

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ELDA GONÇALVES DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS COM LACTONAS SESQUITERPÊNICAS  
ISOLADAS DE *Tithonia diversifolia*, EM MONOTERAPIA E COMBINADAS AO  
BENZNIDAZOL, DURANTE INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL POR  
*Trypanosoma cruzi***

Alfenas/ MG  
2018

**ELDA GONÇALVES DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS COM LACTONAS SESQUITERPÊNICAS  
ISOLADAS DE *Tithonia diversifolia*, EM MONOTERAPIA E COMBINADAS AO  
BENZNIDAZOL, DURANTE INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL 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<sup>o</sup> Ivo Santana Caldas

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Ap. Chagas de Paula

Alfenas/ MG

2018

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

S237i Santos, Elda Gonçalves dos  
Influência dos tratamentos com lactonas sesquiterpênicas isoladas de  
Tithonia diversifolia, em monoterapia e combinadas ao benznidazol, durante  
infecção aguda experimental por Trypanosoma cruzi / Elda Gonçalves dos  
Santos. -- Alfenas/MG, 2018.

97 f. : il. --

Orientador: Ivo Santana Caldas.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal  
de Alfenas, 2018.  
Bibliografia.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Lactonas -  
Sesquiterpenos. 4. Benzimidazóis. I. Caldas, Ivo Santana. II. Título.

CDD-616.9363

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva  
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.  
CEP: 37130-001



ELDA GONÇALVES DOS SANTOS

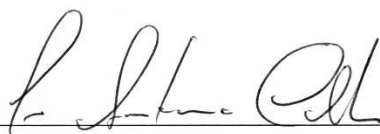
**“Influência dos tratamentos com Lactonas Sesquiterpênicas isoladas de *Tithonia diversifolia*, em monoterapia e combinadas ao benznidazol, durante infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 26 de fevereiro de 2018.

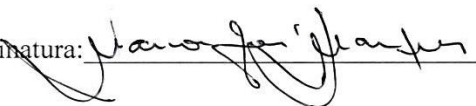
Prof. Dr. Ivo Santana Caldas  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Leticia de Almeida  
Instituição: USP

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

*Dedico esse trabalho àquele que me  
inspira ser uma pessoa melhor, meu filho  
Abner Vinícius Gonçalves dos Santos.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por amar-me de uma forma incondicional. Pela sua bondade em fazer-me sonhar e capacitar-me para realizar cada sonho. Sem seu auxílio, eu não teria conseguido!

À **Universidade Federal de Alfenas** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**, por essa oportunidade.

Ao professor **Drº Ivo Santana Caldas**, defini-lo como orientador é pouco... Um amigo! Admiro-o pela paciência, gentileza, ética, humildade, saber e dedicação. Obrigada pelas palavras de incentivo, e por acreditar (mais que eu mesma) que eu seria capaz.

À professora **Drª Daniela Aparecida Chagas de Paula**, pela co-orientação e parceria na realização deste projeto. Agradeço também aos colaboradores do Instituto de Química da UNIFAL-MG, pela importante contribuição.

Ao Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG por me acolher, aos professores **Marcos José Marques** e **Raquel Lopes Martins Souza**, pela excelente convivência e pelos conhecimentos transmitidos.

Com carinho, agradeço à profª **Lívia de Figueiredo Diniz**, pela colaboração na parte in vitro, por explicar-me cada detalhe dos protocolos até que eu realmente tivesse aprendido... E como aprendi com você! Não posso deixar de agradecer os inúmeros "cafézinhos" com papo científico, e palavras de incentivo e apoio.

Aos alunos de iniciação científica e amigos, **Mariana e Diego** (hoje mestrando), pela contribuição na parte experimental, por trazer descontração durante as longas e cansativas jornadas de curvas de parasitemia.

Apesar da ausência, meu pai, **Expedito José Gonçalves**, mais uma vítima da doença de Chagas. Meu incentivo desde o início, na verdade, um dos meus maiores motivos para seguir esta linha de pesquisa.

À minha mãezinha **Rita**, pelo seu amor, pelas infinitas orações, e por estar disponível nas horas de sufoco. Por se alegrar junto comigo diante das vitórias, mesmo sem entender o que cada uma delas significava para mim.

Ao meu esposo **Gilmar**, pelo companheirismo e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Ao **Abner Vinícius**, meu filho amado, âncora da minha vida. Obrigada por compreender minha ausência nesse período, pelos abraços apertados que me traziam acalento. Obrigada por ser meu maior incentivador, ajudando-me a superar meus limites, mesmo sendo criança. Você me ensina tanto!

Às minhas irmãs, **Cinéia e Helena**, que com carinho e dedicação cuidaram do meu filho nos momentos em que estive ausente.

*A todos que dividiram comigo as alegrias e as dificuldades dessa jornada, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa de minha vida.*

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, ainda faz parte do grupo de doenças negligenciadas, uma vez que ainda são escassos os investimentos destinados às pesquisas para desenvolvimento de novas drogas, de modo que as opções terapêuticas são limitadas. Sendo assim, é evidente a necessidade de estudos com a finalidade de desenvolver novos medicamentos eficazes na quimioterapia da doença. A espécie *Tithonia diversifolia*, o margaridão, é uma planta considerada invasora no Brasil, sendo encontrada ao longo de rodovias e em terrenos baldios. As lactonas sesquiterpênicas (LSTs) isoladas desta planta, possuem ação anti-inflamatória e anti-parasitária, dentre outras ações farmacológicas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade tripanocida *in vitro* do extrato de lavagem foliar rico em LSTs (ELF) e da tagitinina C (TC) extraídos de *T. diversifolia*, isolados e em combinação com benznidazol (Bz). Adicionalmente, foi avaliado o potencial dos tratamentos, em monoterapia e combinados, em relação à capacidade de induzir a cura parasitológica, prevenir ou reduzir o índice de miocardite e suas influências na resposta imune celular e humoral de animais experimentalmente infectados pela cepa Y do *T. cruzi*. Os resultados demonstraram que tanto o ELF quanto a TC isolada possuem atividade tripanocida *in vitro*, apresentando a IC<sub>50</sub> de 0,6426 µg/mL e 0,4022 µg/mL, respectivamente. Tais resultados foram considerados promissores quando comparados à IC<sub>50</sub> de 9,32 µg/mL do fármaco de referência Bz. Ainda foi observado que o ELF e a TC reduziram em 32% e 51%, respectivamente, o índice de infecção por amastigotas em células H9c2, enquanto o Bz inibiu 36%. Nos experimentos *in vivo*, foi verificado que tanto o ELF quanto a TC foram capazes de suprimir a parasitemia dos animais experimentalmente infectados pela cepa Y, sendo observada uma potencialização desta atividade quando as LSTs foram combinadas ao Bz, uma vez que o tratamento com ELF+Bz induziu a 70% de cura nos animais, o mesmo índice foi observado no tratamento com Bz em monoterapia. Já a combinação TC+Bz foi capaz de suprimir totalmente a parasitemia e os testes do critério de cura confirmaram um índice de 100% de cura entre os animais submetidos a este tratamento. Através da dosagem de citocinas, foi observado que as terapias combinadas inibiram a produção de IFN-γ e TNF-α, importantes citocinas pró-inflamatórias ligadas à lesão tecidual associada à doença de Chagas, e foi verificado também que animais submetidos aos tratamentos contendo as LSTs apresentaram maiores produções da citocina IL-10, o que sugere uma modulação da resposta imunológica induzida pela atividade anti-inflamatória das LSTs. O benefício da modulação da resposta imune também foi evidenciado pela ausência e/ou redução de miocardite nos animais que receberam o tratamento combinado com ELF+Bz e TC+Bz. De maneira geral, nossos resultados demonstram que o tratamento combinado entre TC e Bz é promissor, pois além de induzir ao índice de cura superior ao Bz em monoterapia, ainda preveniu a miocardite nos animais. Além disso, as LSTs são capazes de interferir na resposta imune do hospedeiro, podendo esta interferência estar relacionada a melhor prognóstico da doença.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Lactonas sesquiterpênicas. Tagitinina C. Benznidazol.



## ABSTRACT

According to the World Health Organization, Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is still part of the neglected diseases group, since investments for research into new drug development are scarce, therapeutic options are limited. Thus, the need for studies with the purpose of developing new drugs effective in the chemotherapy of the disease is evident. The *Tithonia diversifolia* species, daisy, is a plant considered invasive in Brazil, being found along highways and in vacant lots. The sesquiterpene lactones (STLs) isolated from this plant have anti-inflammatory and anti-parasitic action, among other pharmacological actions. In this sense, the objective of this work was to evaluate the trypanocidal activity of foliar lavage extract in STLs (ELF) and tagitinin C (TC) extracted from *T. diversifolia*, isolated and in combination with benznidazole (Bz). In addition, the potential of monotherapy and combined treatments in relation to the ability to induce parasitological cure, and to prevent or reduce the myocarditis index and its influences on the cellular and humoral immune response of experimentally infected animals by *T. cruzi* Y strain were evaluated. The results demonstrated that both the ELF and the isolated TC have trypanocidal activity *in vitro*, presenting the IC<sub>50</sub> of 0.6426 µg/mL and 0.4022 µg/mL, respectively. These results were considered promising when compared to the IC<sub>50</sub> of 9.32 µg/mL of the reference drug Bz. It was also observed that ELF and TC reduced the rate of infection by amastigotes in H9c2 cells by 32% and 51%, respectively, while Bz inhibited 36%. In the *in vivo* experiments, it was verified that both ELF and TC could suppress the parasitemia of the animals experimentally infected by strain Y, being observed a potentiation of this activity when the STLs were combined with Bz, once the treatment with ELF + Bz induced 70% cure in the animals, the same rate was observed in the treatment with Bz monotherapy. The TC + Bz combination could completely suppress the parasitaemia and the tests of the curing criterion confirmed a cure rate of 100% among the animals submitted to this treatment. Through dosing of cytokines has been observed that combination therapy inhibited the production of IFN-γ and TNF-α, important inflammatory cytokines related to tissue injury associated with Chagas' disease, and was also found that animals subjected to treatments containing the STLs, presented higher IL-10 cytokine productions, suggesting a modulation of the immune response induced by the anti-inflammatory activity of the STLs. The benefit of modulation of the immune response was also evidenced by the absence and / or reduction of myocarditis in the animals receiving combined treatment with ELF + Bz and TC + Bz. In general, our results demonstrate that the combined treatment between TC and Bz is promising, since in addition to inducing the cure rate superior to Bz in monotherapy, it still prevented the myocarditis in the animals. In addition, the STLs are capable of interfering in the immune response of the host, and this interference may be related to a better prognosis of the disease.

