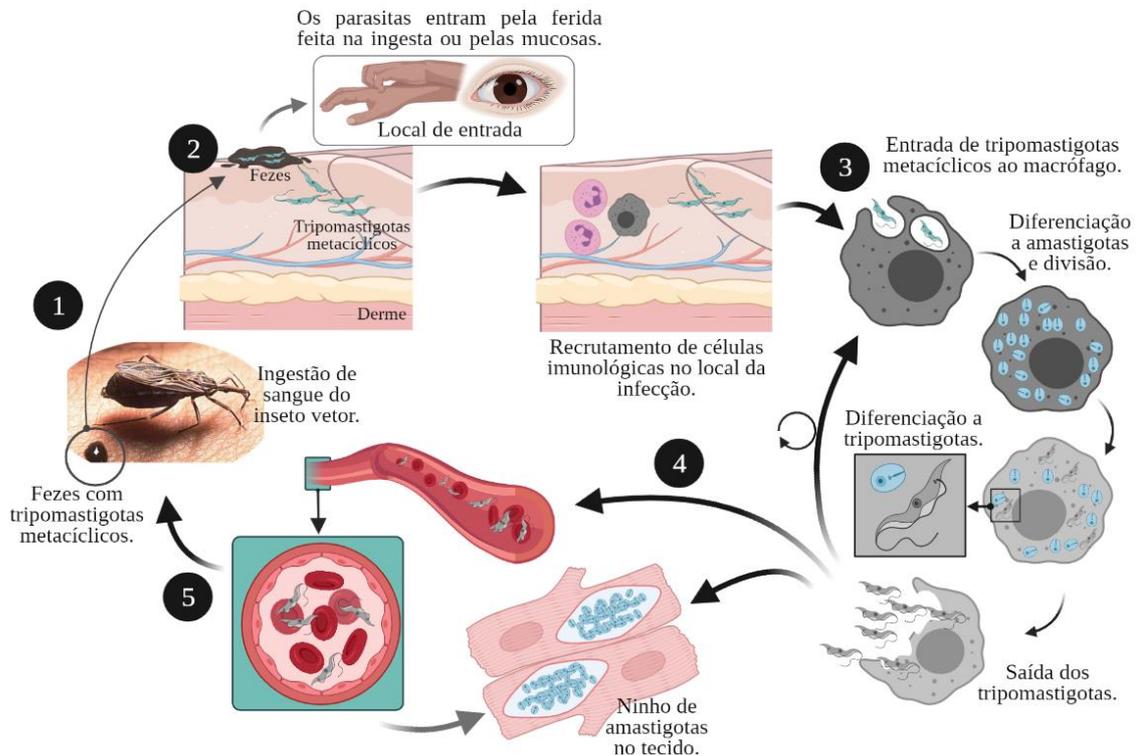


Figura 3 - Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Fonte: Autoria própria. Imagem elaborada pela autora com BioRender.com.

Legenda: (1) O triatomíneo libera fezes com a forma infectante do *T. cruzi* chamadas tripomastigotas metacíclicos (TM); (2) Os parasitas entram no hospedeiro vertebrado; (3) Os TM conseguem entrar nas células do hospedeiro formando um fagolisossoma e quando livres no citoplasma, se diferenciam em amastigotas e começam a dividir-se por fissão binária. Após, os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos (TS) que saem da célula; (4) Os TS chegam ao sistema circulatório para invadir outros tecidos; (5) O triatomíneo ingere as formas de TS que posteriormente se transformaram em TM.

Os parasitas conseguem sair do fagossoma quando os lisossomas da célula hospedeira se unem ao vacúolo parasitóforo formando o fagolisossoma. A acidificação lisossomal do vacúolo parasitóforo é um fator importante que permite a fuga do tripomastigota do ambiente extremamente oxidativo do fagolisossomo para o citoplasma (Figura 3) (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Quando livres no citoplasma das células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (formas replicativas no hospedeiro vertebrado) (Figura 3). As amastigotas se replicam por fissão binária cada 12h e, após cerca de 9 ciclos de divisão e com uma carga na célula hospedeira de aproximadamente 500 parasitas, as amastigotas filhas se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneas altamente móveis (formas infectantes para o vetor) pouco antes de sair da célula (Figura 3) (TAFURI; CHIARI; RASO, 1983). Quando a célula hospedeira, carregada com tripomastigotas, rompe, a infecção pode se disseminar para outros

tecidos periféricos ou para a corrente sanguínea conseguindo chegar a tecidos distantes (Figura 3) (ANDRADE; ANDREWS, 2005).

Os tripomastigotas da corrente sanguínea além de poder infectar outras células do vertebrado, podem também ser ingeridos por um triatomíneo quando se alimentam do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (Figura 3). No trato gastrointestinal do inseto os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas que proliferam rapidamente e se transformam novamente em tripomastigotas metacíclicos infecciosos na extremidade terminal do inseto. O ciclo de vida continua quando o inseto infetado se alimentar de sangue, os parasitas saem por suas fezes e infetam outro vertebrado (Figura 3) (URBINA, 2010).

2.2.2 Doença de Chagas

O curso clínico da doença de Chagas é comumente dividido em fase aguda e em fase crônica que, normalmente se inicia com a forma indeterminada e posteriormente evolui para as formas sintomáticas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Apesar da fase aguda da doença de Chagas ser geralmente inaparente, em alguns pacientes há manifestações de sintomas que podem incluir febre alta, mal-estar geral, aumento do fígado, baço, linfonodos e/ou edema subcutâneo no local da infecção (chagoma) ou edema periorbital (sinal de Romanã) (CALVOPINA *et al.*, 2020). Também pode incluir anorexia, dor muscular, diarreia, vômito, linfadenopatia e convulsão (TEIXEIRA *et al.*, 2011). Entre 5% e 10% dos pacientes sintomáticos podem morrer nesta fase devido à miocardite grave, meningoencefalite ou ambas e, em alguns casos, devido à insuficiência renal aguda (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Independentemente da presença de sintomas, os casos são considerados como fase aguda ou inicial se o *T. cruzi* puder ser detectado em grandes quantidades no sangue periférico, conforme determinado por exame direto no microscópico de esfregaço sanguíneo fresco ou por métodos de concentração como microhematócrito e hemocultura (ALVES *et al.*, 2018; COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). Os anticorpos IgM anti-*T.cruzi* também são considerados como um indicador de fase aguda (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

A forma indeterminada (70% dos pacientes permanecem nessa forma) segue dois ou quatro meses após a fase aguda e é caracterizada por indivíduos sorologicamente positivos para *T. cruzi*, mas assintomáticos, ou seja, sem anormalidades eletrocardiográficas e/ou radiológicas no coração, esôfago ou cólon, podendo permanecer assim por anos, até décadas. Já na forma determinada da fase crônica, que inclui patologias no coração, o trato gastrointestinal e do sistema nervoso, a ocorrência é do 10-30% dos casos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A patologia cardíaca da doença de Chagas basicamente é desenvolvida por um desequilíbrio da resposta imune, tendo como processos patológicos chave a infiltração inflamatória, a morte celular e posteriormente, a fibrose (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009). Os mecanismos de auto-imunidade observada na doença de Chagas podem aparecer devido tanto à presença do parasita como certos componentes da célula hospedeira que caem no interstício no momento da ruptura da mesma no ciclo intracelular do *T. cruzi* (TAFURI; CHIARI; RASO, 1983). O processo inflamatório produz destruição de fibras cardíacas o que leva à uma marcada fibrose reparadora e reativa que afeta múltiplas áreas do miocárdio (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

Entre as mudanças macroscópicas do coração na doença de Chagas estão a cardiomiopatia, cardiomegalia, dilatação de múltiplas câmaras e cicatrizes endo e epicárdicas. Em cortes transversais do coração, pode ser observado miocárdio irregular, fibrose endocárdica e epicárdica. Os aneurismas estão presentes frequentemente em diferentes estágios de desenvolvimento e incluem adelgaçamento da parede ventricular e trombo endocárdico apical (BONNEY *et al.*, 2019). E pode-se apresentar manifestações clínicas como arritmias, insuficiência cardíaca congestiva e tromboembolismo (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

Nos distúrbios gastrointestinais, as principais manifestações são o megacólon e o megaesôfago, que é dilatação pronunciada desses órgãos. Essas manifestações, em parte, são apresentadas por anormalidades do sistema nervoso, especificamente dos neurônios entéricos excitatórios e inibitórios que revestem o trato gastrointestinal e que produzem uma cadeia de danos que leva ao alargamento dos órgãos afetados. Quando a doença gastrointestinal se apresenta, os pacientes tem sintomas como sialorréia, acalasia, disfagia (que pode levar à desnutrição e perda de peso severa), constipação crônica, entre outros (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009). A disfunção gastrointestinal é a segunda manifestação mais comum na doença de Chagas crônica e é encontrada em 5 a 20% dos pacientes com cardiomiopatia (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

2.2.3 Resposta imunológica do hospedeiro vertebrado contra *T. cruzi*

O sistema imune inato tem um papel importante no controle da infecção na fase aguda pelo *T. cruzi* ainda sem ter uma eliminação completa do parasita. Nessa fase, a existência de Receptores de Reconhecimento de Padrões (**PRR**), como o receptor tipo Toll (Toll-Like Receptor, **TLR**), uma família de proteínas transmembrânicas nas células imunológicas, permitem a rápida identificação e eliminação do parasita (Figura 4). Em humanos, tem identificado 10 tipos de TLR que reconhecem diferentes estruturas químicas que são altamente

conservadas em microrganismos (Padrões Moleculares Associados a Patógenos, **PAMPs**) (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2013; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

Entre os TLR descritos na ativação das defesas na presença do *T. cruzi* estão os TLR2/6, TLR4 e os TLR7 e TLR9 (localizados em endossomos) (Figura 4). O reconhecimento de PAMPs de *T. cruzi* pelos TLRs promove à sinalização em cascata dependente do adaptador molecular *MyD88* ou também do TRIF no caso do TLR4, que leva à liberação do Fator Nuclear Kappa B (**NF-κB**) e Fatores de Regulação 3 e 7 (**IRF3 e IRF7**), os quais desempenham funções como fatores de transcrição. Em fagócitos mononucleares e células Natural Killer (**NK**) o NF-κB ativa a expressão de genes pro-inflamatórios como a Interleucina 12 (**IL-12**) e Fator de Necrose Tumoral alfa (**TNF-α**) e os IRF3 e IRF7 a expressão de Interferons (**IFN- α e β**, respetivamente) (Figura 4) (O'NEILL, 2006).

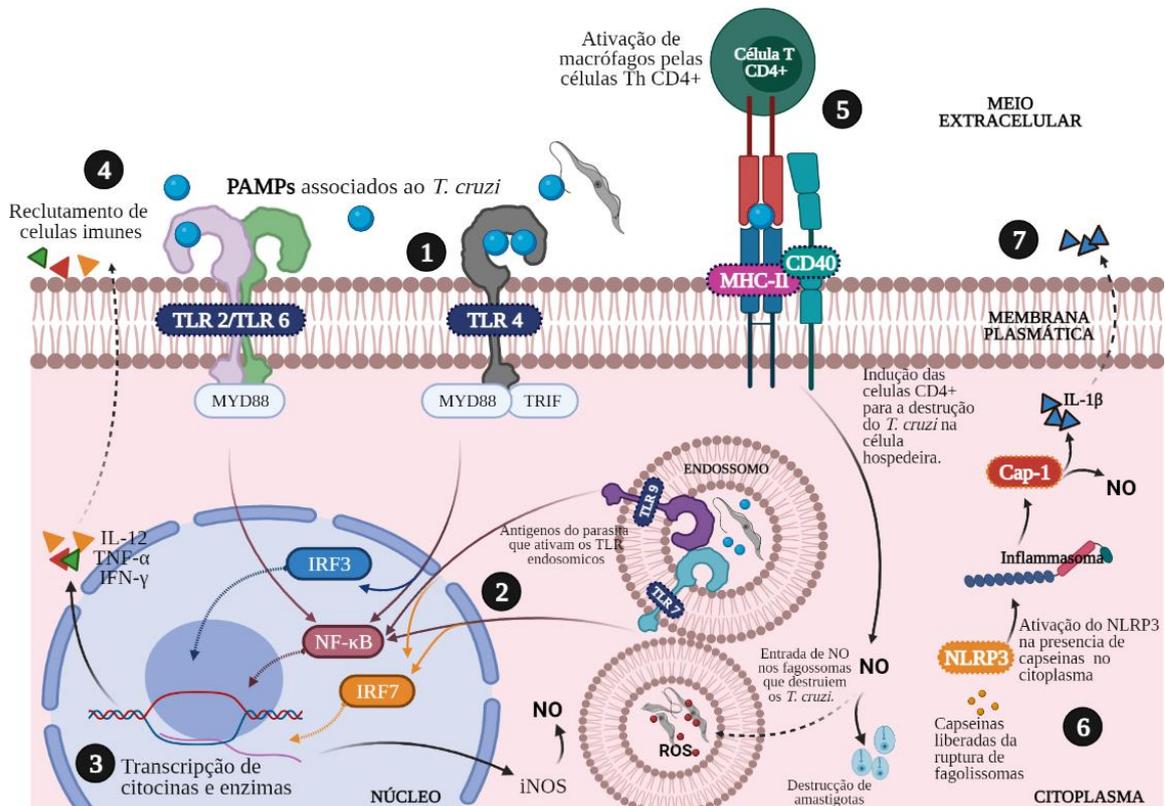


Figura 4 - Resposta imune inicial contra *T. cruzi*.

Fonte: Autoria própria. Imagem elaborada pela autora com BioRender.com.

Legenda: (1) Os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (**PAMPs**) do *T. cruzi* ativam os TLR da membrana plasmática e dos endossomos da célula hospedeira; (2) Os TLR estimulam diferentes fatores de transcrição no núcleo que, (3) levam à transcrição de citocinas pro-inflamatórias e a sínteses da Óxido Nítrico Sintase Induzível (**iNOS**) para a produção de Óxido Nítrico (**NO**); (4) As citocinas proinflamatórias estimulam ao sistema imune para o recrutamento de outras células; (5) Através do Complexo Principal de Histocompatibilidade (**MHC-II**), as células T CD4+ ativam o fagocito para a eliminação das formas do *T. cruzi* dentro da célula por meio da NO. Os NO dentro do endossomo gera Reativos de Oxigeno (**ROS**) que ocasionam dano celular e a morte do parasita; (6) Há produção de NO e IL-1β quando é ativado o **NLRP3**; (7) A IL-1 β sai da célula e inicia processos inflamatórios.

A produção de TNF- α e IFN- γ além de ajudar na ativação de diferentes tipos de células do sistema imune para a eliminação do parasita, também induzem a expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível (**iNOS**), gerando Oxido Nítrico (**NO**) da oxidação do L-arginina no citoplasma. Quando NO entra na fagolisossoma gera Espécies de Reativos de Oxigênio (**ROS**) os quais podem modificar quimicamente as proteínas do *T. cruzi* que contêm cisteína (como a cruzipaina) e/o unir-se às metaloproteínas que mediam os processos metabólicos cruciais do parasita, regulando dessa forma a infecção (Figura 4) (GUTIERRE *et al.*, 2009). No entanto, os TLR podem ser prejudiciais ao hospedeiro, pois ainda que seja importante para o controle do parasita na fase aguda, também podem manter uma secreção constante de citocinas inflamatórias e quimiocinas relacionados a danos teciduais, especialmente no coração, quando há presença de moléculas derivadas de *T. cruzi* (KÖLLIKER-FRERS *et al.*, 2018; PETERSEN; KRUMHOLZ; BURLEIGH, 2005).

Outro grupo de PRR importante na resistência contra *T. cruzi* são os receptores similares ao Domínio de Oligomerização ligante de Nucleotídeo, (NOD)-like receptor (**NLR**), e que a diferencia dos TLR localizados em membranas celulares, estão no citosol das células. Os NLRs estão relacionados com a ativação de Quinases Ativadas por Mitógenos (MAP quinase ou MAPK) e NF- κ B (NOD1 e NOD2) e/ou com a produção de um inflamassoma dependente da capase-1 (Cap-1) (NLRP3) (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Tem demonstrado a grande importância da ativação do inflamassoma pelo NLRP3 dependente da Cap-1 no controle de *T. cruzi* em macrófagos, o qual melhora a produção de NO independente da IL-1 β (Figura 4) (GONÇALVES *et al.*, 2013). GONÇALVES *et al.* (2013) sugerem que a ruptura de fagolisossomas formados após a entrada de *T. cruzi* na célula hospedeira e a liberação de catepsinas no citoplasma ativa os NLRP3 levando ao controle do parasita por meio do NO (Figura 4). Por outro lado, o NLRP3 está correlacionado com doenças cardiovasculares, incluindo a cardiomiopatia gerada na fase crônica da doença de Chagas (BRACEY *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020), através da estimulação da inflamação no miocárdio e da disfunção sistólica por meio da produção da interleucina pro inflamatória IL-1 β (BRACEY *et al.*, 2013).

A liberação das citocinas inflamatórias dadas pelos TLR e os NLR, ativa as Células Dendríticas (CD) que são uma ponte entre o sistema imune inato e a adaptativa dirigindo a resposta a um perfil Th1. A imunidade adquirida mediada pela resposta das células Th1 torna-se crucial no controle da parasitemia e na sobrevivência do hospedeiro. A liberação de IFN- γ pelas células Th1 CD4+ induz a ativação de células fagocíticas para matar o parasita (Figura 4). A imunidade humoral também tem um papel no controle de *T. cruzi* quando os linfócitos

Th1 auxiliam para a produção apropriada de anticorpos (como imunoglobulina G2a (IgG2a) citofílica e fixadora de complemento) e para células T CD8+ citotóxicas, desenvolvendo assim processos de opsonização do parasita e morte celular de tecidos infectados. A ausência genética, ou o bloqueio experimental, de qualquer uma dessas respostas adaptativas (anticorpos, células CD4+ ou CD8+) resulta em níveis descontrolados de parasitos e morte do hospedeiro (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

2.2.4 Tratamento na doença de Chagas

As investigações em camundongos na década de 60 indicaram que certos compostos como o Nifurtimox (**NTX**) e o Benznidazol (**BZL**) tinham atividade contra as formas teciduais de *T. cruzi* e desde então têm sido usados como tratamentos anti-chagásicos (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Mas, o BZL é geralmente preferido ao NTX por causa de seu melhor perfil de tolerabilidade, adsorção no tecido e, possivelmente, eficácia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). O mecanismo de ação do BZL está relacionado à nitro-redução de componentes do parasito, à ligação de metabólitos no DNA nuclear e DNA-k do *T. cruzi* e aos lipídios e proteínas do parasita (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011).

O regime de tratamento recomendado com BZL em humanos é de 5–7 mg/kg por via oral, dividido em duas ou três doses diárias por 60 dias para adultos, e 5–10 mg/kg por via oral, dividido em duas ou três doses diárias por 60 dias para crianças até 12 anos (KRATZ *et al.*, 2018). Doses mais altas de até 15 mg/kg são recomendadas em casos de meningoencefalite. De acordo com alguns relatórios, 30 dias de tratamento podem ser úteis para adultos cronicamente infectados (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Os efeitos adversos mais comuns envolvem hipersensibilidade, principalmente na forma de erupção cutânea (29–50%), intolerância digestiva (5–15%) e sintomas gerais como anorexia, astenia, cefaleia e distúrbios do sono (40%). Neuropatia e depressão da medula óssea são consideradas raras. Devido às reações colaterais, o tratamento é interrompido em 9–29% dos casos, embora essas reações sejam irreversíveis ou graves em menos de 1% dos casos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Ainda que o BZL seja utilizado no tratamento da doença de Chagas desde a década de 1970, existem poucos estudos sobre a biodistribuição desse medicamento (KRATZ *et al.*, 2018). O tratamento padrão com BZL implementado em estudos de quimioterapia de doença de Chagas em modelos murinos é de 100 mg/kg de BZL por 20 dias administrado por via oral uma vez ao dia. Os resultados gerais de sua farmacocinética pré-clínica sugerem que o BZL tem biodisponibilidade quase completa quando é administrado por via oral, com meia vida (t:

1/2) plasmática de 2 a 2,5 horas e ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 50% entre as espécies (KRATZ *et al.*, 2018). Sua biodistribuição é extensa, atingindo órgãos como coração, cólon, baço, cérebro, fígado, pulmões e rins. As análises simultâneas de tecidos e plasma também indica alto metabolismo de BZL no fígado (PERIN *et al.*, 2017).

2.3 EFEITOS DA COINFECCÃO POR *T. cruzi* E *S. mansoni* EM CAMUNDONGOS. ESTUDOS EXPERIMENTAIS.

As infecções por helmintos são altamente prevalentes em áreas tropicais e subtropicais, coexistindo em locais endêmicos para doença de Chagas. No Brasil, o *S. mansoni* circula simultaneamente com *T. cruzi* em mais de 10 Estados, principalmente na região leste do país (BRASIL, 2020, 2014) (Figura 5).

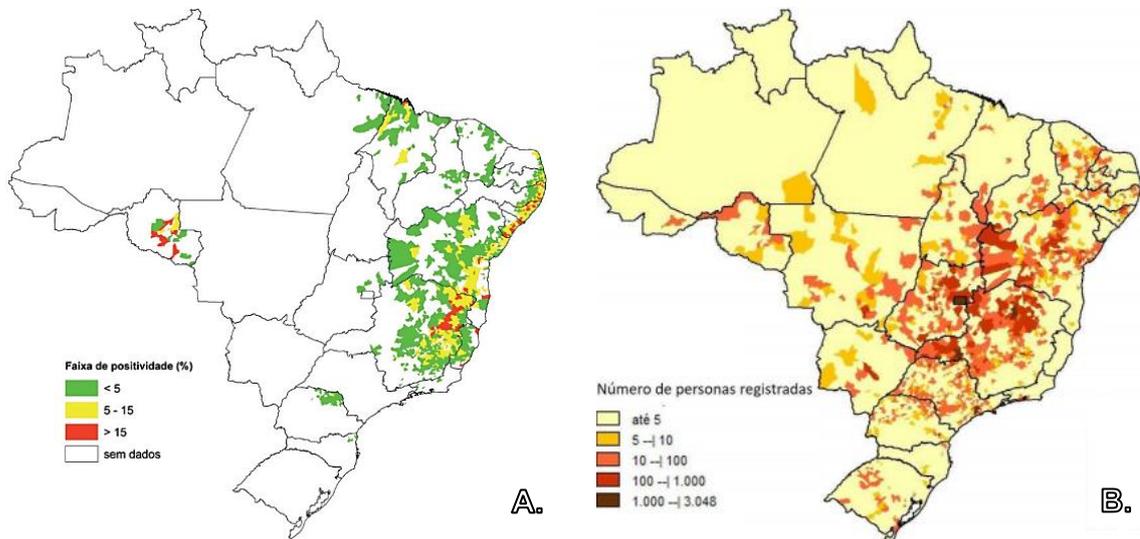


Figura 5 - Distribuição geográfica de *S. mansoni* e *T. cruzi* no Brasil.

Fonte: BRASIL (2020, 2014).

Legenda: **A.** Distribuição do *S. mansoni* segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos; **B.** Distribuição de cadastros autorreferidos para doença de Chagas, segundo município de residência, Brasil, dez/2015.

Embora pareça improvável que haja qualquer interação entre protozoários unicelulares e helmintos multicelulares, em particular porque a maioria deles ocupa locais diferentes no corpo (COX, 2001), as infecções por helmintos podem modular o sistema imunológico do hospedeiro, alterando a polarização Th1/Th2 (SALVADOR *et al.*, 2016).

Em coinfeções experimentais de camundongos, inicialmente com *S. mansoni* e posteriormente com *T. cruzi*, alguns aspectos do desenvolvimento da patogênese parecem estar modificados. A parasitemia do *T. cruzi* apresenta intensificação, chegando a níveis até três vezes maiores que as infecções simples (KLOETZEL *et al.*, 1973; RODRIGUES *et al.*, 2017). Enquanto as esplenomegalias desenvolvidas pelos camundongos nessas coinfeções, o peso do

baço excede o de infecções simples por *S. mansoni*, chegando a valores superiores ao 3% do peso corporal (KLOETZEL *et al.*, 1973).

Há um aumento percentual da quantidade de vermes adultos recuperados nas veias mesentéricas e diminuição do número de vermes do sistema porta em camundongos com coinfeções de *S. mansoni* e *T. cruzi* (KLOETZEL *et al.*, 1973). Além disso, a maturação dos ovos é retardada (TELLES, 1990) embora sua oviposição e morfologia não sejam modificadas (KLOETZEL *et al.*, 1973).

Em alguns estudos foram detectados efeitos imunossupressores das espécies de *Trypanosoma* (*Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*) na formação de granulomas hepáticos de *S. mansoni* em camundongos, influenciando em seus tamanhos (redução de até 50% no tamanho dos granulomas) (FAGBEMI; CHRISTENSEN; DIPEOLU, 1987; GENARO; BRENER; COELHO, 1986). Mostrando que a doença de Chagas tem efeito direto na imunidade celular (GENARO; BRENER; COELHO, 1986; TELLES, 1990). Ainda que, o estudo de TELLES (1990) contraste com os resultados desses trabalhos, apresentando granulomas maiores nos grupos coinfectados.

Em relação ao perfil imunológico desenvolvido nessas coinfeções, um estudo recente com *T. cruzi* e *S. mansoni*, mostrou níveis semelhantes de IL-4 nos tecidos em animais coinfectados e infectados apenas por *S. mansoni*, que foram reduzidos no coração e aumentados no fígado em comparação com animais infectados unicamente por *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 2017). Como o fígado é o alvo primário do *S. mansoni*, mas não do *T. cruzi*, níveis aumentados de IL-4 são observados na fase crônica da esquistossomose, que é associada ao controle homeostático da resposta imune celular mediada pelo perfil Th2. Houve uma síntese reduzida de citocinas Th1 (sobretudo IFN- γ) observada em animais coinfectados que foi relacionada à regulação negativa da expressão de iNOS e da produção de NO, especialmente no tecido do fígado (RODRIGUES *et al.*, 2017). *In vivo*, o IFN- γ desempenha um papel fundamental na ativação do iNOS e na produção de NO pelos macrófagos, uma molécula chave contra o *T. cruzi* (TEIXEIRA *et al.*, 2011). RODRIGUES *et al.* (2017) concluem que, além de afetar o controle da inflamação granulomatosa, parasitemia e parasitismo do *T. cruzi* em animais coinfectados, a resposta inflamatória Th2 contra *S. mansoni* provoca a ativação da via arginase-1 em detrimento da expressão de iNOS e produção de NO, que contribui para danos ao fígado, com efeitos menores na patologia cardíaca.

3 JUSTIFICATIVA.

Algumas das pesquisas enfocadas no tratamento com o benznidazol para a doença de Chagas têm como objetivos elucidar fatores como sua farmacocinética, a eficácia do BZL nas diferentes fases da doença, quando é administrada em diferentes dosagens, em combinação com outros fármacos ou substâncias e sua eficácia contra as diferentes cepas/DTUs do *T. cruzi*. Tais estudos também têm avaliado o nível de tolerância com respeito à idade do paciente, estado físico e/ou condições de saúde e os aspectos envolvidos na resposta imune na presença do BZL, entre outros. Entretanto, apesar de que a doença de Chagas se desenvolve majoritariamente em regiões do mundo onde as condições sociais e econômicas são precárias e associadas a uma alta prevalência de outras parasitoses, não existem estudos que tenham avaliado o comportamento do BZL para tratar doença de Chagas em situações de coinfeção com outros parasitos, exceto algumas pesquisas onde tem analisado a eficácia do fármaco em pacientes com HIV ou AIDS.

O *T. cruzi* compartilha áreas endêmicas com o *S. mansoni*, agente etiológico da esquistossomose, que afeta o funcionamento de órgãos que são chaves na absorção e metabolização de fármacos administrados via oral, envolvendo mudanças na farmacocinética dos mesmos, em especial na fase crônica da infecção. Assim, pretendemos com o presente trabalho aportar conhecimento sobre a resposta do BZL quando este é administrado em camundongos coinfectados experimentalmente com o *T. cruzi* e o *S. mansoni*, almejando contribuir para o direcionamento do tratamento e na tomada de decisões em regiões com a presença de ambos parasitas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar influência da infecção crônica por *S. mansoni* na resposta à quimioterapia específica contra a infecção experimental aguda por *T. cruzi*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a influência da infecção crônica por *S. mansoni* sobre a parasitemia e parasitismo cardíaco em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados ou não com benznidazol, na fase aguda da infecção.
- b) Analisar a influência da infecção crônica por *S. mansoni* na produção de citocinas em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados ou não com benznidazol.
- c) Avaliar a influência da infecção crônica por *S. mansoni* sobre o remodelamento morfológico cardíaco, hepático, intestinal e no baço em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados ou não com benznidazol.
- d) Avaliar o remodelamento e formação de granulomas hepáticos, pulmonares e intestinais crônicos de *S. mansoni* em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados ou não com benznidazol.
- e) Avaliar a influência da infecção crônica por *S. mansoni* na concentração plasmática do benznidazol em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados com benznidazol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E ÉTICA

Para o procedimento *in vivo* foram usados camundongos isogênicos (*inbred*) da linhagem *Balb/c*, utilizados principalmente em imunologia, produção de anticorpo monoclonal, farmacologia e toxicologia (UFMS, 2020). Os camundongos foram obtidos no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Rene Rachou, os quais foram mantidos em um ambiente controlado (temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, umidade de 60-70% e ciclos reversos de claro/escuro de 12 h) e alimentados com ração comercial e água “*ad libitum*” no biotério da Universidade federal de Alfenas (UNIFAL-MG) após o primeiro mês da infecção com *S. mansoni*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG com número de registro 33/2019.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTO *IN VIVO*.

5.2.1 Grupos experimentais

Levando-se em consideração os procedimentos aos quais todos os camundongos seriam submetidos, 66 camundongos fêmeas foram distribuídos em seis grupos experimentais como mostrado na **Tabela 1**. Porém, o grupo controle sem infecção (G1) e o grupo com infecção simples tratado (G4), nos quais não era esperada a ocorrência de mortalidade, foram os grupos com menor número de camundongos, e os infectados sem tratamento e os grupos coinfectados com o maior número de camundongos.

Tabela 1 - Características dos grupos experimentais.

GRUPO EXP.	ABREVIATURA	CARACTERÍSTICAS DO GRUPO	N.
1	G1	Controle não infectado	8
2	G2	Infectado com <i>S. mansoni</i>	13
3	G3	Infectado com <i>T. cruzi</i>	11
4	G4	Infectado com <i>T. cruzi</i> e tratado com benznidazol	8
5	G5	Infectado com <i>S. mansoni</i> e <i>T. cruzi</i>	14
6	G6	Infectado com <i>S. mansoni/T. cruzi</i> e tratado com benznidazol	12
Total			66

Fonte: Próprio.

Legendo: GRUPO EXP.: Grupo experimental; N° DE IND.: Número de indivíduos.

5.2.2 Procedimento *in vivo*

O procedimento *in vivo* teve uma duração de 118 dias entre o nascimento dos camundongos até a eutanásia dos animais e coleta do material. Para uma melhor compressão dos procedimentos feitos nesta fase e os tempos usados, na **Figura 6** está representado o desenho experimental *in vivo*. Para geração de vários gráficos dos resultados foram usados os tempos das infecções e não a idade dos camundongos. Ambos tempos são mostrados na figura.

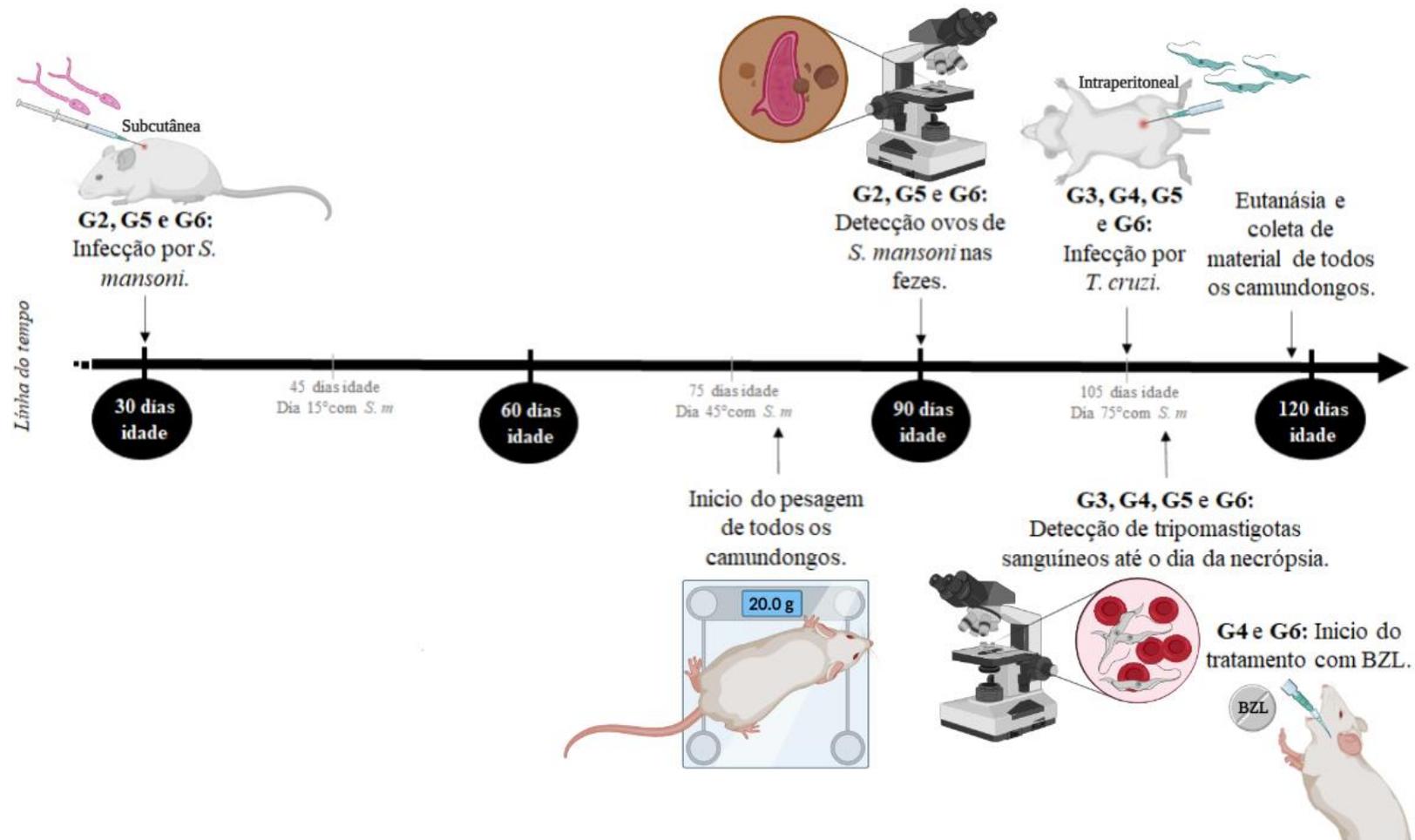


Figura 6 - Desenho experimental *in vivo*.

Fonte: Autoria própria. Imagem elaborada pela autora com BioRender.com.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Os tempos das infecções foram: 88 dias com *S. mansoni*, 13 dias com *T. cruzi* (últimas duas semanas do experimento) e 9 dias de tratamento com benznidazol (BZN) (início do tratamento 4 dias após infecção com *T. cruzi*). A linha do tempo está representada pela idade (em dias) dos camundongos. *S.m*: *S. mansoni*.

A continuação descreve os procedimentos da fase *in vivo* mostradas na **Figura 6**:

5.2.2.1 Características dos parasitas e infecções experimentais

Aos 30 dias de vida, os animais dos grupos 2, 5 e 6 foram inoculados por via subcutânea com aproximadamente 25 cercárias da cepa LE no Moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) (Figura 6). As cercárias foram obtidas por exposição à luz de caramujos *B. glabrata* infectados por aproximadamente 2 horas a fim de permitir a liberação delas. A cepa LE de *S. mansoni* foi isolada por J. Pellegrino das fezes de um paciente infectado em Belo Horizonte há mais de 50 anos. Em camundongos, a cepa LE tem um período pré-patente de aproximadamente 43 dias com aparecimento de ovos nas fezes após este período (ARAÚJO *et al.*, 1986).

Por outro lado, para as infecções experimentais com *T. cruzi*, foi usada a cepa Y, mantida no biotério da UNIFAL-MG por meio de passagens sanguíneas sucessivas em camundongos. Aos 105 dias de idade, foram inoculados intraperitonealmente 2500 formas tripomastigotas sanguíneas nos animais dos grupos 3, 4, 5 e 6 (Figura 6). A Cepa Y pertencente à DTU II, foi extraída em São Paulo, Brasil, por Silva e Nussenzweig em 1953 de um paciente com a doença de Chagas em fase aguda (FILARDI; BRENER, 1987). A cepa Y é considerada parcialmente resistente *in vivo* ao BZL e NFX (FILARDI; BRENER, 1987) e quando é administrado um inoculo de 5000 parasitas, apresenta um alto pico de parasitemia no oitavo dia de infecção de camundongos (SILVA *et al.*, 2012).

5.2.2.2 Detecção de parasitas

Para a confirmação das infecções com *S. mansoni*, foi feito um exame coprológico para a visualização direta dos ovos em amostras fecais dos camundongos dos grupos infectados (G2, G5 e G6), 8 semanas após infecção com o parasita (Figura 6). Para isso, cada camundongo foi colocado em uma vasilha de plástico até que defecassem.

As amostras de fezes foram colocadas em tubos eppendorf com formol tamponado 10% com pH de 7.12. Com ajuda de uma ponta de ponteira de plástico, as amostras de fezes foram maceradas. Depois que a fezes se dissolveram no líquido, foram guardadas no refrigerador a 4 °C para as análises microscópicas.