Key words: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Sesquiterpene lactones. Tagitinin C. Benznidazole.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura Molecular do fármaco benznidazol.....   | 33 |
| Figura 2 - Estrutura molecular das lactonas sesquiterpênicas isoladas .....  | 34 |
| Figura 3 - Esquema de isolamento de lactonas sesquiterpênicas a partir do ELF.....   | 35 |
| Figura 4 - Linha do tempo na avaliação da eficácia do tratamento. ....   | 44 |
| Figura 5 - Atividade do benznidazol (Bz) e das substâncias naturais (ELF, TC e TA) sobre epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> : curvas dose-resposta.....                                    | 52 |
| Figura 6 - Efeitos antiproliferativos das combinações entre benznidazol e TC ou ELF sobre formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> : curvas dose-resposta.....                            | 53 |
| Figura 7 - Isoblograma representativo da interação <i>in vitro</i> entre benznidazol e TC ou ELF sobre as formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....                                  | 55 |
| Figura 8 - Atividade das substâncias naturais e do benznidazol sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> . ....  | 56 |
| Figura 9 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com a Lactona Sesquiterpênica isolada TA.....  | 58 |
| Figura 10 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com o ELF. ....   | 58 |
| Figura 11 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com a Lactona Sesquiterpênica isolada TC.....   | 59 |
| Figura 12 - Avaliação da parasitemia diária realizada em camundongos infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> .....   | 60 |
| Figura 13 - Efeito do tratamento com ELF e TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração do peso corporal de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> . .... | 64 |
| Figura 14 - Níveis séricos das enzimas de função hepática. ....  | 65 |
| Figura 15 - Níveis de produção de anticorpos da classe IgG e isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b.....   | 67 |
| Figura 16 - Níveis da citocina IFN-gama avaliados por ELISA. ....  | 69 |
| Figura 17 - Níveis da citocina TNF-alfa avaliados por ELISA.....   | 70 |
| Figura 18 - Níveis da citocina IL-10 avaliados por ELISA.....  | 71 |
| Figura 19 - Inflamação na área cardíaca dos camundongos inoculados ou não com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> .....  | 72 |
| Figura 20 - Imagens obtidas de lâminas com secções do coração de camundongos infectados ou não pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> .....  | 73 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Grupos experimentais utilizados na avaliação tripanocida do Extrato de Lavagem Foliar e da Tagitinina C, em monoterapia ou em combinação com benznidazol, no tratamento de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. ..... 43
- Tabela 2- Valores de inibição (IC<sub>50</sub>) obtidos através dos ensaios *in vitro* da atividade tripanocida do benznidazol, Extrato de Lavagem Foliar e das Tagitinininas A e C contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*..... 51
- Tabela 3- Efeitos antiproliferativos do benznidazol e da TC em combinação sobre epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*: FICs da IC<sub>50</sub>. ..... 54
- Tabela 4- Efeitos antiproliferativos do benznidazol e do ELF em combinação sobre epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*: FICs da IC<sub>50</sub>..... 55
- Tabela 5- Área sob a curva, pico máximo de parasitemia (tripomastigotas/0,1mL de sangue) e a média de doses dos fármacos necessárias para supressão da parasitemia. .... 61
- Tabela 6- Parâmetros utilizados no controle de cura de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*..... 62

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| %                | - Percentual   |
| µg               | - Micrograma   |
| µl               | - Microlitros  |
| µM               | - Micromolar   |
| A570             | - Absorbância a 570 nm                                     |
| A600             | - Absorbância a 600 nm                                     |
| ALT              | - Alanina Aminotransferase                                 |
| AST              | - Aspartato Aminotransferase                               |
| BOD              | - Demanda Bioquímica de Oxigênio                           |
| Bz               | - Benznidazol  |
| CC <sub>50</sub> | - Concentração citotóxica para 50% das células             |
| COX              | - Ciclooxigenase (s)                                       |
| DMEM             | - Dulbecco's Modified Eagle's Medium                       |
| ELISA            | - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                        |
| ELF              | - Extrato de lavagem foliar                                |
| FIC              | - Fração de concentração inibitória                        |
| IC <sub>50</sub> | - Concentração Inibitória de 50% da Atividade Enzimática   |
| IFN-γ            | - Interferon gama  |
| IgG              | - Imunoglobulina G   |
| IL-10            | - Interleucina 10  |
| LST(s)           | - Lactona(s) sesquiterpênicas(s)                           |
| LIT              | - Liver infusion tryptose                                  |
| LOX              | - Lipoxigenase (s)   |
| Nfx              | - Nifurtimox   |
| PBS              | - Salina tamponada com fosfato                             |
| PBS-Tween        | - Salina tamponada com fosfato acrescida de 0,05% Tween-20 |
| pH               | - Potencial hidrogeniônico                                 |
| rpm              | - Rotações por minuto                                      |
| R0               | - Fator de correção  |
| SFB              | - Soro fetal Bovino  |
| TA               | - Tagitinina A   |
| TC               | - Tagitinina C   |
| TNF-α            | - Fator de Necrose Tumoral-alfa                            |

## SUMÁRIO

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 16 |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 19 |
| 2.1          | A DOENÇA DE CHAGAS E O PROTOZOÁRIO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 19 |
| 2.2          | QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA DA DOENÇA DE CHAGAS .....  | 22 |
| 2.3          | PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS .....  | 24 |
| 2.4          | POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA FAMÍLIA ASTERACEAE.....  | 25 |
| 2.5          | <i>Tithonia diversifolia</i> E AS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS .....   | 26 |
| 2.6          | A TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS .....   | 28 |
| <b>3</b>     | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  | 30 |
| <b>4</b>     | <b>OBJETIVO GERAL</b> .....   | 31 |
| 4.1          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 31 |
| <b>5</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 32 |
| 5.1          | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....   | 32 |
| 5.2          | PARASITO: CEPA Y DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 33 |
| 5.3          | FÁRMACO E PRODUTOS NATURAIS AVALIADOS .....   | 33 |
| <b>5.3.1</b> | <b>Fármaco de referência para o tratamento</b> .....  | 33 |
| <b>5.3.2</b> | <b>Substâncias naturais extraídas de <i>Tithonia diversifolia</i></b> .....   | 33 |
| 5.3.2.1      | Coleta de <i>Tithonia diversifolia</i> .....  | 34 |
| 5.3.2.2      | Secagem das folhas.....   | 34 |
| 5.3.2.3      | Preparo do extrato de lavagem foliar (ELF).....   | 34 |
| 5.3.2.4      | Isolamento e identificação das lactonas sesquiterpênicas TA e TC .....  | 35 |
| 5.4          | EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....  | 36 |
| <b>5.4.1</b> | <b>Avaliação da atividade tripanocida dos compostos naturais, ELF, TA e TC<br/>contra as formas epimastigotas</b> ..... | 36 |
| <b>5.4.2</b> | <b>Avaliação da atividade tripanocida dos compostos naturais, ELF, TA e TC<br/>contra as formas amastigotas</b> .....   | 39 |
| <b>5.4.3</b> | <b>Avaliação da citotoxicidade do ELF, TA e TC</b> .....  | 40 |
| 5.5          | EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....   | 41 |
| <b>5.5.1</b> | <b>Animais</b> .....  | 41 |
| <b>5.5.2</b> | <b>Inoculação dos animais</b> .....   | 42 |
| <b>5.5.3</b> | <b>Confirmação da infecção</b> .....  | 42 |

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>5.5.4</b> | <b>Estratégias de tratamento .....</b>  | <b>42</b> |
| 5.5.4.1      | Definição das dosagens dos compostos naturais .....   | 42        |
| 5.5.4.2      | Grupos Experimentais .....  | 43        |
| <b>5.5.5</b> | <b>Avaliação da eficácia terapêutica - controle de cura.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>5.5.6</b> | <b>Avaliação da toxicidade .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>5.5.7</b> | <b>Sorologia para dosagem das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>5.5.8</b> | <b>Necropsia e coleta dos órgãos .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>5.5.9</b> | <b>Histopatologia .....</b>   | <b>48</b> |
| 5.5.9.1      | Técnica de Hematoxilina & Eosina .....  | 48        |
| <b>6</b>     | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>51</b> |
| 6.1          | <b>AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DE ELF, TA E TC, SOBRE AS FORMAS EPIMASTIGOTAS DA CEPA Y DO <i>T. cruzi</i> (IC 50) E SOBRE CÉLULAS H9c2 E ÍNDICE DE SELETIVIDADE .....</b>   | <b>51</b> |
| 6.2          | <b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ELF E DAS LSTs ISOLADAS TA E TC CONTRA AS FORMAS AMASTIGOTAS DA CEPA Y DO <i>T. cruzi</i>.....</b>   | <b>56</b> |
| 6.2          | <b>AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>6.2.1</b> | <b>Avaliação <i>in vivo</i> da atividade tripanocida do ELF e das LSTs isoladas TA e TC. ....</b>   | <b>57</b> |
| <b>6.2.2</b> | <b>Curvas de parasitemia dos animais tratados com o ELF e com a LST isolada TC, em monoterapia e combinadas ao Bz .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>6.2.3</b> | <b>Avaliação da eficácia do ELF e da LST isolada TC em induzir a cura parasitológica em camundongos infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>6.2.4</b> | <b>Efeito do tratamento com o ELF e com a TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração do peso corporal de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do <i>T.cruzi</i>. ....</b>   | <b>64</b> |
| <b>6.2.5</b> | <b>Efeito do tratamento com o ELF e com a TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração dos níveis séricos de AST e ALT nos camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do <i>T.cruzi</i>. ....</b>                           | <b>65</b> |
| <b>6.2.6</b> | <b>Influência dos tratamentos com ELF e taginina C, em monoterapia ou combinados ao Bz, na produção de Imunoglobulina G (IgG) e isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b), nos plasmas de camundongos infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i>.....</b> | <b>66</b> |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.2.7 | Influência dos tratamentos com ELF e LST isolada TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 no plasma de camundongos infectados pela cepa Y do <i>T. cruzi</i> ..... | 68 |
| 6.2.8 | Avaliação da capacidade dos tratamentos com ELF e TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, em prevenir ou reduzir a miocardite em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> .....  | 72 |
| 7     | DISCUSSÃO .....   | 74 |
| 8     | CONCLUSÃO.....  | 85 |
|       | REFERÊNCIAS .....   | 86 |

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e ambos foram descobertos e descritos no ano de 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Drº Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). Após mais de um século desde a sua descoberta, a doença de Chagas ou tripanossomíase americana ainda é prevalente em 21 países da América Latina e é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença tropical negligenciada (PINHEIRO; BRUM-SOARES; REIS, 2017).