Com a utilização de uma micropipeta foram coletados 200 µL da solução a qual foi colocada em uma lâmina e coberta com uma lamínula. As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz (Olympus CX40) para detecção dos ovos do parasita.

Em relação ao *T. cruzi*, a parasitemia do protozoário nos animais dos grupos 3, 4, 5 e 6 foi realizada diariamente até o dia do sacrifício (Figura 6). Foram contados os parasitas sanguíneos em 50 campos aleatórios com uma amplificação de 40× em microscópio de luz (Olympus CX40) (BRENER, 1962). Para isso, 5 µl de sangue foram coletados com uma micropipeta de 2 a 20 µl através de uma incisão na ponta da cauda dos camundongos. O sangue foi colocado em uma lâmina e coberto com uma lamínula de 22 x 22 mm para a visualização no microscópio.

5.2.2.3 Tratamento com benznidazol

Após a infecção pelo *T. cruzi* ser confirmada quatro dias depois do inóculo, começou o tratamento com BZL para os grupos 4 e 6 (Figura 6). O regime de tratamento consistiu na administração de 100mg/kg diários por 9 dias consecutivos (CALDAS *et al.*, 2008). Foram usados comprimidos de BZL do Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) que foram macerados e suspensos em 10 mL de água destilada, utilizando carboximetilcelulose como agente suspensivo e administrado por gavagem.

5.2.2.4 Mensuração do peso

Os camundongos de todos os grupos foram pesados com ajuda de uma balança eletrônica (*Marte Científica*. Modelo BL3200H; Capacidade: 3200g; Sensibilidade: 0,01g). A mensuração do peso começou um mês antes da infecção por *T. cruzi*, sendo até então registrada uma vez por semana (Figura 6). Depois da infecção, a mensuração mudou de frequência, passando a ser realizada de dois em dois dias até o sacrifício dos animais.

Os dados foram tabulados em Microsoft Excel para posteriores análises de comparação.

5.2.2.5 Mortalidade

Para fazer a avaliação da mortalidade dos camundongos expostos às diferentes condições experimentais, foram registradas as mortes e suas datas correspondentes durante o curso de todo o experimento *in vivo* (Figura 6).

5.2.2.6 Necropsia e coleta das amostras

5.2.2.6.1 Coleta de sangue

Antes da necropsia, foram extraídas amostras de sangue dos camundongos dos grupos tratados com BZL no último dia do experimento *in vivo* para comparação da concentração do

BZL no plasma entre os grupos tratados (ver 5.6 ANÁLISES DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO BZL.) (Figura 6). Em diferentes horários após a administração do tratamento (T1: 1h e 20min, T2: 2h e 20min e T3: 3h e 20min), foi coletado sangue de todos os camundongos dos grupos 4 e 6 pelo plexo retro-orbital com o auxílio de uma pipeta Pasteur contendo heparina. 200 µL de sangue de cada coleta foram depositadas em tubos eppendorf.

Além da coleta do sangue para a análise da quantificação do BZL no plasma, também foram extraídos 200 µL de cada camundongo de todos os grupos para a dosagem de citocinas (ver 5.4 ANÁLISES DA DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS).

Todas as amostras de sangue foram centrifugadas à 3,500×g, 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi coletado e armazenado a -80 °C até o momento das análises.

5.2.2.6.2 *Eutanásia e extração de órgãos*

Depois das coletas de sangue, os animais foram eutanasiados utilizando a inalação de isoflurano concentrado (Figura 6). Para isso, os camundongos foram presos em uma cuba contendo algodão embebido de isoflurano.

Para a extração do coração, fígado, intestinos e pulmão, foi feita uma toracotomia e laparotomia mediana. Os baços e os fígados foram pesados em uma balança. Também foram tiradas amostras do coração e guardas em -80°C para posteriores análises de parasitismo cardíaco (5.5 ANÁLISES DO PARASITISMO TECIDUAL POR PCR). Por último, todos os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 10% por 48h.

5.3 HISTOLOGIA

5.3.1 **Processamento histológico**

Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol. Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina. No caso do intestino, os fragmentos foram seccionados transversalmente antes da parafina (ALENCAR *et al.*, 2012).

Para cada órgão foram obtidos em micrótomo rotativo 3 cortes semi-seriados com 5 µm de espessura feitos em intervalos de 100 µm para evitar analisar a mesma área histológica. As seções dos órgãos foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica geral (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

5.3.2 Análise histopatológica e estereológica

Para a visualização das lâminas histológicas foram obtidas imagens digitais a partir de cada corte utilizando-se uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio de luz (Axio Scope.A1) e para a captura das imagens foi usado o software AxioVision (Carl Zeiss, Germany).

A continuação refere-se às análises estereológicas e histopatológicas realizadas:

- Foram contados os núcleos celulares no tecido cardíaco e hepático para estimar o processo inflamatório nesses órgãos produto das infecções utilizando o software Image-Pro® plus 4.5. Para determinar a densidade do número de células nos tecidos foi usada a fórmula $d_{cel} = \sum_{cél} / A_t$, onde $\sum_{cél}$ representa o somatório do número de perfis de núcleos de células e A_t corresponde à dimensão da área de teste utilizada ($5,9875 \times 10^4 \mu m^2$). A densidade celular foi avaliada usando 10 campos histológicos por camundongo com uma objetiva de 40× (ampliação de 400×) perfazendo uma área total de $5,9875 \times 10^5 \mu m^2$ para cada animal (NOVAES *et al.*, 2013). No caso dos animais pertencentes aos grupos 2, 5 e 6, as fotos foram tiradas em campos distanciados dos granulomas gerados pelos ovos de *S. mansoni* para as análises. O fígado foi o único órgão onde foi feita a distinção entre células do tecido (hepatócitos) e células infiltradas (células intersticiais) para a geração de gráficos.
- Para complementar, foi realizada a análise qualitativa da miocardite, onde foram realizadas visualizações das lâminas histológicas do coração em um microscópio de luz (Axio Scope.A1). Para evitar pré-julgamentos, os rótulos das lâminas foram cobertos antes das observações. A intensidade da infiltração celular, sinais de danos teciduais e/ou de fibrose foram registrados.
- Para as análises do intestino, imagens microscópicas aleatórias foram capturadas para cada animal utilizando microscópio de campo claro acoplado com lente objetiva de 20x (ampliação de 200x). As imagens foram analisadas de forma comparativa, considerando as características microestruturais dos animais não infectados como a morfologia intestinal típica. Assim, foram analisadas as seguintes características na análise histopatológica: i) tamanho e largura das vilosidades intestinais, ii) morfologia e distribuição de enterócitos e células caliciformes, iii) espessura e celularidade das camadas da parede intestinal, iv) características das células do infiltrado inflamatório,

v) retenção de ovos de *S. mansoni*, vi) presença, distribuição, tamanho e estágio evolutivo dos granulomas esquistossomóticos (ALENCAR *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2017).

- O número de granulomas esquistossomóticos foi realizado usando a fórmula $N^{\circ}gran = \sum g / At$, onde $\sum g$ representa somatório do número de perfis de granulomas e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($7,01375 \times 10^5 \mu m^2$). A $dgran$ foi estimada contando os granulomas (com ovo visível) em 10 campos histológicos aleatórios para cada animal obtidos com a utilização de lente objetiva de $10\times$ (ampliação de $100\times$), perfazendo uma área tecidual total de $7,01375 \times 10^6 \mu m^2$ para cada grupo.
- A área dos granulomas foi determinada usando a ferramenta de contorno do software de imagens Image-Pro® plus 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) como se observa na **Figura 7**, analisando 10 granulomas por animal. As medidas de área foram realizadas nos granulomas em que o ovo de *S. mansoni* foi claramente observado (REIS *et al.*, 2001). Foi utilizada uma objetiva de $20\times$ (ampliação de $200\times$).

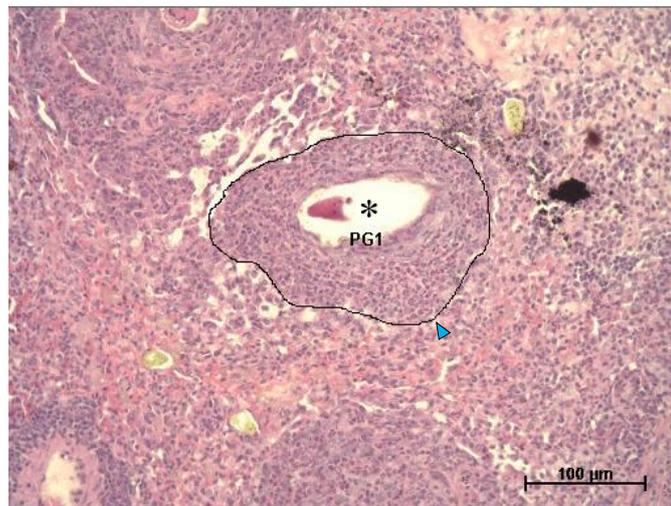


Figura 7 - Representação da medida da área granulomatosa realizada no software Image-Pro® plus 4.5.

Fonte: Próprio.

Legenda: Foto tirada em aumento de $20\times$. A seta indica área do granuloma usando a ferramenta de contorno. (*) ovo de *S. mansoni*. Lâmina com método de coloração por Hematoxilina-Eosina.

- Para medir a densidade celular dos granulomas hepáticos, foram tiradas fotos da periferia de 10 granulomas por camundongo em aumento de $100\times$. Com o programa Image-Pro® plus 4.5 foi delimitado a área correspondente ao granuloma (foi excluído o ovo e zonas do tecido sem inflamação) e, posteriormente, contadas as células mononucleares e polimorfonucleares como se observa na **Figura 8**. Com esses dados foi calculado a densidade celular no granuloma usando a fórmula $d_{cel} = \sum c_{\text{cél}} / At$, onde

$\Sigma_{cél}$ representa somatório das células mononucleares e polimorfonucleares contadas e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada (área resultante da medição no programa Image-Pro®). E as porcentagens por tipo celular foi calculada usando a fórmula $\% cel = (\Sigma_{tipo\ cél} / \Sigma_{total}) \times 100\%$, onde $\Sigma_{tipo\ cél}$ corresponde à somatória por tipo de célula (mono ou polimorfonuclear) e a Σ_{total} obedece a soma de todas as células contadas.

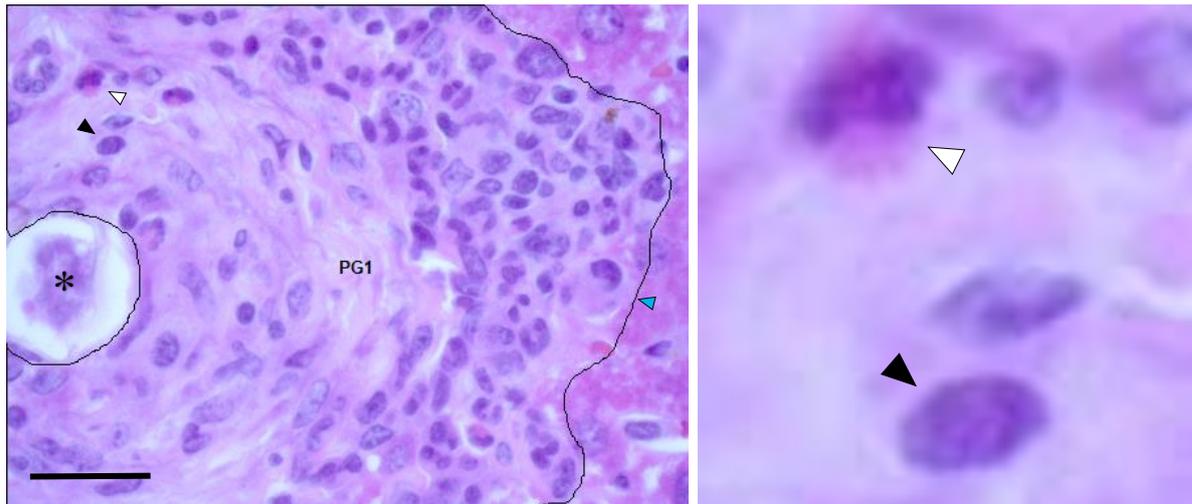


Figura 8 - Representação da medida de densidade celular de um granuloma no software Image-Pro® plus 4.5. Fonte: Próprio.

Legenda: Foto tirada em aumento de 100× (Barra: 20 μ m). As setas indicam área do granuloma usando a ferramenta de contorno (azul), uma célula polimorfonuclear (branca) e mononuclear (preta). (*) Ovo de *S. mansoni*. Lâmina com método de coloração por Hematoxilina-Eosina.

5.4 ANÁLISES DA DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

Os testes das dosagens de citocinas foram feitos em parceria com a Professora Reggiani Vilela Gonçalves da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para estas análises foram quantificadas as citocinas Interferon- γ (**IFN- γ**), Fator de Necrose Tumoral- α (**TNF- α**), Interleucina-2 (**IL-2**), Interleucina-4 (**IL-4**), Interleucina-10 (**IL-10**) e Interleucina-17 (**IL-17**) usando o Kit BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17, o qual tem a capacidade de detectar simultaneamente citocinas através do método de captura de um conjunto de analitos com esferas de tamanho e fluorescência conhecidos. O reagente de detecção do kit é uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE), que fornece um sinal fluorescente em proporção à quantidade de analito ligado. A preparação e procedimentos do teste foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

Para a quantificação dos analitos ligados foram geradas curvas padrões com diluições conhecidas de cada citocina proporcionadas pelo kit, possibilitando a construção de gráfico de

intensidade do PE através de citometria de fluxo (CBA, Cytometric Bead Array). A equação gerada a partir desse gráfico possibilitou o cálculo da concentração de citocinas nas amostras do plasma.

5.5 ANÁLISES DO PARASITISMO TECIDUAL POR PCR

Os testes do parasitismo cardíaco foram feitos em parceria com os doutores Gilson Faria e Sérgio Caldas, associados ao Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Brasil.

5.5.1 Extração de DNA de tecido cardíaco de camundongos

Cerca de 30 mg de tecido cardíaco de cada camundongo foi levado ao macerador automatizado Fastprep-24 5G (MP Biomedicals), em microtubos de maceração contendo uma esfera (matriz de lise SS) e 50 µL de PBS estéreis. Após a maceração as amostras foram submetidas à extração de DNA com o kit ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System (Promega), conforme procedimentos descritos abaixo, adaptados para a extração de DNA de tecido cardíaco. Assim, sobre cada amostra foi adicionado 150 µL de PBS estéril e 20 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL), seguido de homogeneização por cerca de 10 segundos em agitador de tubos.

Posteriormente, 200 µL de tampão de lise celular foram adicionados às amostras, procedendo-se nova homogeneização e incubação a 56° C, por 120 minutos. Decorrido o tempo de incubação, 250 µL de tampão de ligação foram adicionados em cada amostra, a qual foi homogeneizada novamente por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas em temperatura ambiente (T.A.) por 1 minuto a 16.000 x g, sendo o sobrenadante transferido para colunas de ligação (ReliaPrep), previamente identificadas e posicionadas em tubos coletores, os quais foram centrifugados nas mesmas condições anteriores, seguido do descarte do tubo coletor contendo o filtrado e substituição por novos coletores. Em seguida foram realizadas três lavagens das colunas, utilizando-se 500 µL de solução de lavagem e centrifugação (16.000 x g, 3 min., T.A.).

Finalmente, os tubos coletores foram substituídos por microtubos estéreis, sendo o DNA eluído em 200 µL de água livre de nucleases após centrifugação (16.000 x g, 1 min., T.A.). Os DNA obtidos foram armazenados a -20° C, até serem requeridos para a PCR em tempo real quantitativa (qPCR).

5.5.2 Padronização de estratégia de quantificação de DNA pelo método do ciclo threshold (Ct) comparativo

Curvas padrão foram geradas a partir de concentração conhecida de DNA proveniente de formas epimastigotas da Cepa Y do *T. cruzi* misturado ao DNA genômico proveniente de tecido cardíaco de camundongo não infectado. Assim, o limite de quantificação e eficiência de amplificação da qPCR foram determinados por meio de curvas padrão geradas a partir de 2×10^1 parasitos-equivalentes/ μL em 2×10^1 unidades arbitrárias/ μL de DNA de tecido cardíaco (25 ng/ μL de DNA de tecido cardíaco) submetidos a cinco diluições seriadas (1:10) (i) em água, resultando nas curvas padrão para o DNA do parasito e para o DNA do controle endógeno utilizado (TNF- α), bem como (ii) em DNA de tecido cardíaco de camundongos não infectados (curva padrão para o DNA do parasito em DNA constante de tecido cardíaco de camundongo).

A estratégia de quantificação utilizada foi baseada na padronização de um método Ct comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$) seguido da conversão dos dados de quantificação relativa para dados de parasito-equivalente/25 ng de DNA tecidual. Uma vez validado o método Ct comparativo, as cargas de parasito foram facilmente estimadas usando um calibrador com quantidade conhecida de DNA do parasito e do tecido cardíaco em todas as placas de qPCR, dispensando a necessidade de utilização de uma curva padrão em cada placa. Assim, o software do termociclador *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*) calcula automaticamente a quantificação relativa de DNA de parasito/DNA de tecido cardíaco das amostras investigadas em relação à amostra de referência (calibradora), a qual, por ter a concentração de parasito/DNA de tecido cardíaco conhecida, permite a conversão dos dados relativos para dados quantitativos.

5.5.3 PCR em tempo real quantitativa

Previamente à PCR em tempo real quantitativa (qPCR), as amostras de DNA foram dosadas em espectrofotômetro (Nanodrop 200, Thermo Scientific) e diluídas para 25 ng/ μL . Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 μL de DNA genômico, 0,35 μM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a repetição de 195 pares de bases (pb) do DNA do *T. cruzi*, TCZ-F 5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C, e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', [(MOSER D.R.; KIRCHHOFF L.V.; DONELSON J.E, 1989), modificado por CUMMINGS; TARLETON, 2003] o qual amplifica um produto de 182 pb, 5 μL de *Sybr®Green PCR Mastermix*, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10 μL .

Separadamente, para cada amostra foi também realizada uma reação em duplicata para dosar o TNF- α , utilizado como controle endógeno normalizador, contendo 2 μ L de DNA genômico, 0,35 μ M de oligonucleotídeos iniciadores TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3' (CUMMINGS; TARLETON, 2003), o qual amplifica um produto de 170 pb, 5 μ L de *Sybr® Green PCR Mastermix*, e água *Milli-Q* para um volume final de reação de 10 μ L. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (*Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL*, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200 x g e levadas ao termociclador *StepOnePlus (Applied Biosystems)*. O programa de termociclagem consistiu de aquecimento a 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 94° C por 15 segundos e 64,3° C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência a 64,3° C.

A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de *melting* com desnaturação inicial a 95° C por 15 segundos, resfriamento a 60° C por 1 minuto e aumento gradual de temperatura de 0,3° C/s até 95° C. Cada placa continha uma amostra de referência (calibrador) e um controle negativo de PCR, com água ao invés de DNA.

5.6 ANÁLISES DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO BZL.

Os testes das dosagens plasmáticas do BZL foram feitos em parceria com a Professora Cláudia Martins Carneiro e pela doutoranda Lorena Cera Bandeira do laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Foi usado como solução de padrão analítico o BZL e como padrão interno o OMEPRAZOL (OPZ) em acetonitrila. As amostras de plasma centrifugadas foram adicionadas ao OPZ e foram preparadas mediante extração líquido-líquido com acetato de etilo, agitação com vórtex e centrifugação (PERIN, 2015; PERIN *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2020).

Depois, as amostras foram colocadas no concentrador de amostras CHRIST® em temperatura de 40°C durante 60 minutos. Quando retiradas do equipamento, as amostras secas foram ressuspensas com 100 μ L de fase móvel, agitadas em Vórtex IKA® Genius 3 durante 1 minuto e centrifugadas durante 5 minutos a 14000 rpm. Em seguida, foram transferidos 80 μ L do sobrenadante para os vials de vidro e plástico de 300 μ L que, posteriormente, foram levados para a análises High Performance Liquid Chromatography (PERIN, 2015; PERIN *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2020).

5.6.1 Análises em High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

As amostras foram analisadas por HPLC (E2695; Waters, Milford, MA) com um detector de UV (Waters 2489) usando uma coluna analítica C18 (Gemini-NX; Phenomenex, Torrance, CA; 150 mm por 4,6 mm por 5 m) e um C18 guarda de coluna (modelo AJ0-4287; Phenomenex; 4 mm por 3 mm por 5 m) mantida a 40 ° C. A fase móvel foi composta por uma mistura isocrática de acetonitrila e água ultrapura (30:70, vol / vol) com uma caudal de 1,0 mL/min. A detecção foi monitorada a 324 nm e o volume de injeção foi de 20µL (PERIN, 2015; PERIN *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2020).

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estadísticas e a geração de gráficos, foi usado o software GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média ± DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. A variância dos dados obtidos dos grupos investigados foi avaliada por meio de análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos neste estudo.

6.1 A INFECÇÃO POR *T. cruzi* PROMOVE A PERDA DE PESO DOS ANIMAIS E O BZL EVITA ESTA PERDA MESMO QUANDO COINFECTADOS POR *S. mansoni*.

As pesagens dos camundongos começaram um mês antes das infecções com *T. cruzi* serem realizadas e continuaram até o dia da necropsia dos animais. Considerando os dados do primeiro dia de pesagem individual dos camundongos, foi feito o cálculo do ganho médio de peso por grupo experimental mostrados na **Figura 9**.

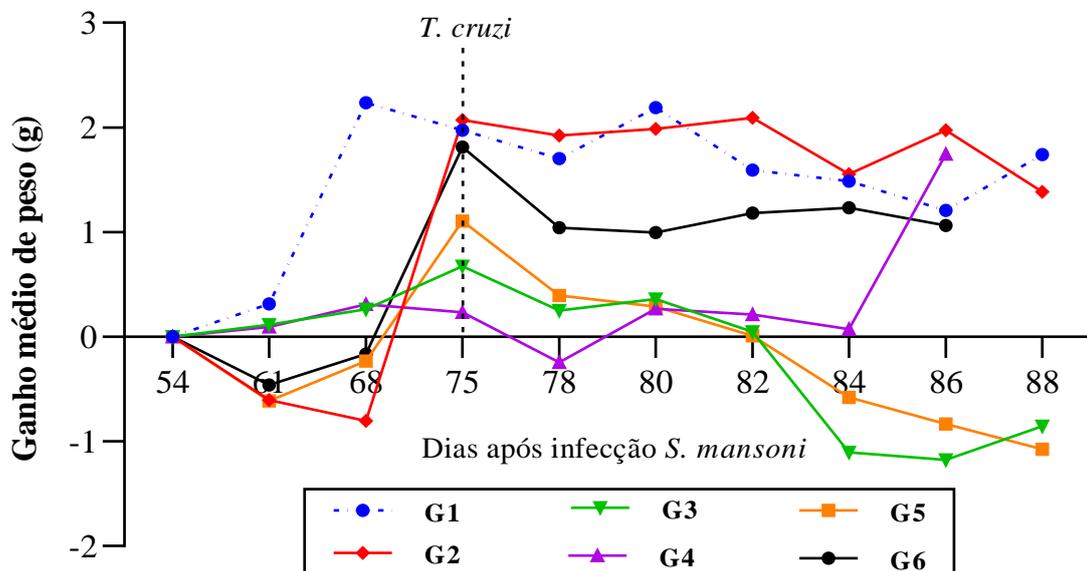


Figura 9 - Ganho de peso dos camundongos após infecção com 2500 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* em relação ao primeiro dia de pesagem.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. A linha descontínua representa o dia do começo da infecção por *T. cruzi*.

Durante o período de avaliação, foi observado que o benznidazol foi capaz de prevenir a perda de peso nos animais tanto do grupo 4 (G4) como do grupo 6 (G6). Ao contrário, os animais dos grupos 3 (G3) e 5 (G5) perderam peso progressivamente após o inóculo com *T. cruzi*, sendo mais acentuada a perda por volta do 8º dia de infecção (83º dias após infecção *S. mansoni*). Os pesos dos animais do grupo 1 (G1) e do grupo 2 (G2) foram estáveis e superiores aos demais grupos durante o tempo das pesagens (Figura 9).

6.2 NÃO FOI OBSERVADA MORTALIDADE ENTRE OS ANIMAIS TRATADOS COM BZL E A COINFECCÃO NÃO ACENTUOU A MORTALIDADE ENTRE OS CAMUNDONGOS.

Na **Tabela 2** estão representadas as porcentagens de mortalidade durante o experimento *in vivo*. O segundo pico de mortes dos camundongos levou à interrupção da fase *in vivo* no dia 118 (88 dias de infecção com *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*), onde decidimos por prosseguir com a eutanásia dos animais e coleta do material. A mortalidade não superou valor maior aos 23% em nenhum grupo e apenas animais infectados com *S. mansoni* morreram. Os primeiros registros de mortalidade foram relatados no G2 horas antes da infecção por *T. cruzi* no dia 75 (3 de 13 animais) e após esse dia, a mortalidade não variou nesse grupo, se mantendo em 23%. Observamos que nenhum dos camundongos do G6 morreram após a infecção pelo protozoário e/ou início do tratamento, contrário do G5, onde foi observada mortalidade de 3 camundongos no 88º dia (3 de 14 animais), portanto com mortalidade de 21%. Não foram registradas mortes entre os animais do G1, bem como nos camundongos infectados unicamente pelo *T. cruzi*, pertencentes aos grupos 3 e 4.

Tabela 2 - Mortalidade de camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*, por *S. mansoni* ou coinfectedos e submetidos ou não ao tratamento com benznidazol.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	TOTAL
Camundongos mortos/total	0/8	3/13	0/11	0/8	3/14	0/12	6/66
Dia da morte após infecção com <i>S. mansoni</i> (idade camundongos)	SD	75 (105)	SD	SD	88 (118)	SD	
% Mortalidade	0	23.08	0	0	21.43	0	

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectedos e G6: Animais coinfectedos e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. SD: Sem dado.

6.3 A PARASITEMIA POR *T. cruzi* É MAIS ELEVADA ENTRE CAMUNDONGOS COINFECTADOS E O BZL É CAPAZ DE REDUZIR A PARASITEMIA MESMO NESTA CONDIÇÃO.

Na **Figura 10** estão representadas as curvas de parasitemia dos animais infectados só por *T. cruzi* e dos coinfectedos com *S. mansoni*. O tratamento com BZL foi eficaz tanto no grupo com infecção apenas com *T. cruzi* quanto no coinfectedo, pois suprimiu o parasitismo sanguíneo independente da infecção por *S. mansoni*. Assim, os grupos 4 e 6 mantiveram uma

baixa parasitemia de *T. cruzi*, quase imperceptível, em comparação aos grupos 3 e 5, até o final do experimento.

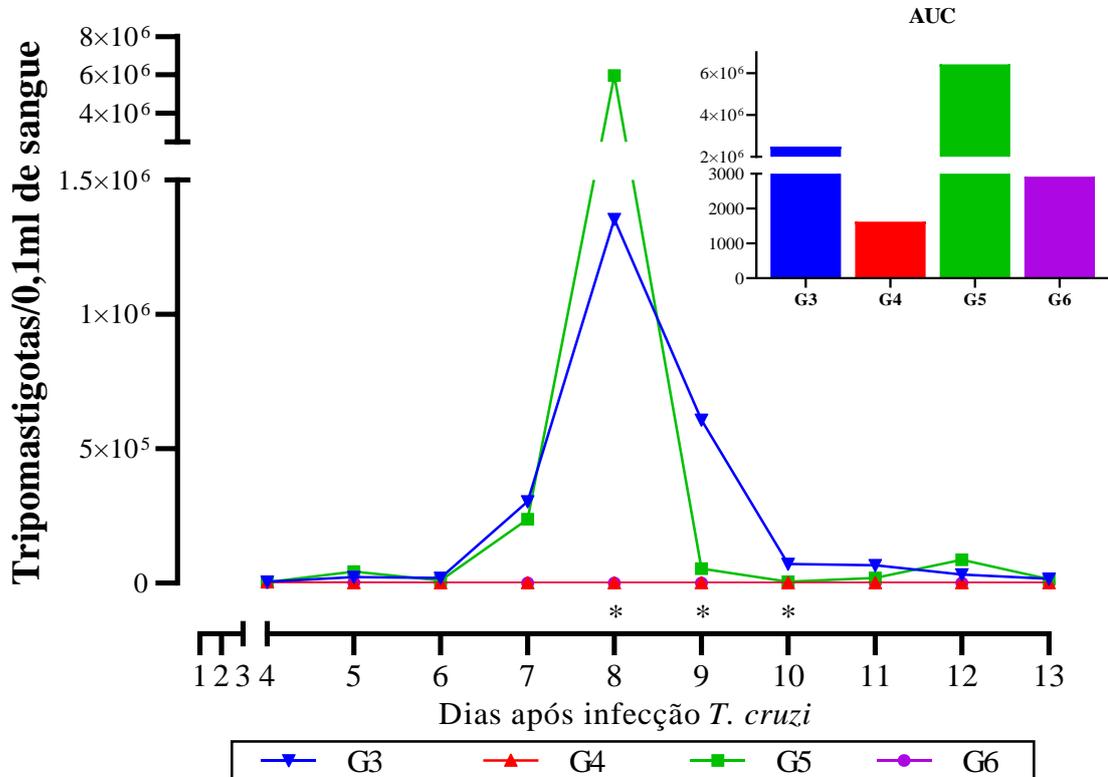


Figura 10 - Curvas de parasitemia de camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* ou coinfectados com *S. mansoni* e submetidos ou não ao tratamento com benznidazol.

Fonte: Próprio.

Legenda: G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. AUC: Área sob curva. (*) indicam diferenças significativas entre os grupos 3 e 5 nos dias 8, 9 e 10 ($p < 0.05$).

O pico da parasitemia de *T. cruzi* tanto para o G3 como para o G5 ocorreu no 8º dia da infecção. No entanto, a parasitemia do G5 foi cinco vezes maior que ao G3, $1,4 \times 10^6$ e 6×10^6 , respectivamente. Após o pico, a parasitemia no G5 diminuiu drasticamente comparado com o G3, apresentando diferença significativa entre os dois grupos na carga parasitaria sanguínea até o dia dez após o inóculo do *T. cruzi*. Nos últimos três dias do exame de sangue à fresco, os tripomastigotas sanguíneos foram detectados em baixa quantidade (Figura 10).

As diferenças entre as parasitemias em todos os grupos também podem ser observadas nos valores da área sob a curva (AUC) mostrado na parte superior direita da Figura 10. É possível observar que os grupos coinfectados apresentaram valores superiores de AUC a seus homólogos não coinfectados, sendo maior no G5 seguido do G3, do G6 e com menor valor, o G4.

6.4 O TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COINFECTADOS *S. mansoni*/*T. cruzi* COM BZL É EFICIENTE EM REDUZIR A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLASMA DE MANEIRA SIMILAR AO TRATAMENTO MINISTRADO EM ANIMAIS COM INFECÇÃO SIMPLES.

Para a avaliação da resposta imune celular, foi calculada a dosagem das citocinas plasmática em todos os camundongos representada na **Figura 11**. Em geral, todos os grupos apresentaram níveis de citocinas superior ao observado entre os camundongos saudáveis (G1) exceto o G4 para a IL-2.

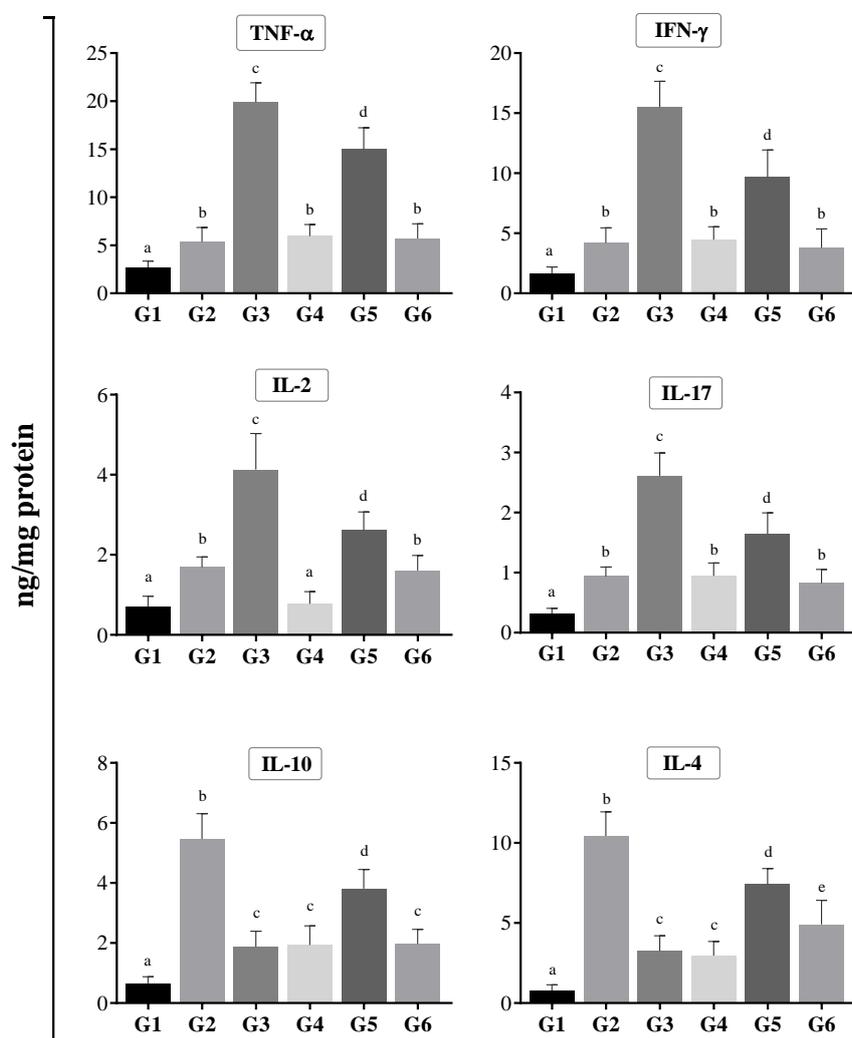


Figura 11 - Dosagem citocinas no plasma de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas amostram as medias e as barras indicam desvio padrão. As letras sobre as colunas representam diferencias estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Foi possível observar dois padrões de produção de citocinas entre os animais, um padrão para as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-17 e outro padrão de produção para as citocinas IL-4 e IL-10. No primeiro padrão predominantemente pro inflamatório, os maiores níveis de produção foram detectados entre os camundongos infectados unicamente por *T. cruzi*, seguido dos animais coinfectados, sendo observada redução dos níveis quando foi administrado o BZL. Enquanto os animais dos grupos 2, 4 e 6 não tiveram diferenças significativas entre eles na dosagem para TNF- α , IFN- γ e IL-17, a citocina IL-2 apresentou nível inferior entre os animais do G4, que teve nível de produção similar ao observado entre os camundongos saudáveis (Figura 11).

De forma inversa, para o segundo padrão, predominantemente anti-inflamatório, as maiores produções foram detectadas entre os animais infectados unicamente por *S. mansoni*, seguido pelos animais do grupo coinfectado, sendo observada influência do BZL na redução da produção das citocinas no caso da coinfecção, já que no caso dos infectados unicamente por *T. cruzi* e tratados com BZL já ter sido detectado baixos níveis de produção. A dosagens destas citocinas entre os camundongos dos grupos 1 e 4 foram inferiores à observada entre os animais dos grupos 3, 5 e 6 e não apresentaram diferenças significativas entre eles (Figura 11).

6.5 O TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COINFECTADOS COM *S. mansoni* E *T. cruzi* COM BZL É EFICIENTE EM SUPRIMIR O PARASITISMO CARDÍACO DOS ANIMAIS DE MANEIRA SIMILAR A INFECCÃO SIMPLES.

Os dados da PCR em tempo real para detecção da carga parasitária de *T. cruzi* no tecido cardíaco são mostrados na **Figura 12**. Apesar do maior parasitismo sanguíneo observado no exame de sangue à fresco entre os animais coinfectados no dia do pico de parasitemia, a PCR realizada no tecido cardíaco dos animais no 13^o dia de infecção mostrou menor parasitismo entre os animais coinfectados em relação aqueles infectados apenas por *T. cruzi*. O tratamento com BZL seja na infecção simples por *T. cruzi* quanto na situação de coinfecção, foi eficiente na redução da carga parasitária no tecido cardíaco dos animais. Entre os camundongos coinfectados, o BZL ajudou a manter o parasitismo do protozoário no coração significativamente mais baixo que o parasitismo observado entre os animais do grupo com infecção simples por *T. cruzi* que foram submetidos ao tratamento.