A doença de Chagas é considerada como um importante problema de saúde pública, sendo que atualmente há no mundo aproximadamente 6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2017). A persistência da doença deve-se em grande parte às diversas formas de transmissão do *T. cruzi*, sendo a transmissão por via vetorial a de maior relevância, porém, ainda é possível a infecção ser adquirida por via oral, congênita, transfusional, transplantar e transmissão acidental (NEVES *et al.*, 2005; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Além de seres humanos, o parasito infecta ainda mamíferos selvagens e domésticos, incluindo cães, gatos, morcegos, ratos gambás e tatus, dificultando ainda mais o controle da doença de Chagas, uma vez que os reservatórios do parasito estão distribuídos em diferentes espécies e ambientes (COURA, 2013; STANAWAY; ROTH, 2015).

A partir da década de 80, medidas para o controle vetorial da doença de Chagas na América Latina foram relativamente eficazes, levando à interrupção da transmissão vetorial no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e em grande parte do Brasil em 2000 (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017). Porém, devido aos vários mecanismos de transmissão do *T. cruzi*, um novo cenário epidemiológico tem ocorrido em países não endêmicos devido à transmissão oral, por meio de alimentos, sucos e frutas contaminados com as fezes de triatomíneos infectados (DE NOYA *et al.*, 2015). Nos últimos anos, a transmissão por via oral foi registrada na região Amazônica, com apresentação clínica de elevada morbidade ressaltando a característica epidemiológica regional e demonstrando a maior eficácia da transmissão oral em comparação à transmissão vetorial (SHIKANAI-YASUDA, 2016).

A falta de diagnóstico e tratamento na fase aguda da doença é outro fator que contribui para a permanência da doença de Chagas. Segundo Chatelain (2017), a doença de Chagas afeta principalmente populações vulneráveis que não possuem acesso aos cuidados de saúde, das quais, estima-se que menos de 1% recebam tratamento. Atualmente, o tratamento da doença de Chagas encontra-se limitado aos medicamentos benznidazol e nifurtimox, que são eficazes na fase aguda, porém, apresentam eficácia reduzida durante o tratamento na fase



crônica da doença (PAUCAR; PÉREZ-SILANES, 2016; PÉREZ-MOLINA, JOSE A *et al.*, 2015).

O benznidazol é a primeira escolha para o tratamento uma vez que seus efeitos secundários são mais baixos que o nifurtimox, porém, ambos são relativamente tóxicos para os pacientes e requerem prolongada administração (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Dentre os efeitos adversos mais relatados por adultos em tratamento com o benznidazol estão: a reação de hipersensibilidade cutânea e desconfortos gastrointestinais, e algumas vezes são descritas neuropatia periférica, febre e leucopenia (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; PÉREZ-AYALA *et al.*, 2017). Perda de peso, erupção cutânea, sintomas gastrointestinais, insônia e dores musculares, são os efeitos adversos mais descritos decorrentes do tratamento com o nifurtimox (JACKSON *et al.*, 2010).

De acordo com Hasslocher-Moreno *et al.* (2012), em média 60% dos pacientes que apresentam efeitos adversos interrompem o tratamento nos primeiros trinta dias. A elevada interrupção do tratamento decorrente dos efeitos colaterais, a longa duração do tratamento, a toxicidade dose-dependente e a baixa eficácia na fase crônica da doença denotam a urgência de uma nova estratégia terapêutica com maior eficácia e menor toxicidade (COURA; DE CASTRO, 2002; DIAS; COURA; YASUDA, 2014). Diante desta urgente necessidade, nos últimos dez anos as parcerias público-privadas foram responsáveis por um significativo aumento de investimentos em programas de pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a doença de Chagas, sendo o Brasil um dos líderes em iniciativas e pesquisas sobre a doença (DIAS; COURA; YASUDA, 2014; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2016). Segundo Bahia *et al.* (2014), diferentes estratégias terapêuticas têm sido utilizadas na busca por novos tratamentos para a doença de Chagas, dentre elas, os regimes de reajuste para os medicamentos atuais, combinação de terapias e identificação de novos medicamentos com alvos específicos, as quais levam a uma visão otimista sobre a quimioterapia da doença de Chagas.

Nesse sentido, na busca por uma estratégia terapêutica mais eficaz e menos tóxica que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, tem crescido o número de pesquisas que investigam compostos ativos derivados de produtos naturais com atividades anti-*T. cruzi*, podendo esta ser uma estratégia promissora devido à alta diversidade estrutural do reino Plantae (MEIRA *et al.*, 2015; MIRANDA *et al.*, 2017). Asteraceae é uma das famílias de plantas mais estudadas no campo de pesquisas relacionadas aos produtos naturais, as moléculas lactonas sesquiterpênicas (LSTs) extraídas de algumas

espécies desta família possuem potente atividade antiparasitária (ACEVEDO *et al.*, 2017). Alguns estudos evidenciam o potencial de diversas LSTs como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamentos de doenças negligenciadas como a leishmaniose (KARIOTI *et al.*, 2009; RABITO *et al.*, 2014) e a doença de Chagas (DA SILVA *et al.*, 2013; FRANK *et al.*, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2002). Além da atividade tripanocida das LSTs em monoterapia, quando estas moléculas foram combinadas ao benznidazol foi observado um efeito sinérgico contra as formas epimastigotas do *T. cruzi* (COGO *et al.*, 2012).

Embora o mecanismo de ação das LSTs contra o *T. cruzi* ainda não esteja completamente elucidado, Sülsen *et al.* (2016) sugerem que esteja relacionado com a inibição e degradação da enzima tripanotona redutase, essencial na defesa do parasito frente ao estresse oxidativo.

Uma vez que as LSTs mostram-se promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas, propomos neste presente estudo avaliar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do extrato de lavagem foliar (ELF) e da LST isolada tagitinina C (TC) extraídos a partir da espécie *Tithonia diversifolia*, uma herbácea pertencente à família Asteraceae.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão traz, separadamente, tópicos para melhor entendimento a respeito dos principais aspectos relacionados à doença de Chagas e em relação às lactonas sesquiterpênicas como uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento da doença.

### 2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*

Descoberta e descrita no ano 1909 pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, a tripanossomíase americana, comumente chamada de doença de Chagas, é uma doença parasitária causada a partir da infecção pelo seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado, digenético e polifilético, pertence à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida, caracterizado pela presença de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela especializada contendo o DNA e localizada junto à mitocôndria (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

O parasito é normalmente transmitido durante o repasto sanguíneo dos seus vetores infectados, os triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiro (NEVES *et al.*, 2005). Os triatomíneos pertencem à família Reduviidae e à subfamília Triatominae, são insetos hematófagos, possuem hábito noturno e vivem cerca de 2 anos (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011). A transmissão do *T. cruzi* pela via vetorial é considerada a forma de transmissão de maior relevância epidemiológica, este meio de infecção é iniciada na camada dérmica ou mucosa conjuntival por meio das formas evolutivas tripomastigotas metacíclicas, depositados durante o hematofagismo, junto às fezes e urina dos triatomíneos infectados (BRENER, 1987; NOUVELLET; DUMONTEIL; GOURBIÈRE, 2013). Além da transmissão vetorial, ainda é possível a infecção ser adquirida através da transmissão transplacentária (congênita), transfusional, transplantar, acidental e transmissão oral (CARLIER; TRUYENS, 2015; COURA; JUNQUEIRA, 2015; GÓMEZ-P; MANTILLA-H; RODRIGUEZ-MORALES, 2014; KINOSHITA-YANAGA *et al.*, 2009). Sendo a transmissão pela via oral a de maior frequência no Brasil e em países como a Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa e Bolívia (DE NOYA; GONZÁLEZ, 2015).

Desde 1967, quando no Brasil foi notificado o primeiro caso de transmissão oral de *T. cruzi* em humanos, tem sido relatado um aumento significativo de casos agudos da doença de Chagas associados ao consumo de alimentos e bebidas contaminados, como carne de animais

selvagens, vegetais, extrato de cana-de-açúcar, polpa de açaí, etc., sendo a maior prevalência na região Amazônica (BARBOSA *et al.*, 2015; BELLO CORASSA *et al.*, 2016). Segundo Barbosa *et al.* (2015), dos 1,252 casos agudos de doença de Chagas notificados no Brasil entre os anos 2000 e 2011, 70% foram associados à transmissão oral e apenas 7% ocorreram a partir da transmissão vetorial. Tais dados merecem atenção, uma vez que o índice de mortalidade entre os indivíduos infectados através da via oral é maior quando comparado aos infectados pela via vetorial, sendo a taxa de mortalidade de 35% e 10% , respectivamente (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A alta infecciosidade da transmissão oral poderia estar associada à ausência de alterações inflamatórias visíveis após a infecção da mucosa gástrica levando à multiplicação parasitária na cavidade nasal e posteriormente disseminando ao cérebro e tecidos periféricos, conseqüentemente, levando o paciente à uma doença altamente sintomática podendo ser letal na maioria dos casos (EICKHOFF *et al.*, 2013; SILVA-DOS-SANTOS *et al.*, 2017). Segundo Filigheddu *et al.* (2017), a invasão e penetração do epitélio gástrico são mediadas por proteínas do parasito, como a glicoproteína gp82 que é resistente ao pH ácido, favorecendo a infecção das células do hospedeiro.