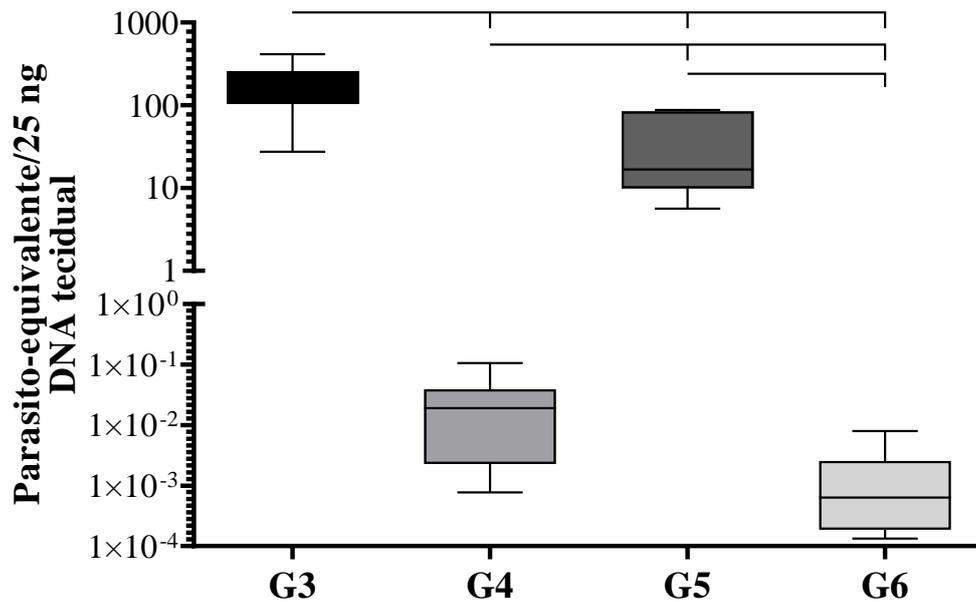


Figura 12 - Quantificação da carga parasitária de *T. cruzi* no coração pelo método de PCR em tempo real quantitativa em camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: Resultados positivos observados em tecidos cardíacos de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. A escala do gráfico embaixo está entre 0 e 1, e na parte superior de 1 a 1000 parasitas por 25 ng DNA de tecido, com intervalos de logaritmo de 10. G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As caixas indicam medianas e intervalos interquartis, máximos e mínimos. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

6.6 MUDANÇAS NO REMODELAMENTO MORFOLÓGICO E GRANULOMAS DO CORAÇÃO, BAÇO, FÍGADO, PULMÃO E INTESTINO.

6.6.1 A coinfeção com *S. mansoni* e *T. cruzi* acentua a miocardite em camundongos, mas o tratamento com BZL reduz a miocardite nestes animais.

Para determinar o remodelamento do tecido cardíaco nos grupos experimentais foram analisadas quantitativamente lâminas histológicas do coração no programa Image J. A análise de densidade de núcleos celulares no coração está mostrada na **Figura 13**. Foi usada para comparar entre os grupos experimentais a inflamação no miocárdio (miocardite) por infiltração celular. Todos os grupos mostraram no coração densidades celulares significativamente superior ao G1. No entanto, os camundongos dos grupos 5 e 6 mostraram densidades celulares cardíacas significativamente mais altas aos outros grupos, e com diferenças significativa entre eles.

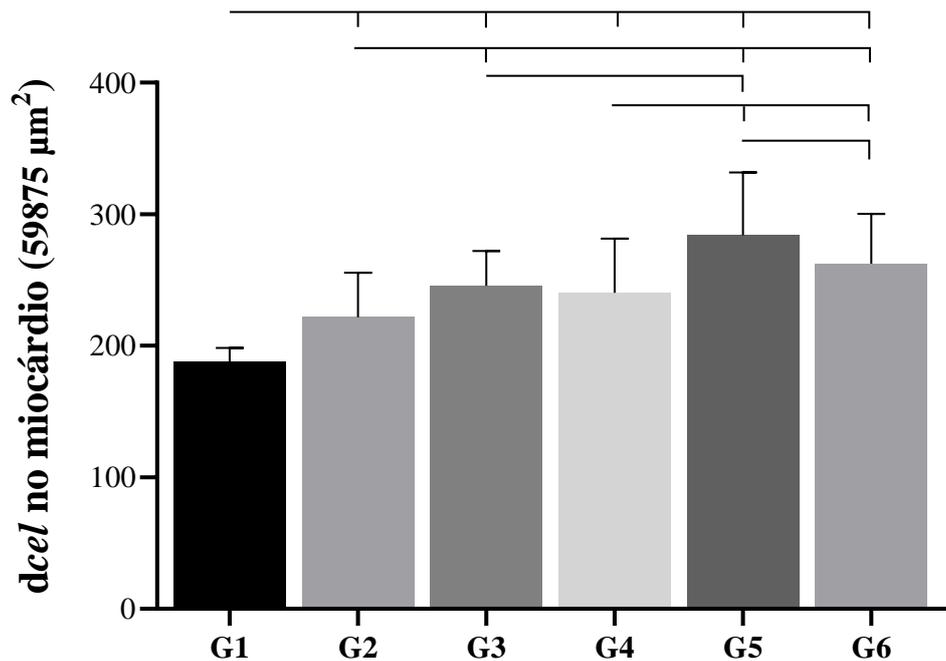


Figura 13 - Densidade celular (*dcel*) no coração de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Neste trabalho foi realizada também a análise qualitativa das lâminas do miocárdio como se mostra na **Tabela 3**. Confirmando os resultados da análise quantitativa mostrados na Figura 13, os camundongos dos grupos 3, 5 e 6 mostraram uma miocardite mais elevada quando comparado com os outros grupos.

Tabela 3 - Análise qualitativa da intensidade da inflamação no miocárdio de camundongos submetidos a diferentes condições experimentais.

GRUPO	INDIVÍDUOS ANALISADOS											Total +
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
G1	-	-	-	-	-	-	-	-	SD	SD	SD	0
G2	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	SD	6
G3	+	+	+++	-	+	+	+	-	++/*	SD	SD	10
G4	+	+	+	-	+	-	++	SD	SD	SD	SD	6
G5	++	-	+/*	+/*	+++	+/*	+++	++	++++/**	+++	++	22
G6	+++	+	++	++	+	-	+	+	++	+++	+	17

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. (-) Sem inflamação; (+ < +++) intensidade da

inflamação cardíaca, de menor a maior infiltração celular no miocárdio; Asteriscos representam tecido com: (*) áreas fibróticas, (***) focos inflamatórios grandes. SD: Sem dados.

Na **Figura 14** estão mostradas fotos representativas do coração usadas na análise de densidade celular. Nestas lâminas histológicas, foram observados ninhos de *T. cruzi* no G4 e focos inflamatórios por granulomas de *S. mansoni* nos animais dos grupos 5 e 6. Estas observações não foram encontradas nos corações dos outros grupos experimentais.

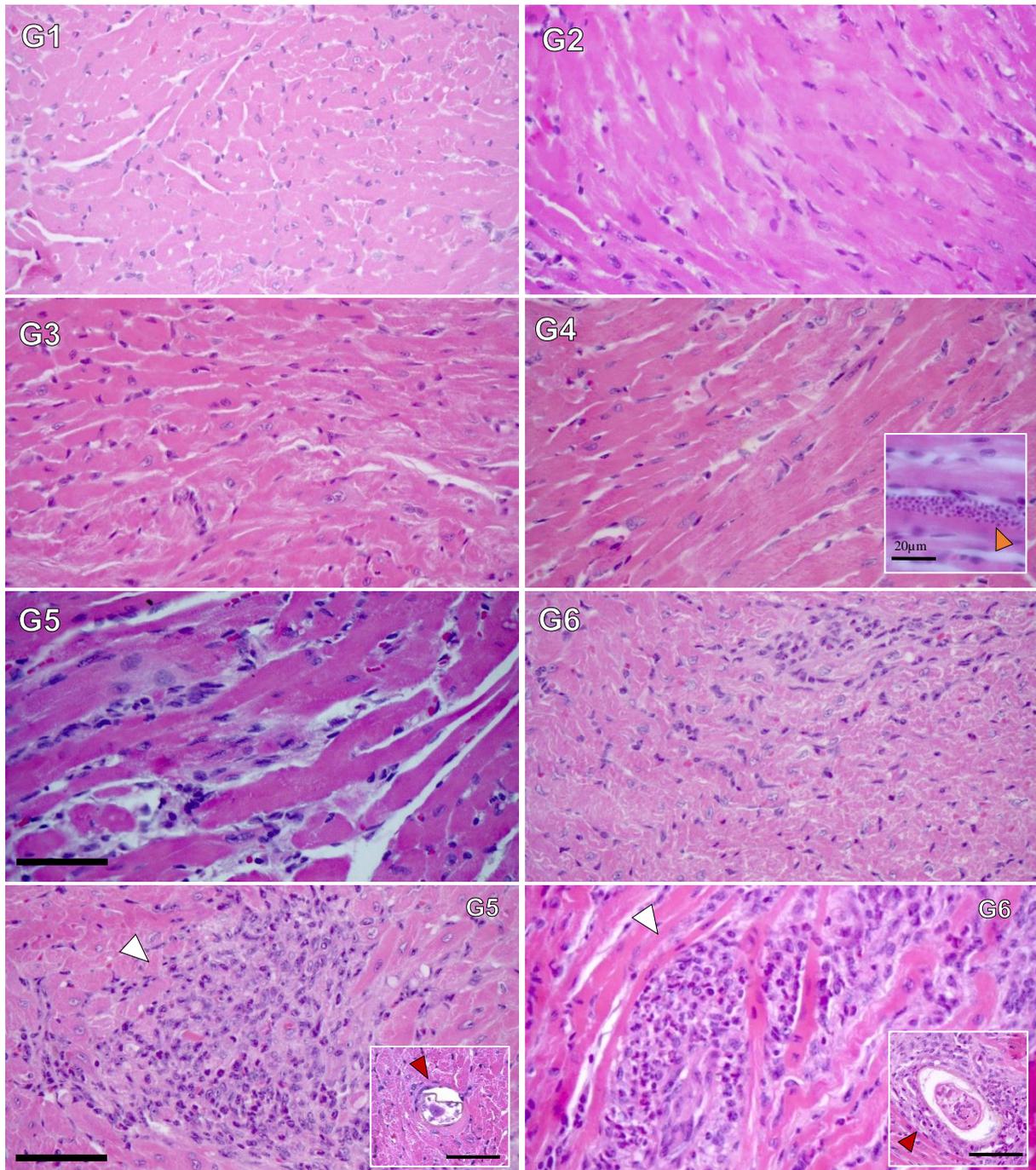


Figura 14 - Fotos histológicas representativas do coração de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Aumento de 40× (barra: 50 µm). As setas indicam granulomas no tecido cardíaco (brancas), ovos de *S. mansoni* (vermelhas) e ninho de amastigotas de *T. cruzi* (amarela). Lâminas com método de coloração Hematoxilina-Eosina.

6.6.2 A esplenomegalia é acentuada em animais coinfetados não tratados e o BZL previne o aumento deste órgão devido à coinfeção.

Na **Figura 15** estão mostrados os pesos relativos dos baços. Todos os grupos apresentaram aumento do peso do baço em contraste com o G1, mas o tratamento ajudou a reduzir o impacto das infecções nesse órgão, tanto no G4 quanto nos animais do G6 já que os camundongos desses grupos tiveram pesos significativamente menores em comparação a seus grupos homólogos não tratados (G3 e G5). O grupo mais afetado em termos de aumento do baço foi o G5, visto que este apresentou baços com peso até cinco vezes maiores em relação ao G1, seguido do grupo com infecção simples por *T. cruzi*.

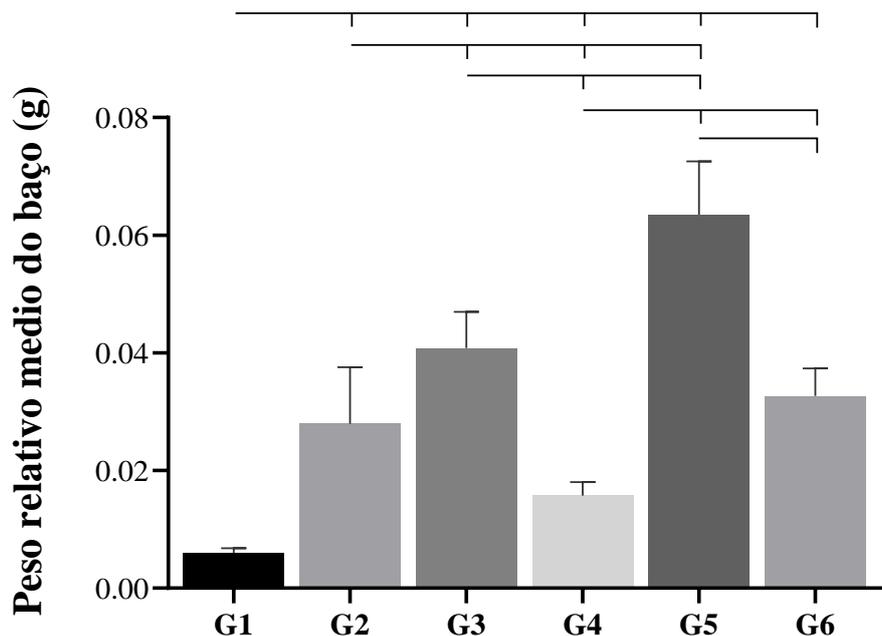


Figura 15 - Peso relativo médio dos baços de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

6.6.3 A hepatomegalia e redução no número de hepatócitos é acentuada nos animais coinfetados, nestes animais, o tratamento com BZL não preveniu a hepatomegalia, mas evitou a perda de hepatócitos e reduziu inflamação nas áreas distantes aos granulomas.

Na **Figura 16** estão representados os pesos dos fígados registrados no dia da necropsia. As coinfeções influenciaram de forma significativa no aumento do peso desse órgão e inclusive, a presença do BZL no grupo coinfetado exacerbou, em termos de peso, a hepatomegalia dos camundongos onde o fígado alcançou uma média de peso superior ao G5 e quase três vezes maior ao G1. Diferente do que foi observado entre os animais do G6, no G4 o tratamento com BZL ajudou a minimizar o impacto do protozoário no peso do fígado, fato que observamos ao comparar com o G3 (Figura 16). Por outro lado, embora as infecções pelo *T. cruzi* no G3 e o *S. mansoni* no G2 induziram o aumento do peso dos fígados em relação ao observado entre os animais do G1, as hepatomegalias foram significativamente menores ao observado nos G5 e G6.

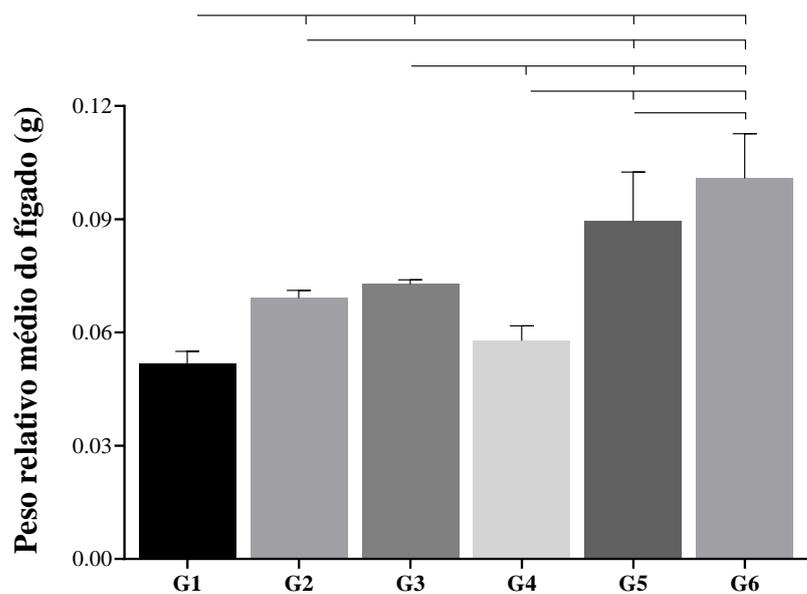


Figura 16 - Peso relativo médio dos fígados de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Para avaliar o remodelamento celular no fígado, foram analisadas lâminas histológicas para calcular a densidade de hepatócitos e de células intersticiais (que é a infiltração celular por inflamação) representada na **Figura 17**. O tratamento com BZL no G6 não só ajudou a evitar a perda de hepatócitos e ao aumento da infiltração celular no fígado comparado ao G5, mas também levou a um aumento da densidade de hepatócitos comparada ao G2.

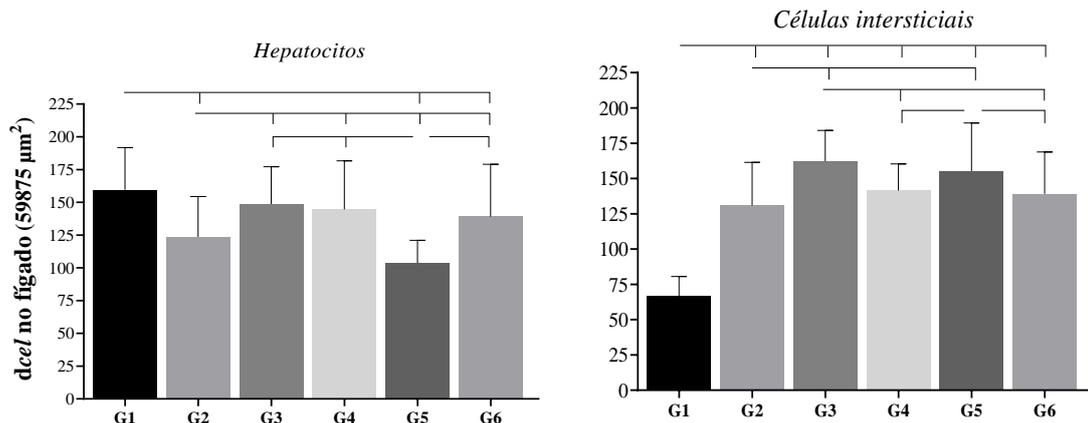


Figura 17 - Densidade celular (*dcel*) (hepatócitos e células intersticiais) no fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

As imagens histológicas do fígado estão mostradas na **Figura 18**. Nos grupos com *S. mansoni*, os granulomas formam áreas grandes de inflamação em sua periferia, evidenciando alta remodelação do tecido, incluindo os camundongos do G6.