Em relação à transmissão vetorial, o parasito também utiliza um conjunto distinto de moléculas de superfície que interagem com a célula hospedeira, possibilitando a invasão celular, estas moléculas estão envolvidas no metabolismo, sinalização, ligação a ácidos nucleicos e sobrevivência e virulência do parasito, mecanismos essenciais na manutenção da infecção parasitária (BORGES *et al.*, 2016). O escape do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro é outro fator determinante para a eficácia e manutenção da infecção, sendo assim, enzimas como a cruzipaina e a tripanotona redutase estariam envolvidas nesse processo. A cruzipaina é uma cisteína protease presente em todas as fases evolutivas do parasito, e é responsável pela modulação da resposta imune frente à infecção, já a tripanotona redutase, é uma enzima com função voltada à redução da tripanotona dissulfeto T[S]<sub>2</sub> em tripanotona ditiol (T[SH]<sub>2</sub>), etapa essencial para manter o ambiente intracelular com baixa concentração de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, que são tóxicos ao parasito (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2017).

Uma vez que ocorre a interação entre o parasito e as células do organismo hospedeiro, inicia-se a fase aguda da doença que é caracterizada por altos níveis de parasitemia e possui duração de 4 a 8 semanas (MORILLO; ENCINA; RIBEIRO, 2013). As manifestações clínicas da fase aguda começam por volta do sexto dia após a infecção e duram entre um e dois meses; dentre os sintomas mais recorrentes estão a febre, o chagoma de inoculação, sinal

de Romaña, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017). Durante esta fase, ocorre uma inflamação mononuclear focal em vários órgãos, desencadeada pela ruptura das células parasitadas. A inflamação, especialmente no coração, é usualmente acompanhada por necrose das células parasitadas e não parasitadas (MILES; FELICIANGELI; ARIAS, 2003). De acordo com Neves *et al.* (2005), uma pequena percentagem de crianças, geralmente menores de dois anos de idade, apresenta forma aguda grave e pode falecer devido à insuficiência cardíaca ou à meningoencefalite. A parasitemia reduz significativamente a partir de 90 dias após a infecção e os pacientes evoluem para a fase crônica da doença apresentando uma forma assintomática, caracterizada pela presença de infecção confirmada por testes parasitológicos e/ou sorológicos, porém, com a ausência de manifestações clínicas e de alterações eletrocardiográficas e radiológicas (NUNES *et al.*, 2013).

Cerca de 10 a 30 anos após o início da infecção, aproximadamente 30% a 40% dos pacientes portadores da fase crônica indeterminada evoluem para a fase crônica sintomática ou determinada, sendo reconhecidas as formas cardíaca, digestiva, cardiodigestiva (ou mista) e neural da doença (CAROD-ARTAL, 2013). Dentre os pacientes que evoluem para a fase crônica sintomática, de 20% a 40% desenvolvem a forma cardíaca ou cardiopatia chagásica crônica (CCC), e por volta de 15% apresentam sintomas clínicos relacionados à forma digestiva da doença (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). Os sintomas clínicos mais frequentes nos pacientes que desenvolvem a CCC são os de disfunção ventricular, insuficiência cardíaca, arritmias, tromboembolismo sistêmico e pulmonar, podendo ainda ocorrer acidente vascular cerebral e morte súbita (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014).

Em indivíduos com a evolução da doença para a forma crônica digestiva, os sinais clínicos mais frequentes são a dilatação e disfunção de regiões do trato digestivo (esôfago e cólon) como a incoordenação motora, ficando ausente a propagação da onda contrátil ao longo do esôfago e intestino grosso, originando hipertrofia e dilatação (SÁNCHEZ-MONTALVÁ *et al.*, 2016).

O mecanismo responsável pela patogênese no curso da infecção por *T. cruzi* ainda não é bem elucidado, porém, sugere-se que as lesões nos tecidos dos pacientes chagásicos são geradas principalmente pela persistência parasitária e a auto-imunidade (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A ruptura mecânica das células parasitadas por ninhos de amastigotas gerariam infiltrações inflamatórias de células mononucleares com conseqüente degradação dos tecidos afetados e também de células não parasitadas, conduzindo à inflamação crônica, com o

desenvolvimento de lesões graves principalmente no coração, sistema nervoso periférico e regiões do trato digestivo (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006).

Sabe-se que a interação complexa entre parasito e hospedeiro são fatores determinantes no curso da doença de Chagas, porém, ainda são necessários mais estudos a fim de elucidar aspectos básicos parasitológicos, imunológicos, de biologia molecular, genéticos, clínicos e patológicos buscando entender a real contribuição de tais fatores e a maneira como eles interagem resultando na evolução das diferentes formas crônicas da doença (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

## 2.2 QUIMIOTERAPIA ESPECÍFICA DA DOENÇA DE CHAGAS

Desde a descoberta da doença de Chagas, vários estudos têm realizado a procura *in vitro* e *in vivo* de inúmeras substâncias objetivando a obtenção de fármacos que induzissem ao efeito curativo nas fases aguda e crônica da doença. Contudo, a maioria dos testes apresentaram resultados de baixa eficácia, induzindo no máximo efeitos parciais, sendo considerados pouco promissores (MUÑOZ; MURCIA; SEGOVIA, 2011).

A realidade do tratamento etiológico da doença de Chagas começou a melhorar entre os anos 1965 e 1975, quando foram introduzidos dois medicamentos, o nifurtimox e o benznidazol (DIAS; COURA; YASUDA, 2014). O nifurtimox é o composto 5- nitrofurano [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno-amino) tetrahidro-4H-1, tiazino 1,1-dióxido (Bayer 2502) comercializado com o nome Lampit®, porém, devido à alta toxicidade e a resistência apresentada pelas cepas, a partir da década de 80 sua comercialização foi interrompida no Brasil e posteriormente na Argentina, no Chile e no Uruguai (COURA; DE CASTRO, 2002).

O mecanismo de ação do nifurtimox não é bem elucidado, porém acredita-se que esteja relacionado com a redução do grupamento nitro ao grupo amino através da atividade de enzimas do tipo nitroreduases, este processo leva à formação de um intermediário nitro radicalar que reduz o oxigênio molecular formando o íon superóxido e regenerando o grupo nitro, processo conhecido como ciclo redox; o íon superóxido formado, após ser captado pela enzima superóxido dismutase gera peróxido de hidrogênio que na presença de íons, forma o radical hidroxila (SILVA *et al.*, 2009). Estes metabólitos, além de serem tóxicos aos parasitos, permitindo sua eliminação, também são tóxicos para as células do paciente, induzindo a manifestação de reações adversas (BIANCHI *et al.*, 2015). Dentre os efeitos colaterais relatados com maior frequência pelos pacientes tratados com nifurtimox estão:

erupção cutânea, perda de peso, dores musculares, insônia e sintomas gastrointestinais como vômitos, náuseas e dores abdominais (JACKSON *et al.*, 2010).

O benznidazol é o composto N-benzil-2-(2-nitroimidazol) acetamida, comercializado a partir do ano 1978 com o nome Rochagan® pela indústria farmacêutica Roche, sendo que, ao final do século XX foram transferidos os direitos e a tecnologia de fabricação ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE), uma empresa pública brasileira, e posteriormente, também ao Laboratório ELEA na Argentina, que atualmente produz o medicamento com o nome Abarax® (DIAS; COURA; YASUDA, 2014; MOLINA *et al.*, 2017).

Embora o mecanismo de ação do benznidazol ainda não esteja completamente elucidado, sugere-se que seja semelhante ao mecanismo do nifurtimox, com redução do grupo nitro ao grupo amino pela ação de enzimas do tipo nitroredutase, porém, não utilizando do ciclo redox, mas gerando metabólitos eletrofílicos que se ligariam de forma covalente com macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios do parasito, inibindo seu crescimento (SILVA *et al.*, 2009). Ainda é descrito que tais metabólitos poderiam contribuir com maior produção de IFN- $\gamma$ , conseqüentemente, aumentando a fagocitose e a lise dos parasitos. Além disso, poderia interferir no crescimento do *T. cruzi* através da inibição da enzima NADH-fumarato Redutase (EC 1.3.1.6) (CARNEIRO *et al.*, 2017). Recentemente, também foi demonstrado que o medicamento poderia agir por meio de oxidação de nucleotídeos e que durante a replicação do DNA, a incorporação extensiva de nucleotídeos oxidados gerariam rupturas de DNA de cadeia dupla, potencialmente letais ao *T. cruzi* (MATHEUS ANDRADE RAJAO, CAROLINA FURTADO *et al.*, 2014).

Uma vez que o parasito é deficiente de mecanismos de detoxificação, torna-se mais susceptível à ação tóxica dos metabólitos gerados a partir do mecanismo de ação do benznidazol, além de serem tóxicos para o parasito, tais metabólitos também são tóxicos para o hospedeiro, induzindo a efeitos colaterais (BERMUDEZ *et al.*, 2016). A baixa especificidade de ação em vias bioquímicas definidas do parasito, o longo período de tratamento e a baixa solubilidade do benznidazol, poderiam estar diretamente ligados ao surgimento dos efeitos adversos no paciente (PINAZO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009). São muitos os efeitos colaterais decorrentes do uso do medicamento, podendo ser destacados os vômitos, distúrbios gastrointestinais, anorexia, polineuropatia periférica, depressão da medula óssea, dentre outros (ANTONIO MARIN-NETO *et al.*, 2009). Os sintomas associados ao benznidazol observados em pacientes são uma das principais preocupações na prática clínica, visto que são preditores na interrupção do tratamento, de 31,6% a 60% dos pacientes que

apresentam reações adversas abandonam definitivamente o tratamento (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; OLIVERA *et al.*, 2017).

Apesar dos efeitos colaterais serem caracterizados como uma grande desvantagem no uso do medicamento, o benznidazol continua sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas devido a um melhor perfil de segurança e eficácia quando o tratamento é iniciado na fase aguda, estudos clínicos têm demonstrado que o medicamento é capaz de reduzir a parasitemia, prevenir o parasitismo e as lesões em órgãos alvo, principalmente no músculo cardíaco (MUÑOZ; MURCIA; SEGOVIA, 2011; TROCHINE *et al.*, 2014). Uma vez que o diagnóstico é tardio, o tratamento torna-se insuficiente, produzindo pouco ou nenhum efeito protetor durante o curso clínico da doença, este fato pode estar ligado à baixa solubilidade do fármaco que conseqüentemente também afeta sua biodisponibilidade, resultando em falha terapêutica na fase crônica da infecção, fase em que os parasitos são localizados principalmente nas células esqueléticas e musculares do coração (FERREIRA *et al.*, 2016; MOLINA *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2017).

Tendo em vista que são inúmeras as limitações apresentadas pelo atual tratamento da doença de Chagas, é urgentemente necessária a busca por novos métodos e esquemas terapêuticos mais seguros, de baixo custo e eficazes em ambas as fases da infecção.

### 2.3 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS FÁRMACOS

Historicamente, os produtos naturais e seus derivados desempenharam um papel significativo na medicina, as plantas formaram a base de sofisticados sistemas de medicina tradicional que existem há milhares de anos, entre as primeiras fontes de produtos naturais estão o óleo de cedro (*Cedrus sp.*), o óleo de cipreste (*Cupressus sempevirens*), o óleo de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), a mirra (*Commiphora sp.*) e o suco de papoula (*Papaver somniferum*) (PATRIDGE *et al.*, 2016).

Os produtos naturais (metabólitos secundários) continuam desempenhando um papel extremamente significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). O estudo de suas atividades biológicas e mecanismos moleculares subjacentes levaram à identificação do modo de ação de vários produtos naturais, etapas que se tornaram de grande relevância para o tratamento de diversas doenças humanas (BAUER; BRÖNSTRUP, 2014). Há um número significativo de medicamentos em desenvolvimento oriundos de produtos naturais, no ano de 2014 de 100 compostos derivados



de produtos naturais 38 estavam sendo analisados para o tratamento oncológico, 26 como anti-infecciosos, 19 para o tratamento de doenças cardiovasculares, 11 para doenças inflamatórias e 6 para distúrbios neurológicos (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014).

No contexto das doenças parasitárias, a pesquisa farmacêutica em produtos naturais também tem representado uma importante estratégia para novas drogas antiparasitárias, de 1982 ao ano 2000 o reino Plantae contribuiu para a introdução de 15 novos medicamentos no mercado, dentre eles estão o albendazol, ivermectina, artemisina, cloroquina, halofantrina, dentre outros (NEWMAN; CRAGG, 2016). Porém, apesar desses dados, algumas doenças negligenciadas como a tripanossomíase humana africana, a leishmaniose e a doença de Chagas, que não possuem viabilidade financeira para a indústria farmacêutica, prosseguem com o desafio da descoberta de medicamentos mais eficazes. Nesse sentido, o “Drugs for Neglected Diseases initiative” (DNDi), adotou um novo modelo de descoberta de novos medicamentos que tem sido aplicado com o intuito de combinar as habilidades e a capacidade de pesquisa na academia, indústrias farmacêuticas, parcerias público-privadas, etc., visando a criação de consórcios de pesquisas com identificação e triagem de bibliotecas, química medicinal, farmacologia e farmacodinâmica, desenvolvimento de formulações e fabricação (CHATELAIN; IOSET, 2011).

Uma vez que, dentre as 250.000 - 500.000 espécies de plantas existentes, estima-se que apenas uma fração foi investigada cientificamente em relação às atividades biológicas, ficando o restante como fontes potenciais inexploradas, a DNDi pode possibilitar a utilização de ferramentas analíticas baseadas em genômica, proteômica, metabolômica, bioinformática e outras tecnologias que acelerem a identificação e caracterização de potentes alvos terapêuticos, consequentemente, fornecendo medicamentos e tratamentos melhorados, baratos, seguros, acessíveis e confiáveis (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

#### 2.4 POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae é reconhecida como um dos maiores grupos dentre as angiospermas, é constituída por aproximadamente 1600 gêneros e cerca de 24.000 espécies de plantas herbáceas, arbustos e árvores (KATINAS *et al.*, 2016). A família Asteraceae é uma das mais representativas dentre as plantas medicinais utilizadas popularmente no Brasil, entre as espécies reconhecidas por suas propriedades farmacológicas estão o guaco (*Mikania laevigata*), a carqueja (*Baccharis trimera*), a calêndula (*Calendula officinalis*), a arnica

(*Arnica montana*), a alface (*Lactuca sativa*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), dentre outras (APARECIDA PAIVA *et al.*, 2015; ARORA; RANI; SHARMA, 2013; BANERJEE *et al.*, 2014; DAMERUM *et al.*, 2015; MARZOTTO *et al.*, 2016; SILVA; RABELO; ENOQUE, 2015; SINGH *et al.*, 2011).

A tribo *Heliantheae* é a segunda maior da família Asteraceae, composta por mais de 2.500 espécies, algumas destas espécies são conhecidas e investigadas devido ao alto potencial farmacológico e a diversidade estrutural de várias classes de moléculas, como os terpenóides e as lactonas sesquiterpênicas (LSTs), extraídas a partir das espécies *Helianthus annuus* e *Tithonia diversifolia*, respectivamente; dentre as ações farmacológicas comprovadas das LSTs, podem ser destacadas as atividades anti-inflamatória e antiparasitária, além disso, elas têm sido apontadas como ingrediente ativo em tratamentos para doenças como a diarreia, queimaduras, gripe, etc. (ABE *et al.*, 2015; ASCHENBRENNER; HORAKH; SPRING, 2013; CHADWICK *et al.*, 2013).

## 2.5 *Tithonia diversifolia* E AS LACTONAS SESQUITERPÊNICAS

A espécie *Tithonia diversifolia*, popularmente conhecida como margaridão, é pertencente à família Asteraceae e, apesar de ser nativa do México e da América Central, atualmente estão distribuídas em todo o mundo (OWOYELE *et al.*, 2004). Devido ao fato de crescer muito rápido, é considerado uma planta invasora, podendo esta característica ser útil para estudos fitoquímicos, uma vez que sempre estarão disponíveis grandes quantidades de material. De acordo com Chagas-Paula *et al.* (2012), há um grande número de publicações relacionadas à *T. diversifolia*, este fato pode ser devido à característica previamente mencionada e também devido ao seu amplo uso na medicina tradicional em diferentes continentes. As folhas de *T. diversifolia* são ingeridas como sucos para o tratamento de abscessos nos Andes Venezuelanos, e antidiabético em Taiwan, já no México são utilizadas para o tratamento de hematomas e câimbras musculares e também na infecção por *Plasmodium sp.* e no Quênia são utilizadas contra ectoparasitos na medicina veterinária (BUSSMANN *et al.*, 2006; HEINRICH *et al.*, 1998; JÁTEM-LÁSSER; RICARDI; ADAMO, 1998; MIURA *et al.*, 2005).

A *T. diversifolia* produz constantemente e em níveis elevados as moléculas lactonas sesquiterpênicas, que são encontradas em abundância principalmente nas folhas onde são mantidas em órgãos de armazenamento como os tricomas, e são utilizadas pela planta em reação a ataques microbianos, contra herbívoros, como atrativos de predadores de pragas e

também para proteção ultravioleta (CHADWICK *et al.*, 2013). As lactonas sesquiterpênicas podem desempenhar um significativo papel na saúde humana como agentes farmacêuticos, vários estudos investigaram e comprovaram o potencial farmacológico destas moléculas extraídas de *T. diversifolia*, sendo destacadas as atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antimaláricas, antimicrobianas e antidiabéticas (DI GIACOMO *et al.*, 2015).

Dentre os estudos que avaliaram a atividade antiparasitária de moléculas extraídas a partir de *T. diversifolia* estão aqueles que verificaram a atividade leishmanicida, antimalárica e tripanocida (DA SILVA *et al.*, 2013; FRANK *et al.*, 2013; JANSEN *et al.*, 2012; KARIOTI *et al.*, 2009; RABITO *et al.*, 2014; SCHMIDT *et al.*, 2002). Considerando os possíveis alvos terapêuticos presentes no parasito, há indícios de que o mecanismo de ação das lactonas sesquiterpênicas em relação à sua atividade tripanocida, estaria envolvido com a capacidade de inibição e degradação da enzima tripanotiona redutase, essencial na defesa do parasito frente ao estresse oxidativo, consequentemente, induzindo a morte celular programada do *T. cruzi* (SULSEN, *et al.*, 2016).

De acordo com Jimenez *et al.*, (2014), as lactonas sesquiterpênicas induzem um aumento na produção de ROS, levando a disfunção mitocondrial e ativação de nucleases, gerando danos ao DNA do parasito e consequentemente proporcionando alterações morfológicas e bioquímicas compatíveis com a morte celular programada em ambas as formas do *T. cruzi*, epimastigotas e tripomastigotas.

Uma vez que as lactonas sesquiterpênicas além de induzir nos parasitos a morte celular programada, ainda possui a propriedade anti-inflamatória com mecanismo de ação relacionado à inibição concomitante das enzimas ciclooxigenase (COX-1) e lipoxigenase (5-LOX), principais vias envolvidas na inflamação, estes mecanismos de ação tornam-se interessantes para um fármaco antichagásico, visto que na miocardite chagásica crônica, a manutenção de uma resposta pró-inflamatória é a causa da inflamação excessiva ou não controlada (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2012; ROSENBERG; MARTIN; TARLETON, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012). Nesse sentido, a indução da morte celular programada não somente permite a morte do parasito, bem como contribui para a modulação da resposta inflamatória, consequentemente, proporcionando efeitos benéficos aos tecidos do hospedeiro.