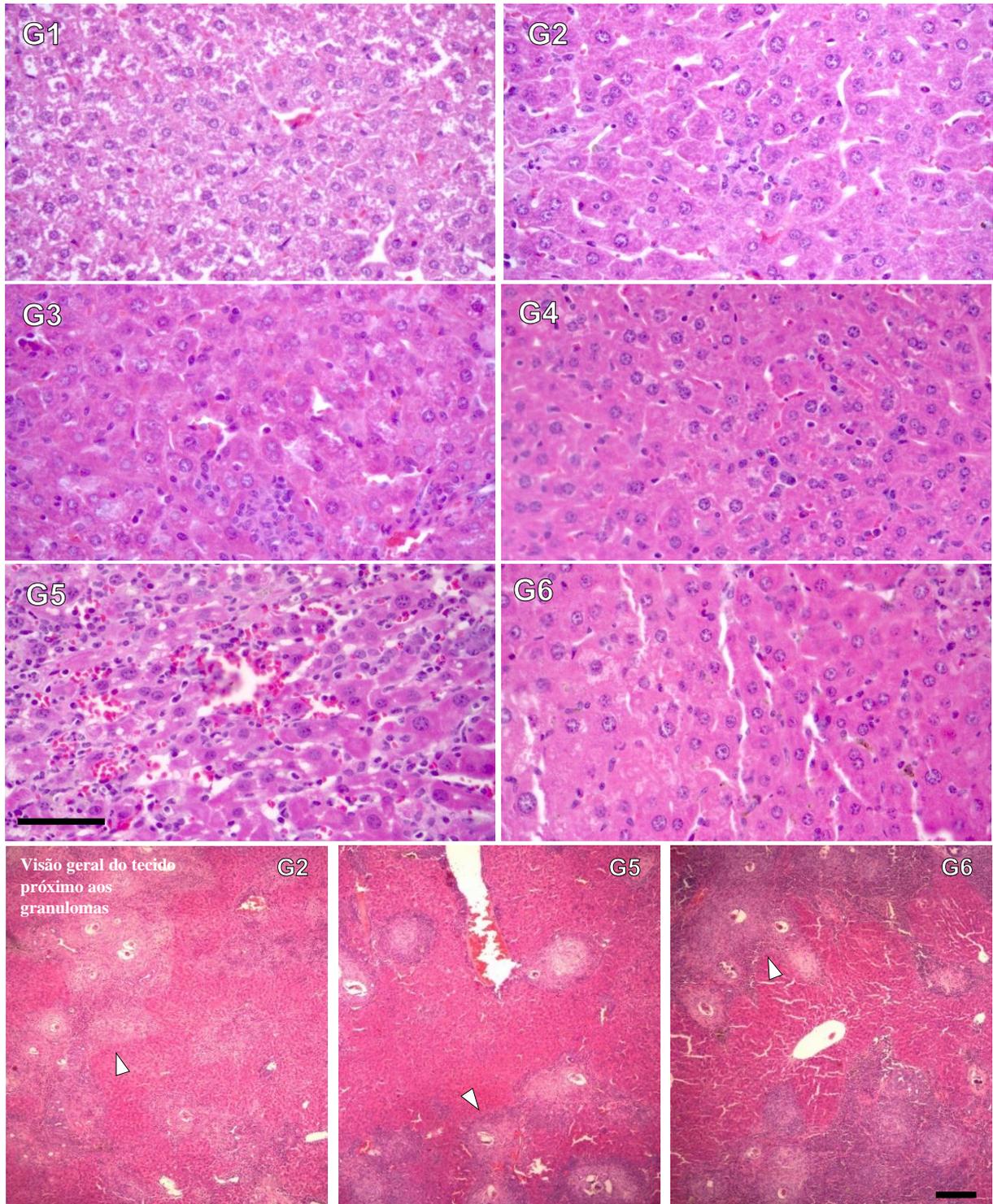


Figura 18 - Fotos histológicas representativas do fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Aumentos de 40× e 5× (imagens superiores e inferiores). Barras: 50 μm e 200μm respectivamente). As setas indicam granulomas em torno aos ovos de *S. mansoni*. Lâminas com método de coloração Hematoxilina-Eosina.

6.6.4 A coinfeção com *T. cruzi* e/ou BZL não influencia no número de granulomas esquistossomos no fígado e na sua área ou densidade celular.

A análise do número de granulomas no fígado está representada na **Figura 19**. Todos os animais com *S. mansoni* tiveram granulomas no fígado. Os animais pertencentes aos grupos coinfectados apresentaram médias de número de granulomas no fígado maiores daquelas observadas entre os animais do G2 ainda que, sem diferenças significativas.

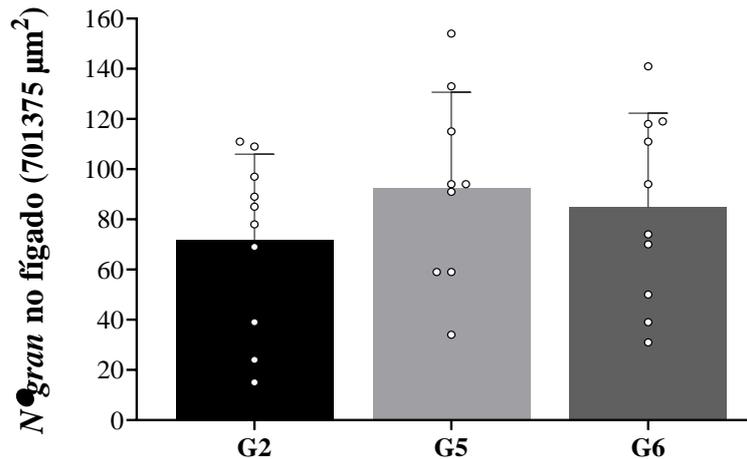


Figura 19 - Número de granulomas ($N^{\circ}gran$) hepáticos de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. Sem diferenças significativas ($p > 0.05$) (gráfico superior).

A área dos granulomas hepáticos e a densidade de células nos mesmos estão mostrados na **Figura 20**. Os animais do G6 tiveram áreas significativamente maiores daquela observada entre os indivíduos do G5, mas similar à área do G2. Não obstante, a densidade de células nos granulomas não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

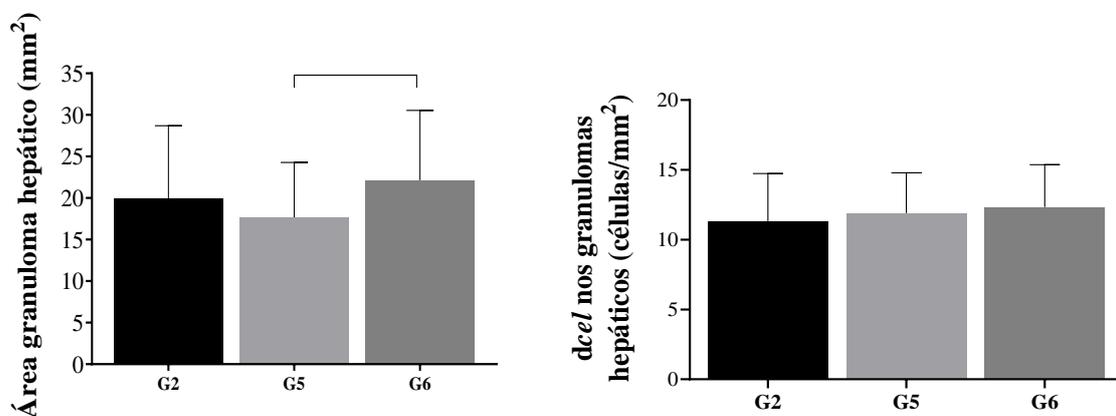


Figura 20 - Área granulomatosa e densidade celular de granulomas ($dgran$) hepáticos de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. A linha horizontal sobre as colunas representa diferenças significativas ($p < 0.05$).

Na **Figura 21** estão apresentadas as porcentagens de células polimorfonucleares e mononucleares nos granulomas do fígado. As médias de porcentagens de células mononucleares foram superiores em todos os grupos. Os animais do G5 exibiram uma quantidade significativamente maior de células mononucleares seguido dos animais do G6 e, em menor grau, os camundongos do G2. Em relação às células polimorfonucleares, as porcentagens foram maiores nos animais dos grupos 2 e 6.

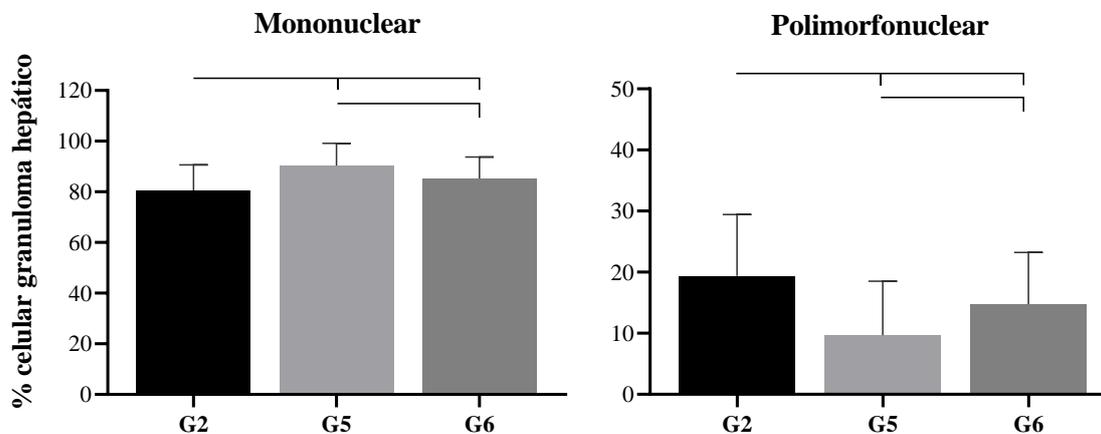


Figura 21 - Porcentagem de células mononuclear e polimorfonucleares nos granulomas do fígado de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfectados e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As linhas horizontais sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0.05$).

6.6.5 A coinfeção com o *T. cruzi* aumenta o número de animais com granulomas no pulmão e induz aumento da área granulomatosa com diminuição da densidade celular dos mesmos, especialmente nos tratados com o BZL.

Para avaliar as mudanças no remodelamento dos granulomas pulmonares nos grupos infectados pelo *S. mansoni*, foram analisadas lâminas histológicas do pulmão. Diferentemente do que foi observado no fígado onde foram achados granulomas hepáticos em todos os camundongos, no pulmão não todos os animais apresentaram granulomas como se mostra na **Tabela 4**. A coinfeção levou ao aumento das porcentagens de animais com granulomas pulmonares comparado com indivíduos sem coinfeção, sendo maior no G6 com 89% de

animais com granulomas no pulmão (8 de 9 ind.) seguido do G5 com 60% (6 de 10 ind.) e em menor porcentagem, o G2 com 40% (4 de 10 ind.).

Tabela 4 - Animais com granulomas no pulmão 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

	G2	G5	G6
Camundongos com granulomas/total	4/10	6/10	8/9
% camundongos com granulomas no pulmão	40	60	89

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfecados e G6: Animais coinfecados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*.

Na **Figura 22** estão mostradas as médias do número de granulomas contados no pulmão. Ainda que não há diferenças significativas no número médio de granulomas analisadas no pulmão entre os grupos com esquistossomose, os animais dos grupos 2 e 5 mostraram medias de número de granulomas superior ao observado no G6 (Figura 22).

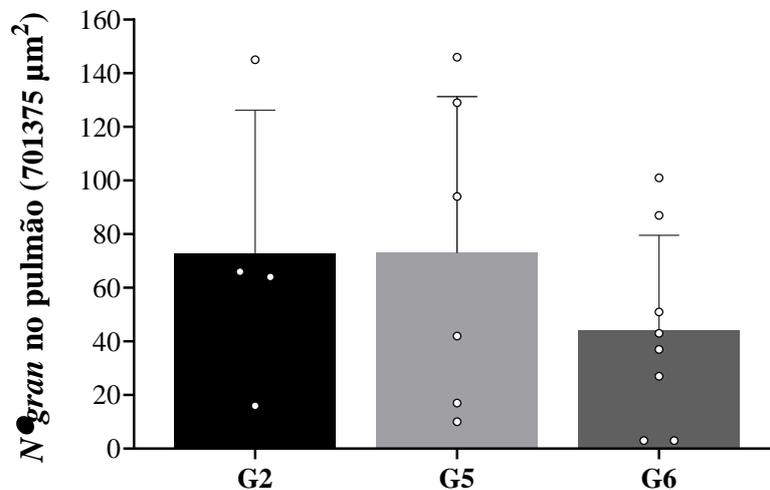


Figura 22 - Número de granulomas ($N^{\circ}gran$) pulmonares de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfecados e G6: Animais coinfecados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. Sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0.05$). Nota: Foram excluídos das análises os animais com ausência de granulomas (gráfico $dgran$).

Em relação à área dos granulomas pulmonares, os camundongos coinfecados expuseram medias de áreas maiores daquelas observadas nos animais do G2, apresentando diferenças significativas entre os grupos 6 e 2 como mostrado na **Figura 23**. Por outro lado, os

animais dos grupos 5 e 6 apresentaram uma densidade celular nos granulomas pulmonares significativamente inferiores à observada nos animais do G2.

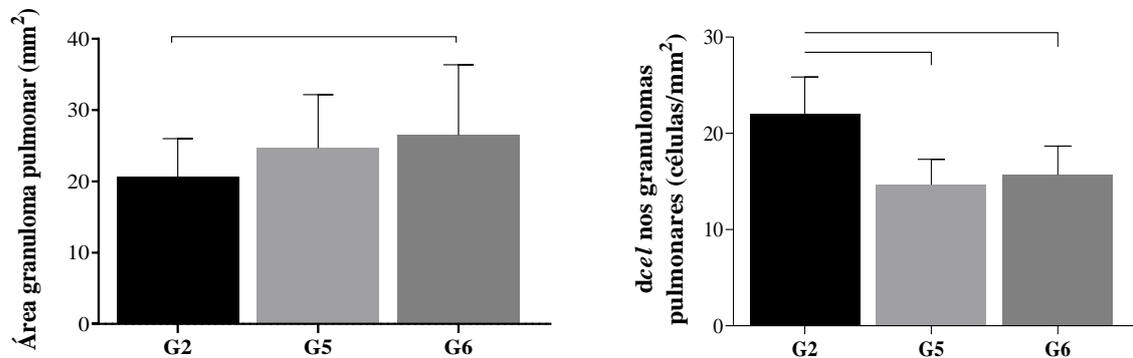


Figura 23 - Área dos granulomas no pulmão e densidade celular (*dcel*) nos granulomas pulmonares de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfectedos e G6: Animais coinfectedos e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas mostram as médias e as barras indicam desvio padrão. A linha horizontal sobre as colunas representa diferenças significativas ($p < 0.05$).

6.6.6 A coinfeção aumenta o número de animais com granulomas no intestino delgado.

Não foram realizadas análises de granulomas no intestino grosso, pois apenas dois animais pertencentes aos grupos 5 e 6 apresentaram ovos/granulomas de *S. mansoni* no intestino grosso. No entanto, no intestino delgado, assim como foi observado no pulmão, a coinfeção aumentou a porcentagem de animais com granulomas, como mostrado na **Tabela 5**, tendo o G5 a maior porcentagem (90%, 9 de 10 ind.), seguido do G6 (75%, 9 de 12 ind.) e em menor porcentagem, o G2 (50, 5 de 10 ind.).

Tabela 5 - Animais com granulomas no intestino delgado 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

	G2	G5	G6
Camundongos com granulomas/total	5/10	9/10	9/12
% camundongos com granulomas no intestino delgado	50	90	75

Fonte: Próprio.

Legenda: G2: Infectado por *S. mansoni*; G5: Animais coinfectedos e G6: Animais coinfectedos e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*.

6.6.7 Os animais coinfetados e tratados apresentaram menor inflamação no intestino delgado quando comparado com os outros grupos com *S. mansoni*.

Na **Figura 24** se mostram fotos histológicas representativas do intestino delgado.

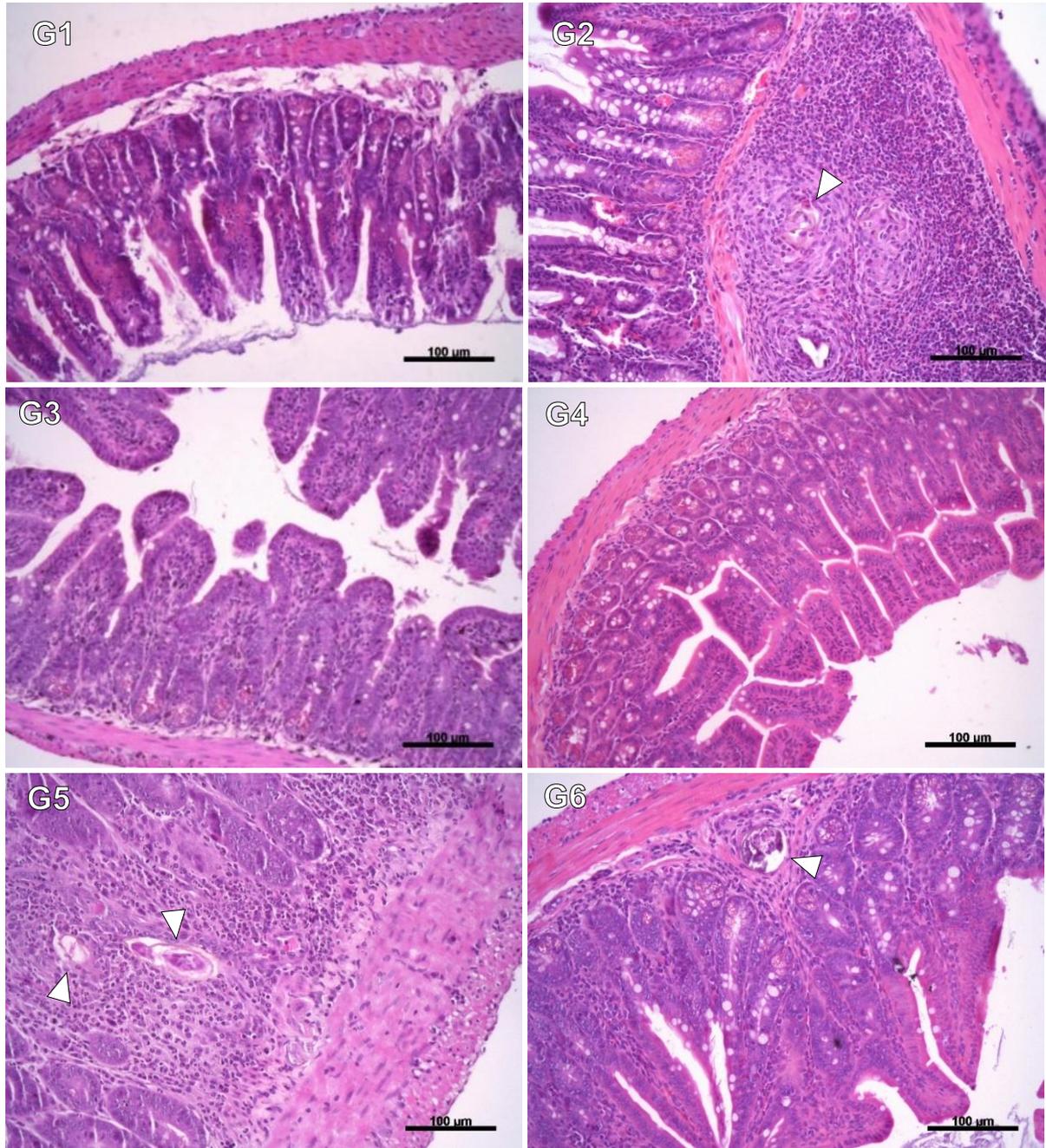


Figura 24 - Fotos histológicas representativas do intestino delgado de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni* e 13 dias com *T. cruzi*.

Fonte: Próprio.

Legenda: G1: Animais saudáveis; G2: Infectado por *S. mansoni*; G3: Infectado por *T. cruzi*; G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol; G5: Animais coinfetados e G6: Animais coinfetados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Aumento de 20× (barra: 100µm). As setas brancas indicam ovos de *S. mansoni*. Lâminas com método de coloração Hematoxilina-Eosina.