Embora ainda haja a necessidade de elucidar mais detalhes sobre os mecanismos de ação das lactonas sesquiterpênicas, tais resultados evidenciam o potencial farmacológico destas moléculas, apontando-as como uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento da doença de Chagas.

## 2.6 A TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS

A pesquisa sobre novos medicamentos e melhores protocolos para o tratamento específico da doença de Chagas, incluindo a terapia combinada, deve ser uma prioridade para pesquisadores e agências envolvidas na tripanossomíase (DIAS; COURA; YASUDA, 2014). A terapia da combinação de compostos além de ser alvo de pesquisas direcionadas a tratamento de várias doenças, como a doença de Alzheimer, é também uma estratégia já utilizada com êxito para tratar variadas patologias, como doenças cardiovasculares, câncer, AIDS e tuberculose, alcançando eficácia terapêutica maior do que a alcançada com monoterapia (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004; SAHOO *et al.*, 2018).

A redução do tempo e a dose utilizada no tratamento, o uso de compostos que atuem em diferentes elementos celulares e vias metabólicas e a redução do potencial de desenvolvimento de resistência aos fármacos são algumas vantagens conferidas pela terapia da combinação (GARCÍA *et al.*, 2016; VIVAS *et al.*, 2008).

No contexto da doença de Chagas, diversas combinações já foram testadas tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. A combinação *in vitro* de dois inibidores da biossíntese de ergosterol, o cetoconazol e a terbinafina, induziram a desintegração celular e alterações estruturais durante os estágios proliferativos do parasito, demonstrando maior efeito anti-*T.cruzi* quando comparados aos efeitos do tratamento em monoterapia (LAZARDI; URBINA; DE SOUZA, 1990). Em outro estudo, foi demonstrado que a terapia combinada entre o antifúngico posaconazol e o composto antiarrítmico amiodarona possuem atividade sinérgica, levando à interrupção da homeostase do  $Ca^{+2}$  do parasito e bloqueando a biossíntese de ergosterol (GUSTAVO BENAİM, *et al.*, 2006). Mais tarde, Diniz *et al.*, (2013) reforçaram a importância da investigação dos potenciais efeitos benéficos dos tratamentos combinados, demonstrando que as combinações de benznidazol e posaconazol têm uma interação positiva em modelos murinos da doença de Chagas.

A estratégia terapêutica utilizando a combinação entre benznidazol e metronidazol induziu a efeitos anti-*T.cruzi* em análises *in vitro* e *in vivo*, dentre eles a proteção da fisiologia elétrica cardíaca, que normalmente é alterada na infecção experimental (SIMÕES-SILVA *et al.*, 2017).

Uma vez que os produtos naturais são uma fonte importante para a busca de novos medicamentos antiparasitários, tem crescido o número de investigações envolvendo a combinação do benznidazol com compostos ativos extraídos a partir de plantas. Nesse sentido, o extrato etanólico concentrado de *Physalis angulata* demonstrou efeito sinérgico

com o benznidazol, induzindo a inibição de crescimento de epimastigotas, reduzindo a viabilidade de tripomastigotas sanguíneos e provocando a morte celular do parasito por necrose (MEIRA *et al.*, 2015). Dois trabalhos envolvendo a análise da terapia da combinação entre benznidazol e LSTs demonstraram resultados positivos, onde o tratamento levou a importantes alterações morfológicas das formas epimastigotas e mudanças no formato do corpo celular de formas tripomastigotas, com extravazamento do conteúdo citoplasmático (Cogo *et al.*, 2012), e apresentaram maiores taxas de cura durante a fase crônica quando comparadas às taxas de cura apresentadas pelo benznidazol em monoterapia (DE MELLO *et al.*, 2016).

Dado o grande potencial da terapia de combinação de fármacos e a necessidade de novas alternativas de tratamento para a doença de Chagas, é de suma importância a busca por novas estratégias ou protocolos de tratamentos utilizando os medicamentos já disponíveis.

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar de ter sido descoberta há mais de 100 anos, estudos recentes demonstram que a doença de Chagas ainda hoje é considerada um importante problema médico-social, atingindo principalmente a população de baixa renda. A doença de Chagas pode ser dividida em duas distintas fases clínicas, a aguda e a crônica; dentre os mecanismos envolvidos na patogênese da doença, a exacerbada resposta inflamatória do sistema imunológico do hospedeiro contra o parasito constitui-se um dos principais fatores na progressão da doença. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas faz parte do grupo de doenças negligenciadas, uma vez que não se dispõe de investimentos destinados às pesquisas de novos medicamentos, de modo que as opções terapêuticas são escassas e limitadas. Atualmente, no Brasil só se encontra disponível o fármaco benznidazol para o tratamento dos pacientes chagásicos, porém, vários estudos têm demonstrado que este medicamento é pouco benéfico se administrado somente na fase crônica da doença, sendo o tratamento da infecção mais efetivo se iniciado na fase aguda. Além da eficácia dependente da fase da infecção em que é iniciado o tratamento, o benznidazol ainda induz a vários e sérios efeitos colaterais nos pacientes em tratamento, sendo assim, é evidente a necessidade de estudos com o objetivo de desenvolver novos fármacos eficazes na quimioterapia da doença de Chagas. Nesse sentido, o reino Plantae têm se mostrado uma rica fonte de substâncias com atividades anti-parasitárias, como as LSTs extraídas de *T. diversifolia*, que além da atividade tripanocida, apresenta ainda ação anti-inflamatória. Estudos recentes têm demonstrado que além da capacidade de inibição concomitante das enzimas COX-1 e 5-LOX, importantes vias envolvidas na inflamação, as LSTs possuem ainda a atividade tripanocida, com mecanismos envolvidos na indução da morte celular programada do parasito. Estas propriedades das LSTs tornam-se interessantes para um fármaco antichagásico, permitindo a modulação da resposta inflamatória, conseqüentemente, proporcionando efeitos benéficos aos tecidos do hospedeiro.

Diante do exposto, este trabalho justifica-se devido às atividades concomitantes antiparasitárias e anti-inflamatórias das LSTs extraídas de *T. diversifolia*, culminando na morte do parasito por apoptose e na possível modulação da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. Desse modo, acreditamos que o tratamento combinado entre as LSTs e o fármaco benznidazol, poderia retardar a progressão da doença e/ou induzir a um maior índice de cura.

## 4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do extrato de lavagem foliar rico em LSTs e das tagitininas A e C, extraídos de *Tithonia diversifolia*, em monoterapia ou combinados ao benznidazol.

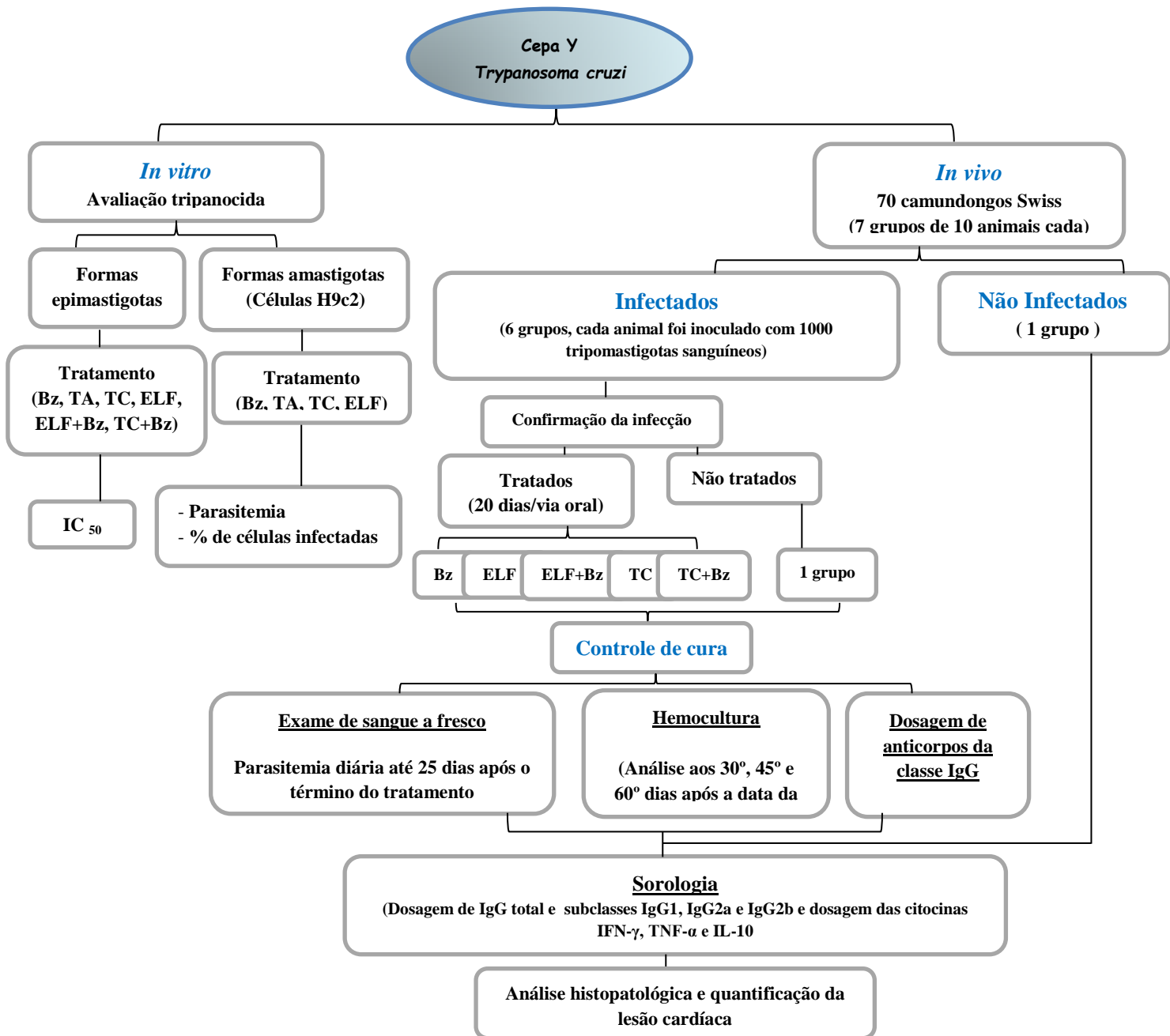
### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a atividade tripanocida *in vitro* do extrato de lavagem foliar rico em LSTs e das tagitinina A e C, em monoterapia ou combinadas ao benznidazol, contra as formas epimastigotas e amastigotas da cepa Y do *T. cruzi*;
- b) Avaliar a atividade tripanocida *in vivo* e a eficácia do tratamento com o extrato de lavagem foliar rico em LSTs e com a tagitinina C, em monoterapia ou combinadas ao benznidazol, em relação à capacidade de induzir a cura parasitológica em camundongos infectados experimentalmente pela cepa Y do *T. cruzi*;
- c) Avaliar os parâmetros histopatológicos de animais infectados com o *T. cruzi* e submetidos ou não ao tratamento com o extrato de lavagem foliar rico em LSTs e tagitinina C, associados ou não ao benznidazol;
- d) Avaliar a influência dos tratamentos com o extrato de lavagem foliar rico em LSTs e tagitinina C, em monoterapia ou combinadas ao benznidazol, na produção de Imunoglobulina G (IgG) e isotipos (IgG1 e IgG2a e IgG2b), nos soros de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*;
- e) Avaliar o perfil da resposta imune celular através da dosagem das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no sangue periférico dos camundongos experimentalmente infectados e tratados com o extrato de lavagem foliar rico em LSTs e tagitinina C, em monoterapia ou combinados ao benznidazol;
- f) Relacionar as alterações do padrão da resposta imune celular e humoral com a intensidade da inflamação no coração dos animais infectados e submetidos ao tratamento, comparativamente aos animais não tratados.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Toda a metodologia e material, utilizados na realização deste estudo, estão relacionados abaixo:

### 5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



**Bz** – tratamento com benznidazol; **ELF** – tratamento com extrato de lavagem foliar rico em LSTs; **TA** - tratamento com tagitina A; **TC** – tratamento com tagitina C; **ELF+Bz** - tratamento com extrato de lavagem foliar rico em LSTs combinado ao benznidazol; **TC+Bz** - tratamento com TC combinada ao benznidazol. **Fonte: Do autor**



## 5.2 PARASITO: CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi* nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Essa cepa é caracterizada por Filardi Brener (1987), como parcialmente sensível à quimioterapia com Bz. Foi isolada no ano de 1950 a partir de uma paciente chagásica na fase aguda da infecção, no município de Marília, SP e atualmente é mantida através de passagens sucessivas em camundongos Swiss no departamento de Parasitologia e Patologia da Universidade Federal de Alfenas.

## 5.3 FÁRMACO E PRODUTOS NATURAIS AVALIADOS

Abaixo estão relacionadas as substâncias naturais que foram avaliadas quanto à sua atividade tripanocida, comparativamente com o fármaco benznidazol.

### 5.3.1 Fármaco de referência para o tratamento

**Benznidazol (Bz):** composto N-benzil-2-(2-nitroimidazol) acetamida (figura 1), fornecido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) foi utilizado como fármaco de referência nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

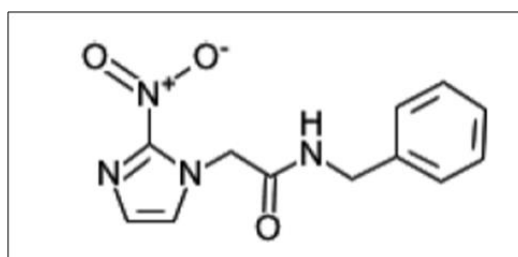


Figura 1 - Estrutura Molecular do fármaco benznidazol.  
Fonte: Silva, Jean Jerley N. *et al.* (2009)

### 5.3.2 Substâncias naturais extraídas de *Tithonia diversifolia*<sup>1</sup>

Foi avaliado o potencial tripanocida do extrato de lavagem foliar rico em diversas lactonas sesquiterpênicas (ELF) e das lactonas sesquiterpênicas (LSTs) isoladas Tagitinina A

<sup>1</sup> As etapas relacionadas à coleta das folhas de *Tithonia diversifolia*, produção do extrato de lavagem foliar rico em LSTs (ELF), isolamento e identificação da LST Tagitina C (TC), foram realizadas pela professora Dr<sup>a</sup> Daniela Aparecida Chagas de Paula e colaboradores, do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas, MG.

(TA) e Tagitinina C (TC) (Figura 2), extraídos de *Tithonia diversifolia*. Somente as substâncias que apresentaram melhor atividade tripanocida *in vitro* foram consideradas para os experimentos posteriores.

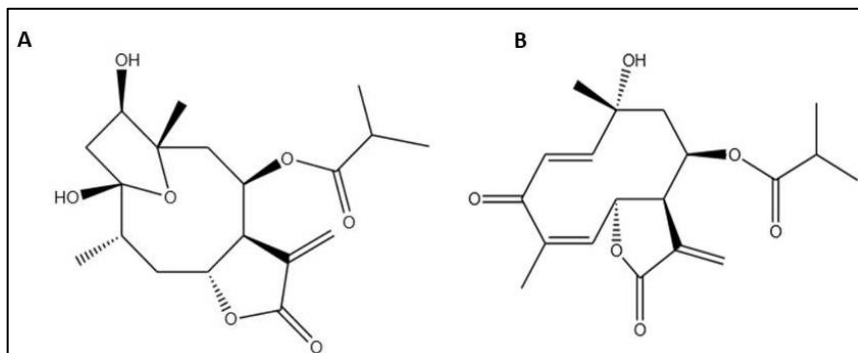


Figura 2 - Estrutura molecular das lactonas sesquiterpênicas isoladas. Em A: Tagitinina A (TA) e em B: Tagitinina C (TC). Fonte: Chagas-Paula *et al.* (2012)

#### 5.3.2.1 Coleta de *Tithonia diversifolia*

As folhas da *T. diversifolia* foram coletadas em terrenos baldios do bairro Jardim Aeroporto no município de Alfenas, MG.

#### 5.3.2.2 Secagem das folhas

As folhas para preparar o ELF, a TA e a TC foram secas em estufa de ar circulante, em temperatura de 40°, durante uma semana.

#### 5.3.2.3 Preparo do extrato de lavagem foliar (ELF)

O ELF foi obtido através da lavagem individual da superfície das folhas secas e íntegras por 20 segundos com acetona a fim de promover apenas a extração das substâncias armazenadas no interior dos tricomas glandulares, os quais estão localizados na superfície das folhas, mais precisamente na face abaxial. No processo de lavagem foliar foi monitorado o extravasamento dos tricomas glandulares observando em estereomicroscópio a face abaxial das folhas lavadas secas. O extrato com o conteúdo dos tricomas foi filtrado em papel de filtro comum e o solvente evaporado em rotaevaporador, resultando em um extrato seco. A acetona

evaporada foi recuperada e utilizada em lavagens posteriores. O extrato seco foi solubilizado em metanol (MeOH) e o material graxo precipitado com um terço do volume de água, resultando na fase hidrometanólica, a qual tem o solvente removido sob pressão reduzida em rotaevaporador. Posteriormente o extrato foi liofilizado e armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 5.3.2.4 Isolamento e identificação das lactonas sesquiterpênicas TA e TC

O isolamento das lactonas sesquiterpênicas TA e TC foi realizado conforme o esquema descrito na figura 3.

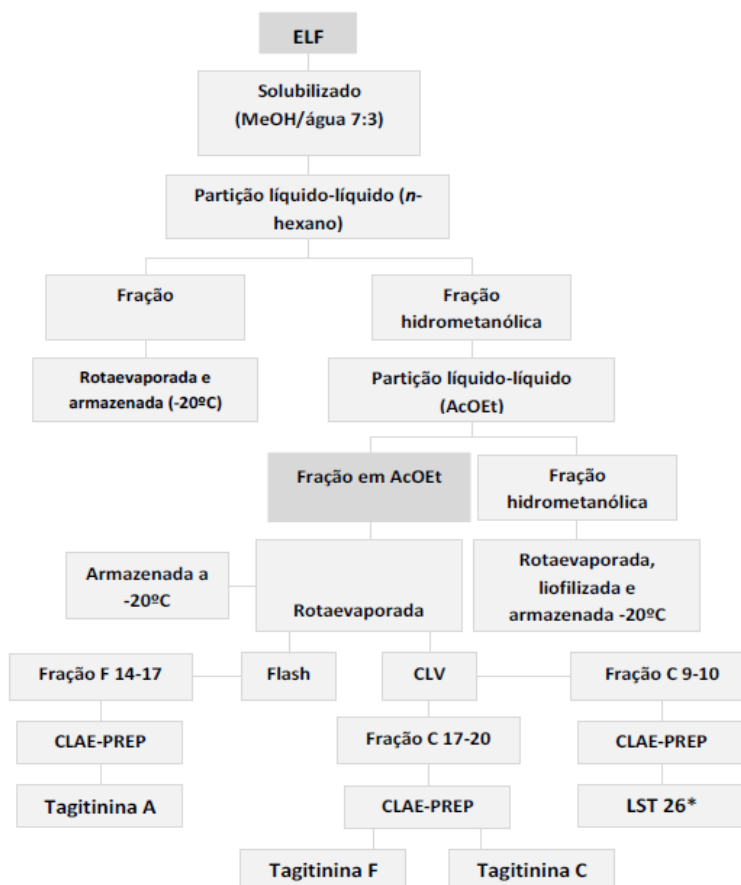


Figura 3 - Esquema de isolamento de lactonas sesquiterpênicas a partir do ELF.

Fonte: Chagas-Paula *et al.* (2012)

\* $3\alpha$ -metóxi-3,10 $\beta$ -epóxi-8 $\beta$ -isobutiroilóxi-4 $\alpha$ -metil-germacra-11(13)-en-6 $\alpha$ ,12-olido.