A análise histopatológica do intestino delgado indicou que os animais dos grupos G2 e G5 apresentaram marcante reorganização microestrutural patológica. E ambos os grupos, foi identificada intensa retenção de ovos de *S. mansoni* na camada mucosa e submucosa, formações granulomatosas exsudativas/produzidas evidentes e intensa celularidade na submucosa. Foi identificada desorganização da muscular da mucosa, espessamento segmentar e infiltrado inflamatório na camada muscular nesses animais. Os animais desses grupos apresentaram granulomas exsudativos/produzidos mais volumosos e mais numerosos. Além disso, a lâmina própria apresentou intenso infiltrado inflamatório difuso, com elevada densidade de células polimorfonucleares apresentando morfologia típica de neutrófilos e principalmente eosinófilos. A reação inflamatória granulomatosa foi associada ao espessamento da submucosa e descolamento luminal da camada mucosa em ambos os grupos. Evidente infiltrado inflamatório foi observado na camada muscular, especialmente em áreas adjacentes aos granulomas esquistossomóticos. Os animais do grupo G5 também apresentaram achatamento das vilosidades intestinais (Figura 24).

Os animais do grupo G6 apresentaram características morfológicas similares às descritas para os grupos G2 e G5. Entretanto, foi observado menor tamanho dos granulomas esquistossomóticos, bem como infiltrado inflamatório de menor intensidade na lâmina própria e camada submucosa. Além disso, foi identificado a camada muscular apresentou baixa celularidade, com focos inflamatórios pouco frequentes e limitados à periferia da subcamada circular interna.

Os animais do G1 apresentaram vilosidades intestinais bem delimitadas, epitélio de revestimento bem definido com células caliciformes evidentes, moderada celularidade na lâmina própria e celularidade reduzida na submucosa, camada muscular e serosa com organização típica sem evidência de infiltrado inflamatório. Enquanto que, os animais do grupo G3 apresentaram vilosidades intestinais levemente espessadas, epitélio de revestimento bem definido, moderada celularidade na lâmina própria e baixa celularidade na camada submucosa. Foi observada camada muscular delgada, com infiltrado inflamatório focal. Os animais do grupo G4 apresentaram microestrutura intestinal similar ao grupo G3. No entanto, foi identificado moderado espessamento da camada muscular e expansão segmentar da submucosa (Figura 24).

6.8 A COINFECÇÃO COM *S. mansoni* E *T. cruzi* NÃO ALTERA AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO BZL EM CAMUNDONGOS.

A concentração plasmática do BZL nas amostras do plasma em três tempos diferentes dos grupos infectados e tratados são mostrados na **Figura 25**. A concentração do medicamento foi diminuindo continuamente através do tempo. No entanto, a diminuição da concentração do BZL no plasma só foi significativa entre os tempos 1 e 3, o seja, só depois de mais de duas horas da administração do BZL, tanto no G4 como no G6.

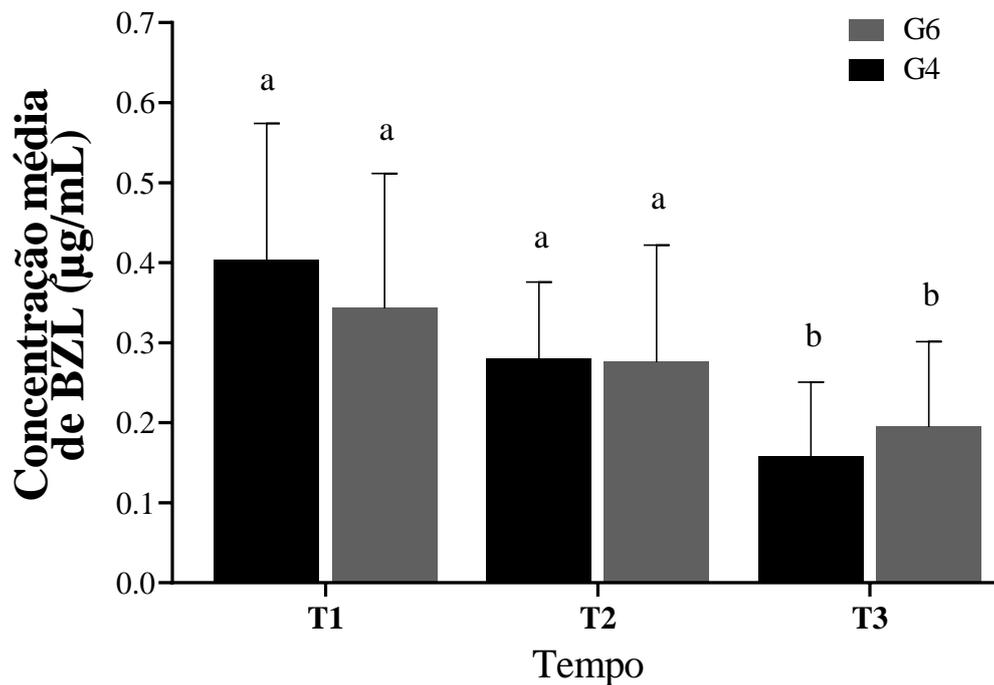


Figura 25 - Concentração média de benznidazol em amostras do plasma por tempo de camundongos 88 dias após-infecção com o *S. mansoni*, 13 dias com *T. cruzi* e tratados 9 dias consecutivos com benznidazol.

Fonte: Próprio.

Legenda: T1: Amostras coletadas 1h 20min após administração do benznidazol; T2: Amostras coletadas 2h 20min após administração do benznidazol; T3: Amostras coletadas 3h 20min após administração do benznidazol. G4: Infectado por *T. cruzi* e tratado com benznidazol e G6: Animais coinfectados e tratados com benznidazol. Para as infecções foram usados 25 cercarias da cepa LE de *S. mansoni* e 2500 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. As colunas amostram as médias e as barras indicam desvio padrão. As letras sobre as colunas representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

7 DISCUSSÃO

Tanto a esquistossomose mansônica como a doença de Chagas são enfermidades negligenciadas que compartilham áreas endêmicas no continente americano e a cada ano, ambas afetam milhões de pessoas em condições socioeconômicas altamente precárias (OMS, 2021a, 2021b). Em busca de um melhor entendimento das consequências das interações entre essas doenças, o presente trabalho buscou avaliar se a infecção crônica por *S. mansoni* influencia na resposta ao benznidazol, o único fármaco de escolha no Brasil para tratar a doença de Chagas, contra a infecção aguda por *T. cruzi*, usando camundongos da linhagem *Balb/c* como modelo experimental.

A avaliação dos parâmetros de peso corporal e mortalidade foram usados como medidas indiretas da eficácia do BZL na presença da esquistossomose. A estabilidade do peso nos animais coinfectados e tratados reflete o êxito do medicamento para minimizar o dano da invasão do *T. cruzi* nesses animais, visto que, na fase aguda, o início da replicação do protozoário induz uma diminuição contínua da ingestão de água e comida pelos camundongos, levando à perda de peso associada a uma redução da movimentação dos animais e sinais de caquexia progressiva (SILVA *et al.*, 2012). Estas observações podem explicar o resultado da perda contínua de peso nos animais com *T. cruzi* não tratados após a infecção pelo protozoário. Por outro lado, considerando a similaridade nas porcentagens de animais mortos entre os grupos com esquistossomose (G6 e G2), neste trabalho não podemos atribuir ao *T. cruzi* as taxas de mortalidade observada entre os camundongos coinfectados. Entretanto, os animais tratados com BZL não registraram mortes, o que poderia ser uma consequência benéfica do tratamento. Em um estudo de coinfeção experimental, também utilizando camundongos como modelos experimentais, foi observado que por volta do 15º dia de infecção com o *T. cruzi* e 80º dia com *S. mansoni*, a sobrevivência dos animais começou a diminuir progressivamente até chegar a uma porcentagem de mortes superior a 70% no 40º dia após infecção pelo protozoário, enquanto que os animais infectados apenas por *T. cruzi* não morreram (KLOETZEL *et al.*, 1973). Em concordância com estes resultados, poderíamos esperar que o BZL tivesse influenciado na ausência de mortalidade observada entre os animais coinfectados neste trabalho.

Apesar do surgimento de novas técnicas para a avaliação de medicamentos, a mortalidade e a parasitemia são bons critérios para avaliação da atividade de fármacos em experimentos de quimioterapia (BRENER, 1962), e ainda são usados largamente em trabalhos atuais (ECHEVERRÍA *et al.*, 2020; MASSAGO *et al.*, 2021). Apesar de não ter sido avaliada

a cura parasitológica devido ao curto período de tempo de infecção por *T. cruzi* (13 dias), através das curvas de parasitemia demonstramos que o BZL teve a capacidade de manter a carga parasitária sanguínea de *T. cruzi* quase imperceptível em animais coinfectados, da mesma forma que se observa na situação de infecção apenas com o *T. cruzi*, durante o mesmo período de tempo.

No entanto, ainda com o uso do BZL, o grupo coinfectado mostrou uma área sob a curva (AUC) da parasitemia superior ao grupo com infecção simples tratado. Este evento observado na diferença da carga parasitária é mais evidente nos animais coinfectados sem tratamento. Entre estes animais, foi observada uma marcante influência da presença do verme na carga parasitária no dia do pico da parasitemia do *T. cruzi*, apresentando valores mais altos em relação aos animais sem coinfecção. Esta influência na parasitemia pode ser atribuída ao perfil imune Th2 da fase crônica da esquistossomose nesses indivíduos, o qual estimula a expressão das citocinas IL-4 e IL-10 (ativadores da Arginase-1 em macrófagos) (MUNDER; EICHMANN; MODOLELL, 1998) favorecendo a uma maior replicação do *T. cruzi* nos animais coinfectados nos primeiros dias da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2017). De fato, a indução da Arginase-1 está relacionada à susceptibilidade a infecções parasitárias como a decorrente da *Leishmania major* quando há uma resposta imune Th2 predominante, por exemplo (INIESTA *et al.*, 2005). Entretanto, ao passar o pico da parasitemia, nos dias 9 e 10 de infecção por *T. cruzi*, foi observada uma diminuição significativa de tripomastigotas sanguíneos nos animais coinfectados em relação ao grupo com os camundongos com infecção simples, o que poderia ser resultado de uma regulação dos perfis imunes Th1 e Th2 com resposta imune mais eficaz para o controle do protozoário. A carga parasitária elevada do *T. cruzi* em coinfecção com o *S. mansoni* já foi registrado em outros estudos, sendo diferente os valores de parasitemia, mas o que provavelmente pode estar relacionado com os modelos utilizados e das cepas do *T. cruzi* envolvidas nestes estudos experimentais (KLOETZEL *et al.*, 1973; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Como se esperava, o resultado das dosagens de citocinas plasmáticas mostrou uma marcada polarização de perfis imunes Th1 e Th2 em animais com infecções simples com *T. cruzi* e *S. mansoni*, respectivamente. Este contraste imunológico foi atenuado nos animais com infecções mistas, onde se observou sobreposição da expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias gerados por ambos parasitas (CHIEFFI, 1992; HELMBY; KULLBERG; TROYE-BLOMBERG, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2017). Não obstante, a ação do BZL em situação de coinfecção não só manteve o baixo nível de citocinas pró-inflamatórias como

também provocou um decréscimo pronunciado das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 em relação aos animais que não foram tratados. Isso pode estar relacionado com a capacidade do BZL poder alterar o equilíbrio entre mediadores pró e antiinflamatórios com consequências importantes para o curso da produção de citocinas, além de sua capacidade tripanocida direta (REVELLI *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* mostram que, o uso do BZL provoca o decréscimo de IL-12 e iNOS em amostras de fígado e a redução das citocinas TNF- α e IL-6 no soro (PASCUTTI *et al.*, 2004). Tais alterações podem ser motivadas por condições ambientais particulares, havendo uma seletividade na modulação da resposta imune por parte do BZL como sugerem alguns estudos (GATTO *et al.*, 2017; PASCUTTI *et al.*, 2004; REVELLI *et al.*, 1999; VELLI, 2001). Em nosso trabalho, os camundongos coinfetados provavelmente tiveram inicialmente um ambiente controlado por citocinas do perfil Th2, produto da presença do helminto. Posteriormente com a administração do BZL poderia ter ocorrido regulação para baixo da expressão das citocinas anti-inflamatórias avaliadas (IL-4 e IL-10), levando ao equilíbrio imunológico que permitiram o melhor controle do *T. cruzi* nesses animais, em especial a IL-10, citocina reguladora que possui a capacidade de diminuir a resposta inflamatória e parece ser prejudicial na infecção inicial pelo *T. cruzi*, associada a uma susceptibilidade à infecção (GATTO *et al.*, 2017).

Ademais da eficiência do BZL para suprimir o parasitismo cardíaco de *T. cruzi* independente da coinfeção, a qPCR também mostrou que houve uma menor carga de parasitos no coração nos animais coinfetados em relação a seus grupos homólogos sem coinfeções. Nós associamos o resultado do parasitismo cardíaco a uma reação imune mais forte desencadeada nos camundongos coinfetados, atribuído à alta quantidade de tripomastigotas sanguíneas detectados nas AUC das parasitemias de *T. cruzi* e a respostas imunes tardias mais eficazes, uma vez regulados os perfis imunes Th1 e Th2. Em decorrência, a alta infiltração celular mostrada no miocárdio nos animais coinfetados pode ser reflexo da alta parasitemia observada durante o pico de parasitemia, o que pode ter sido responsável pelo menor parasitismo cardíaco registrada pela qPCR. Assim, um grande número de parasitas poderia aumentar a estimulação da resposta imune e recrutar um maior número de células dendríticas, levando a uma resposta Th1 mais agressiva contra o *T. cruzi* com elevada produção de CD8⁺ e de plasmócitos para a contingência da infecção, levando a um menor estabelecimento de parasitas no coração.

Neste trabalho também foi observado que o BZL evitou a esplenomegalia entre os animais infectados somente por *T. cruzi* e principalmente, entre os coinfetados. O registro de pesos significativamente menores de baços em animais coinfetados tratados em relação aos coinfetados sem tratamento pode ser explicado pelo controle do BZL na replicação do *T. cruzi*, evitando assim o aumento de esplenócitos e células T e B no baço e por tanto, uma menor esplenomegalia (OLIVIERI *et al.*, 2006). Ademais, depois da administração do BZL em camundongos se detectam altas concentrações do medicamento no baço, equivalendo a 27% do registrado no plasma (PERIN *et al.*, 2017), auxiliando no controle do protozoário. Por outro lado, a forte esplenomegalia desenvolvida em animais coinfetados não tratados pode estar relacionada ao alto parasitismo do *T. cruzi* registrado neles no 8º dia de infecção. A cepa Y de *T. cruzi*, utilizada neste trabalho, possui macrófagotropismo e portanto, utilizam macrófagos como sítio predominantemente de multiplicação (CORDEIRO; DAHIA; ANDRADE, 1997). O baço é o maior órgão linfático que existe e participa ativamente da resposta imune primária contra micro-organismos e proteínas estranhas (VIVEROSA; MONROYA; ALVA, 2013). Macrófagos infectados com *T. cruzi* são destruídos nesse órgão após o ponto mais alto do parasitismo (CORDEIRO; DAHIA; ANDRADE, 1997), o que faz com que o baço trabalhe mais aumentando a ativação e proliferação de células do sistema imunológico que estão envolvidos nas respostas imunes protetoras a infecções, como linfócitos T, linfócitos B e esplenócitos (MEIS *et al.*, 2009). Essas funções imunológicas aumentadas resultam em hiperplasias esplênicas (CHAPMAN *et al.*, 2020), similar ao que foi observado nos baços de animais do grupo coinfetado sem tratamento.

Diferentemente ao que ocorreu no baço, o BZL não evita a exacerbação da hepatomegalia em animais coinfetados. Inclusive, o peso do fígado é maior ao registrado no grupo coinfetado que foi submetido ao tratamento. Tanto a esquistossomose como a doença de Chagas induzem hepatomegalia, e juntos evidentemente exacerbam essa condição como mostrados em nossos resultados. O tratamento foi capaz de atenuar, ainda que a nível microscópico, a lesão hepática associada a coinfecção com o *T. cruzi*, já que auxiliou na diminuição do número de células intersticiais (inflamação) e a preservação da densidade de hepatócitos em áreas distantes aos granulomas. Mesmo assim, como é possível perceber nas lâminas histológicas do fígado, os granulomas gerados em presença dos ovos de *S. mansoni* ocupam grandes áreas que poderiam estar levando à hiperplasia do fígado. Ademais, o fígado é um órgão de metabolismo de drogas o que também pode estar influenciando para aumento da hepatomegalia nos animais coinfetados tratados. Trabalhos evidenciam que há aumento

significativo dos níveis de enzimas envolvidas no sistema de biotransformação de xenobióticos (qualquer molécula orgânica hidrofóbica, seja ela fármaco, poluente ambiental ou produto natural) como o CYP450 no fígado depois dos 30 dias após infecção com o parasita *S. mansoni* em camundongos, coincidindo com as primeiras deposições de ovos e formação de granulomas neste órgão (SHEWEITA; MANGOURA; EL-SHEMI, 1998). Estes estudos sugerem que as alterações nas atividades das fases I e II das enzimas que metabolizam drogas como resultado da infecção com *S. mansoni* pode alterar a capacidade do fígado de desintoxicar muitos compostos e, também, podem potencializar os efeitos deletérios de alguns compostos no fígado. Por isso, tanto a coinfeção como os metabolitos de BZL seriam capazes de intensificar a patologia no fígado.

Apesar do enfoque deste trabalho ser sobre a eficácia do BZL para tratar a doença de Chagas na coinfeção, também foram analisados parâmetros que pudessem expor mudanças no desenvolvimento dos granulomas esquistossomóticos, sob influência do medicamento. Os resultados mostraram que apesar de haver tendência de aumento no número de granulomas no fígado em coinfeção, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Não obstante, os granulomas no pulmão apresentaram áreas mais pronunciadas e com baixa densidade celular em relação ao grupo controle. Estas diferenças expostas entre o fígado e o pulmão podem ser devido a que, dependendo do órgão em que os granulomas são formados, eles apresentam variações estruturais e celulares e se comportam de forma diferente em relação ao fenômeno modulador (LENZI; ZECH; LEONEL, 2008) em nosso caso, à coinfeção e/ou BZL.

Por outro lado, apesar de todos os grupos terem exibidos granulomas no fígado, este fato não ocorreu com os pulmões nesses animais. Houve um aumento das porcentagens de animais que apresentaram granulomas pulmonares em condição de coinfeção, podendo estar ligado com a forte hepatoesplenomegalia desenvolvida nos animais desses grupos, observados através dos pesos de seus baços e fígados. As hepatoesplenomegalias exacerbadas na esquistossomose estão associadas com a obstrução da circulação portal originando circulações colaterais anômalas (*shunts intra-hepáticos*) como tentativa de compensar a hipertensão. As circulações anômalas permitem que alguns ovos caiam na circulação venosa, ficando presos nos pulmões (NEVES *et al.*, 1980). Em decorrência, também foi observado um aumento de animais com ovos no intestino em situação de coinfeção, especialmente entre os animais do grupo sem tratamento. O incremento do trânsito de ovos no intestino, diferentemente do pulmão, poderia estar relacionado principalmente a um aumento da oviposição por parte dos vermes de *S. mansoni* como consequência da segunda infecção. Embora que, KLOETZEL *et*

al., 1973 demonstraram que a oviposição avaliada por contagens de ovos em fragmentos de intestino e fígado não foi significativamente diferente em animais coinfectados, onde o *S. mansoni* precedeu a infecção por *T. cruzi* (KLOETZEL *et al.*, 1973), se tem descrito que o TNF- α estimula a oviposição das fêmeas de *S. mansoni* (AMIRI *et al.*, 1992). Neste trabalho o TNF- α se mostrou alto em plasma de animais coinfectados em relação aos outros grupos com esquistossomose, o que pode explicar o aumento do trânsito de ovos no intestino devido ao estímulo da coinfecção na oviposição de vermes de *S. mansoni*.

A maior quantidade de ovos encontrados no intestino delgado se comparado ao observado no intestino grosso se deve ao fato de que em camundongos a oviposição parece estar concentrada nas Placas de Peyer do intestino delgado (ou conglomerados linfó nodulares ileais) diferentemente dos primatas, onde os ovos são detectados mais facilmente no cólon e no reto (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). A carência de ovos no intestino grosso determinou ausência de remodelamentos morfológicos significativos entre os animais dos grupos experimentais. Mas, os granulomas no intestino delgado determinaram mudanças estruturais similares entre os grupos com *S. mansoni*, mas com menor grau de inflamação e áreas granulomatosas menores no grupo coinfectado que foi submetido ao tratamento. A produção de granulomas no intestino, diferentemente do que ocorre em outros órgãos, não deixa de ser favorável ao verme, pois a inflamação induzida pelos antígenos dos ovos faz parte das estratégias desenvolvidas pelo *S. mansoni* para permitir o trânsito do ovo até o lúmen intestinal e expulsar os ovos do hospedeiro (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Não obstante, a percentagem dos ovos que ficam aderidos na parede intestinal, ocasionam lesões intestinais que acabam promovendo perda de funções motoras gastrointestinais como consequência da inflamação estimulada pelos antígenos dos ovos (MOREELS *et al.*, 2001).

Por fim, neste estudo analisamos a concentração plasmática de BZL após períodos determinados. A esquistossomose crônica não influenciou significativamente na concentração plasmática do BZL nos tempos testados em relação ao grupo controle. Devido ao fato do BZL quando administrado por via oral ser primeiramente absorvido no intestino e depois metabolizado no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450 (CYP450) (DAVANÇO, 2015), esperávamos mudanças nas concentrações plasmáticas em decorrência da patologia sofrida nos órgãos envolvidos na farmacocinética da droga. O intestino é afetado na fase crônica da esquistossomose pela formação de granulomas na parede intestinal, assim como ocorre no fígado, como foi mostrado em nossos resultados. O comprometimento destes órgãos poderia influenciar na captação do BZL no lúmen intestinal e, posteriormente, em sua

biodisponibilidade (concentração do fármaco no sistema circulatório) ao não ser absorvido da mesma proporção que em camundongos sem esquistossomose. Estudos mostram que animais infectados experimentalmente com *S. mansoni* tem uma menor concentração de praziquantel (PZQ) em plasma acompanhado de uma baixa taxa de eliminação do mesmo em relação aos animais do grupo controle, o que pode ser atribuído aos danos produzidos pelos granulomas nos tecidos (ANDREWS, 1985). Ainda são necessárias análises mais robustas para determinar a cinética do BZL em conjunto com a esquistossomose mansônica para maior compreensão sobre a interação do *T. cruzi* com o *S. mansoni*, mas por enquanto, os resultados sobre concentração do medicamento obtidos neste trabalho indicam que a infecção prévia por *S. mansoni* não compromete a eficácia terapêutica do BZL no tratamento da doença de Chagas.

8 CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

- a) A infecção crônica com *S. mansoni* induz pico de parasitemia de *T. cruzi* até 5 vezes maior do que o observado em animais com infecções simples com o protozoário, mas passado este momento, o parasitismo é controlado de forma eficaz nestes animais, como evidenciado pelo parasitismo cardíaco detectado pela PCR.
- b) A infecção crônica pelo *S. mansoni* em camundongos não altera de maneira significativa o efeito do tratamento com benznidazol na sobrevivência, no peso corporal e na redução de parasitismo sanguíneo e cardíaco de *T. cruzi*.
- c) A coinfeção reduz a polarização dos perfis anti e pró-inflamatórios das citocinas induzidas pelo *S. mansoni* e pelo *T. cruzi* quando em situação de infecção simples. O benznidazol leva a uma diminuição de citocinas plasmáticas antiinflamatórias em animais coinfectados com *T. cruzi* e *S. mansoni* sem efeito nas citocinas proinflamatórias.
- d) A coinfeção gera hiperplasias hepatoesplênicas e miocardite acentuada. O uso do benznidazol não melhora a hepatomegalia em animais coinfectados, mas o aumento do baço é evitado. Além disso, o tratamento consegue prevenir a infiltração celular no coração, fígado e no intestino em animais coinfectados.
- e) A coinfeção, com ou sem tratamento, não influencia de forma significativa o remodelamento de granulomas hepáticos. Mas nestes animais, foi observado aumento da porcentagem de animais com granulomas no pulmão e no intestino.
- f) A esquistossomose crônica não influenciou de maneira significativa na concentração plasmática do benznidazol em camundongos coinfectados por *T. cruzi* e tratados na fase aguda, a partir da análise realizada.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, A. *et al.* Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice fed a high-fat diet. **Parasitology**, v. 139, n. 6, p. 716–725, 2012.
- ALVES, D. F. *et al.* Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 4, p. 330–333, 2018.
- AMARAL, K. B. *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.
- AMIRI, P. *et al.* Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. **Nature**, v. 356, p. 604–607, 1992.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 819–823, 2005.
- ANDREWS, P. *et al.* Praziquantel. **Medicinal Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 147–200, 1983.
- ANDREWS, P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 129–156, 1985.
- ARAÚJO, N. *et al.* Comportamento da cepa LE de *Schistosoma mansoni*, após passagem em hospedeiro humano infectado acidentalmente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 4, p. 213–218, 1986.
- ARAUJO, T. **Doença de Chagas**. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>. Acesso em: 03 jun. 2021
- ARIAS-DEL-ANGEL, J. A. *et al.* Motility patterns of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes correlate with the efficiency of parasite invasion in vitro. **Scientific Reports**, v. 10, p. 15894, 2020.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. G. *et al.* Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 154, p. 42–49, 2015.
- BLOCH, H. In Vivo Microscopy of Schistosomiasis II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the Lungs, Liver, and Intestine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 1, p. 62–70, 1980.
- BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and pathogenesis of rheumatic heart disease. **Annual Reviews**, v. 14, p. 421–447, 2019.
- BRACEY, N. A. *et al.* The Nlrp3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . **Experimental Physiology**, v. 98, n. 2, p. 462–472, 2013.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico Doença de Chagas - 14 de abril - dia Mundial. **Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde**, n. Especial, p. 42, 2020.
- BRASIL, M. DA S. **Vigilância da Esquistossomose mansoni. Diretrizes Técnicas**. 4a. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.
- BRENER, Z. Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 4, n. 6, p. 389–396, 1962.

- BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2016.
- BRIAND, V. *et al.* Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: protective effect of schistosomiasis on malaria in senegalese children? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 702–707, 2005.
- BUSTINDUY, A. *et al.* HIV and schistosomiasis co-infection in African children. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 640–649, 2014.
- CAFFREY, C. Schistosomiasis and its treatment Future. **Future Med. Chem.**, v. 7, n. 6, p. 675–676, 2015.
- CALDAS, I. S. *et al.* Benznidazole Therapy During Acute Phase of Chagas Disease Reduces Parasite Load but does not Prevent Chronic Cardiac Lesions. **Parasitology Research**, v. 103, p. 413–421, 2008.
- CALVOPINA, M. *et al.* Fatal acute Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* DTU TcI, Ecuador. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–5, 2020.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–15, 2016.
- CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, 2020.
- CHAPMAN, J. *et al.* **Splenomegaly**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430907/>. Acesso em: 01 dez. 2020.
- CHIEFFI, P. P. Interrelationship between schistosomiasis and concomitant diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. Suppl 4, p. 291–296, 1992.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: Past, present ... and future? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 68, n. 1, p. 35–85, 1995.
- CORDEIRO, Z. M. S.; DAHIA, A. C. G.; ANDRADE, Z. A. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 3–9, 1997.
- COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3042, 2018.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 641–645, 2011.
- COX, F. E. G. Parasites and Immune Responses. **Parasitology**, v. 122, p. S23–S38, 2001.
- CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53–59, jun. 2003.
- DAVANÇO, G. M. **Farmacocinética do Benznidazol Administrado em Coelhos na Forma de Comprimidos de Liberação Imediata e Comprimidos de Liberação Prolongada.** [s.l.]

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2015.

DIAS, J. C. P. Evolution of Chagas Disease Screening Programs and Control Programs Historical Perspective. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 193–202, 2015.

DOENHOFF, M. J.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: Its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 4, n. 2, p. 199–210, 2006.

DOHERTY, J. F.; MOODY, A. H.; WRIGHT, S. G. Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis. **BMJ**, v. 313, n. 1.996 mil, p. 1071–1072, 1996.

DOMINGUES, C. S. *et al.* Oral outbreak of chagas disease in santa catarina, Brazil: Experimental evaluation of a patient’s strain. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–18, 2015.

ECHEVERRÍA, L. E. *et al.* Efficacy of the Benznidazole+Posaconazole combination therapy in parasitemia reduction: An experimental murine model of acute Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. e20190477:, p. 1–8, 2020.

FAGBEMI, B. O.; CHRISTENSEN, N. O.; DIPEOLU, O. O. Effects of *Trypanosoma brucei* and *Babesia microti* infections on the primary granulomatous reaction to *Schistosoma* eggs in mice. **Laboratory Animals**, v. 21, p. 121–124, 1987.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FILES, : : VIRGINIA S.; CRAM, E. B. A Study on the Comparative Susceptibility of Snail Vectors to Strains of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of parasitology**, v. 35, n. 6, p. 555–560, 1949.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today**, v. 7, n. 9, p. 240–244, 1991.

GATTO, M. *et al.* Benznidazole affects expression of Th1, Th17 and Treg cytokines during acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2017.

GENARO, O.; BRENER, Z.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni*: Immunodepression of Hepatic Schistosome Granuloma Formation in Mice Infected by *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p. 35–37, 1986.

GONÇALVES, V. M. *et al.* NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2013.

GREER, G. J.; OW-YANG, C. K.; YONG, H. S. *Schistosoma malayensis* n. sp.: a *Schistosoma japonicum*-complex schistosome from Peninsular Malaysia. **J Parasitol**, v. 74, n. 3, p. 471–80, 1988.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

GUTIERRE, F. R. *et al.* The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Cruz, Mem. Inst. Oswaldo**, v. 104, n. 1, p. 236–245, 2009.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: Friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. APR, p. 1–8, 2013.

- HELMBY, H.; KULLBERG, M.; TROYE-BLOMBERG, M. Altered Immune Responses in Mice with Concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* Infections. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5167–5174, 1998.
- HERBERT, D. R. *et al.* Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 623–635, 2004.
- HOTEZ, P. J. *et al.* An Unfolding Tragedy of Chagas Disease in North America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2300, 2013.
- INIESTA, V. *et al.* Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. **Infect Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6085–6090., 2005.
- JANSEN, A. M. *et al.* **Distribuição das DTUs de *Trypanosoma cruzi* na Natureza de Brasil.** Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/biogeografia/>. Acesso em: 29 set. 2020.
- JUNQUEIRA, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev. Mol. Med. V**, v. 12, n. e29, p. 1–24, 2010.
- JUNQUEIRA, L.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** São Paulo: [s.n.].
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. ESQUISTOSSOMOSE, XISTOSA, BARRIGA D'ÁGUA. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38–41, 2003.
- KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Sage Journals**, v. 4, n. 1, p. 65–79, 2008.
- KLOETZEL, K. *et al.* Concomitant Infection of Albino Mice by *Cruzi* and *Schistosoma mansoni* Parasitological Parameters. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 5, p. 652–658, 1973.
- KOLÁŘOVÁ, L. *et al.* Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 45, n. 1, p. 63–74, 2013.
- KÖLLIKER-FRERS, R. A. *et al.* Chagas Cardiomyopathy: Role of Sustained Host-Parasite Interaction in Systemic Inflammatory Burden. **Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges**, v. 95, 2018.
- KRATZ, J. M. *et al.* Expert Review of Clinical Pharmacology Clinical and pharmacological profile of benzimidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.
- KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-Specific Th1 But Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 2001.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: Clinical, diagnostic and therapeutic features. **REV. INST. MED. TROP. SÃO PAULO**, v. 35, n. 5, p. 399–404, 1993.
- LEE, B. Y. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, abr. 2013a.
- LEE, V. S. T. *et al.* *Schistosoma mansoni*: Assessment of effects of oleic acid, cercarial age and water temperature on parasite-host attraction. **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 837–842, 2013b.

- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. **B Am Mus Nat Hist**, v. 163, n. 3, p. 123–520, 1979.
- LENZI, O. DOS S.; ZECH, C. P. M.; LEONEL, C. H. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008.
- LINDER, E. The Schistosome Egg in Transit. **Ann Clin Pathol**, v. 5, n. 3, p. 1110, 2017.
- LUO, B. *et al.* Association of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 inflammasome and adverse clinical outcomes in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1521–1528, 2013.
- LUQUETTI, A. O.; PORTO, C. C. Aspectos médico-trabalhistas da doença de chagas. In: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 486.
- MABBOTT, N. A. The Influence of Parasite Infections on Host Immunity to Co-infection with other Pathogens. **Front. Immunol.**, v. 9, n. November, p. 1–14, 2018.
- MACDONALD, A. S. *et al.* CD8 – Dendritic Cell Activation Status Plays an Integral Role in Influencing Th2 Response Development . **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 4, p. 1982–1988, 2001.
- MASSAGO, M. *et al.* Mice Intra-gastric Infected with Insect and Blood Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* IV: Differences and Similarities on the Evolution Profile and Response to Etiological Treatment. **Acta parasitologica**, p. 1–4, 2021.
- MATA, L. Sociocultural Factors in the Control and Prevention of Parasitic Diseases. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 871–879, 1982.
- MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009.
- MEIS, J. DE *et al.* Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, p. e417, 2009.
- MOORE, D. V.; SANDGROUND, J. H. The Relative Egg Producing Capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma Japonicum*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, n. 5, p. 831–840, 1956.
- MOREELS, T. G. *et al.* Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. 43–45, 2001.
- MOSER D.R.; KIRCHHOFF L.V.; DONELSON J.E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 1477–1482, 1989.
- MULU, A. *et al.* Epidemiological and clinical correlates of malaria-helminth co-infections in southern Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 12, n. 227, p. 1–7, 2013.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4 + T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. **The Journal of**

Immunology, v. 160, p. 5347–5354, 1998.

NASCIMENTO, M. *et al.* Ly6Chi Monocyte Recruitment Is Responsible for Th2 Associated Host-Protective Macrophage Accumulation in Liver Inflammation due to Schistosomiasis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1–14, 2014.

NATION, C. S. *et al.* Schistosome migration in the definitive host. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 4, p. 1–12, 2020.

NEVES, J. *et al.* Esquistossomose pulmonar. II. Forma crônica reativada com hipertensão e Cor pulmonale. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 13, n. 1, p. 35–44, 1980.

NIRDE, P. *et al.* Ecdysone and 20 hydroxyecdysone: new hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni*. **FEBS Letters**, v. 151, n. 2, p. 223–227, 1983.

NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P. DE; ARAÚJO, H. C. DE. Síntese do Anti-Helminto praziquantel a partir da Glicina. **Quím. Nov**, v. 22, n. 1, 1999.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Morphological Reorganization of the Myocardium Parenchyma and Stroma, and Modifies the Mechanical Properties of Atrial and Ventricular Cardiomyocytes in Rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

O'NEILL, L. A. J. How Toll-like receptors signal: What we know and what we don't know. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2006.

OLIVERA, M. J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185033, 2017.

OLIVIERI, B. P. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 228–234, 2006.

OMS. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 05 jun. 2021. .

OMS. **Schistosomiasis**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 05 jun. 2021.

PASCUTTI, M. F. *et al.* Benznidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 76, n. 6, p. 685–697, 2004.

PEARCE, B. E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, n. 1, p. 159–166, 1991.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, 2002.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Seminar**, v. 391, p. 82–94, 2018.

PERIN, L. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–9, 2017.

PETERSEN, C. A.; KRUMHOLZ, K. A.; BURLEIGH, B. A. Toll-like receptor 2 regulates

- interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6974–6980, 2005.
- RASSI, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883–889, 2000.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152–158, 2009.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- REIS, L. F. *et al.* Quantitative and Qualitative Interferences of Pentoxifylline on Hepatic *Schistosoma mansoni* Granulomas : Effects on Extracellular Matrix and Eosinophil Population. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 107–112, 2001.
- REVELLI, S. *et al.* Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 118, p. 271–277, 1999.
- RHEINBERG, C. E. *et al.* *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, and *S. rodhaini* in mice: relationship between patterns of lung migration by schistosomula and perfusion recovery of adult worms. **Parasitol Res**, v. 84, p. 338–342, 1998.
- RODRIGUES, J. P. F. *et al.* *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 66, p. 43–52, 2017.
- RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi* : Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 12, 2012.
- SALVADOR, F. *et al.* Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. 1–8, 2016.
- SEUBERT, J.; POHLKE, R.; LOEBICH, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes. **Experientia**, v. 33, n. 8, p. 1036–1037, 1977.
- SHEWEITA, S. A.; MANGOURA, S. A.; EL-SHEMI, A. G. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection induce changes in drug-metabolizing enzymes. **Journal of helminthology**, v. 72, n. 1, p. 71–78, 1998.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351–357, 1991.
- SILVA, D. R. DA *et al.* Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 211–216, 2012.
- TAFURI, W. L.; CHIARI, E.; RASO, P. Ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi* e sua importância na patogênese da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, n. 4, p. 219–221, 1983.
- TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and

autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.

TELES, H. M. S. Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 426–432, 2005.

TELLES, E. S. **Aspéctos Imunológicos e parasitológicos na Infecção Múltipla por *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e *Schistosoma mansoni* (cepa BH) em Camundongos (CBA x C57 B1/10) F1.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1990.

UFMS. **Linhagens Produzidas – Biotério.** Disponível em: <https://inbio.ufms.br/bioterio/linhagens/>. Acesso em: 13 out. 2020.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, 2010.

VARGAS, A. *et al.* Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cad. Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. e00006517, 2018.

VELLI, R. E. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Parasitology Research**, v. 87, n. 7, p. 539–547, 2001.

VIVEROSA, P. V.; MONROYA, R. H.; ALVA, J. Á. V. Esplenomegalia. **Rev. Fac. Med. (Méx.)**, v. 56, n. 2, p. 37–45, 2013.

WANG, Y. *et al.* NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 91–106, 2020.

WEERAKOON, K. G. A. D. *et al.* Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 939–967, 2015.

XIAO, S.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. J. Effect of praziquantel in vitro on different developmental stages of *Schistosoma japonicum*. **The Journal of Infectious Disease**, v. 151, n. 6, p. 1130–1137, 1985.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 2018.