O extrato de lavagem foliar (ELF; 20 g), solubilizado em quantidade suficiente de MeOH (400 mL), foi submetido a partições líquido-líquido, após adição de 1/3 de H<sub>2</sub>O, com n-hexano e AcOEt, produzindo três frações: hidrometanólica, hexânica e AcOEt. As frações tiveram seus solventes evaporados em rotaevaporador e armazenados em -20 °C. Parte da fração obtida em AcOEt foi submetida aos processos de isolamento subsequentes.

Parte da fração em AcOEt foi submetida a cromatografia líquida a vácuo (CLV), cuja a metodologia foi baseada nos trabalhos de (COLI; BOWDEN, 1986; PELLETIER; CHOKSHI; DESAI, 1986 e STICHER, 2008). Foi utilizada sílica 60 H (Merck) na proporção de 100:1 (500 g de sílica e 5 g da fração) em uma coluna de vidro, com placa sinterizada e 11,5 cm de diâmetro interno, acoplada a uma bomba a vácuo. A altura da camada de sílica atinge 10 cm de altura. Após o sistema estar montado, a amostra foi incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 (Merck) e aplicada homogeneamente sobre a camada de sílica empacotada. Acima da amostra foram ainda colocados mais 2 cm de sílica gel 60 e um papel de filtro. A fase móvel utilizada foi um gradiente n-hexano/AcOEt.

A identificação das lactonas sesquiterpênicas foi realizada por análise de espectros de RMN unidimensionais de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e bidimensionais HMQC e HMBC. Tais espectros foram obtidos em espectrômetro (Laboratório multiusuário de RMN - UNIFAL) com as amostras diluídas em CDC<sup>13</sup> (Aldrich).

## **5.4 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

Abaixo, estão relacionados o material e as metodologias utilizadas para a realização dos ensaios *in vitro*.

### **5.4.1 Avaliação da atividade tripanocida dos compostos naturais, ELF, TA e TC contra as formas epimastigotas**

#### **(i) *Cultivo das formas epimastigotas***

As formas epimastigotas da cepa Y foram obtidas por cultura em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os parasitos foram armazenados em tubos falcon contendo 3 mL de meio LIT e mantidos em estufa BOD, a 28°C. A cada dois dias foi adicionado 3mL do meio LIT em cada tubo falcon contendo a

cultura de parasitos, estas foram submetidas a repiques semanais, obtendo-se deste modo o crescimento exponencial.

(ii) *Construção da curva-padrão de epimastigotas*

A construção da curva-padrão de epimastigotas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Diniz, (2013), com modificações. Após a contagem dos epimastigotas em câmara de Neubauer, a concentração foi ajustada para  $1,5 \times 10^6$  parasitos/mL. Foram feitas sete diluições seriadas (1:2) em duplicata, com volume final de 200  $\mu$ L dessa suspensão em placas de 96 poços. A placa foi incubada em estufa BOD a 28°C por 72 horas. Logo após, em cada poço foram adicionados 20  $\mu$ L de resazurina 1mM (concentração previamente padronizada).

A fim de encontrar o intervalo de tempo em que a leitura de diferentes concentrações fosse linear, a reação foi lida com intervalos de uma hora, até que o corante tivesse totalmente reduzido. As leituras de absorvância foram feitas a 570 nm para detecção da forma reduzida do corante e a 600 nm para detecção da forma oxidada, em leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt.

A fórmula abaixo foi utilizada para calcular a porcentagem de redução do corante de acordo com variação do tempo:

$$\text{Redução da resazurina} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)]$$

Onde,  $A_{570}$  = absorvância a 570 nm;  $A_{600}$  = absorvância a 600 nm;  $R_0$  = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (C), que continha LIT e resazurina na ausência de células [ $R_0 = (A_{570}/A_{600C})$ ]. Para a construção da curva-padrão, plotou-se o número de parasitos versus a porcentagem de redução do corante. Sendo assim, foi definido a quantidade ideal de epimastigotas e o tempo ótimo de incubação a fim de se obter uma reação linear.

*(iii) Avaliação da atividade anti-T.cruzi dos compostos naturais ELF, TA e TC, em monoterapia e em combinação com benznidazol, contra as formas epimastigotas da cepa Y e a definição da IC<sub>50</sub>*

A fim de se avaliar o potencial tripanocida das substâncias naturais (ELF, TA e TC) utilizando o Bz como fármaco de referência, para cada substância testada foram utilizadas oito concentrações decrescentes (diluição 1:2) em triplicata, com a concentração inicial de 150 µg/mL para Bz, 10 µg/mL para a TC e de 16,5 µg/mL para o ELF em monoterapia (ELF, TA e TC) e combinadas (ELF+Bz, TC+Bz). Para a avaliação em combinação, utilizou-se o método de proporções fixas: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 partes de benznidazol, TC ou ELF.

Foi adicionado um volume de 150 µL/poço de cada diluição, em uma placa de poliestireno estéril de 96 poços. Após o cultivo e manutenção das formas epimastigotas, conforme previamente descrito, o parasito foi contado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada em  $1,5 \times 10^6$ /mL. Posteriormente, os parasitos foram adicionados aos poços contendo as diluições seriadas do fármaco e das substâncias naturais. Em cada placa, foram ainda adicionados controles negativos (contendo apenas o meio LIT), controles positivos (contendo o meio LIT e o parasito) e controles contendo o meio e o fármaco na ausência do parasito para avaliar o potencial do composto em reduzir o corante.

As placas foram incubadas por 72 horas em estufa BOD, a 28°C e a seguir, foram adicionados 20 µL de resazurina em todos os poços e a placa foi novamente incubada por 12 horas a 28° C. Após o período de incubação, utilizando o leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt, foi realizada a leitura da reação a 570 nm e 600 nm. A fórmula abaixo foi utilizada para o cálculo da porcentagem de inibição da proliferação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle+}}} \right] \times 100$$

Onde,  $A_{570}$  = absorbância a 570nm;  $A_{600}$  = absorbância a 600nm e  $R_0$  = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (meio+resazurina na ausência de parasitos) [ $R_0 = (A_{570} / A_{600})$ ]. Após o cálculo do percentual de inibição de cada concentração do fármaco e das substâncias testadas, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5 a fim de se calcular a IC<sub>50</sub> (concentração inibitória do fármaco que induz 50% do efeito analisado). Foram realizados dois experimentos independentes.

#### **5.4.2 Avaliação da atividade tripanocida dos compostos naturais, ELF, TA e TC, contra formas amastigotas**

Para avaliação do efeito do tratamento com o extrato e substâncias isoladas sobre as formas amastigotas da cepa Y do *T.cruzi*, células H9c2 foram utilizadas como hospedeiras.

##### **(i) *Cultivo de células H9c2***

Meio DMEM (NaHCO<sub>3</sub>, HEPES e Penicilina/Streptomicina) suplementado com 10% de SFB foi utilizado para o cultivo de células da linhagem H9c2 (American Type Culture Collection, ATCC: CRL 1446), provenientes de cardiomioblastos de ratos neonatos. As células foram armazenadas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo tripsinizadas semanalmente.

##### **(ii) *Obtenção de formas tripomastigotas de cultura celular***

Para obtenção das formas tripomastigotas, camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y tiveram 200 µL de sangue coletados a partir do plexo venoso retro-orbital no dia do pico máximo de parasitemia (7º dia de infecção). O sangue coletado foi utilizado para a infecção de células H9c2 na proporção de 10 parasitos para cada célula. As células foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, após esse período de incubação, removeu-se o meio de cultura e através de lavagens com PBS eliminou-se os parasitos não internalizados e adicionou-se um novo meio. Logo após, as células foram novamente incubadas a 37°C por 72 horas, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3500 rpm por 2 minutos, a fim de se remover os debris celulares.

Feito isso, o sobrenadante, abundante em parasitos, foi centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm, 4°C, e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura e utilizado nos experimentos para a avaliação tripanocida contra as formas amastigotas.

(iii) *Avaliação da atividade anti-T.cruzi do ELF, TA e TC contra as formas amastigotas da cepa Y*

Para a avaliação dos compostos em relação à atividade tripanocida contra as formas amastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, foi utilizado o protocolo descrito por Diniz, (2013), com modificações. Após o cultivo, as células H9c2 foram plaqueadas a  $1 \times 10^4$  células/poço sobre lamínulas de 13 mm previamente dispostas em placas de 24 poços. Incubou-se as placas por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram infectadas pelas formas tripomastigotas da cepa Y na razão de 20:1 parasitos por célula. As placas foram novamente incubadas por 24 horas para que ocorresse a interação célula-parasito. Após esse período, removeu-se o sobrenadante e, a fim de se eliminar os parasitos não internalizados, lavou-se cada poço por três vezes com DMEM 10%. Foram diluídos no meio de cultura (DMEM 10%) diferentes concentrações do Bz e dos compostos naturais (ELF, TA e TC), e em seguida, um volume de 1 mL foi adicionados a cada poço. Foram testadas sete diluições de cada substância com concentração inicial de 200 µg/mL em diluições seriadas de 1:4. Em cada placa, foram adicionadas como controle, células infectadas e não tratadas e células não infectadas que receberam ou não o tratamento.

As placas foram novamente incubadas por um período de 72 horas a 37°C e após o período de incubação, foi realizada a lavagem com meio DMEM 10%, as lamínulas contendo as células foram fixadas com metanol por 5 minutos e posteriormente coradas com Giemsa (10% em água destilada). Utilizou-se Entellan para a montagem das lâminas a partir das lamínulas coradas e, posteriormente, determinou-se o percentual de células infectadas contando-se no mínimo 200 células no aumento de 100x em microscópio óptico. Foram consideradas na avaliação da infecção, apenas parasitos apresentando morfologia característica.

Foram realizados dois experimentos independentes.

#### **5.4.3 Avaliação da citotoxicidade do ELF, TA e TC**

O protocolo descrito por Diniz, (2013) foi utilizado com modificações, a fim de se avaliar a toxicidade das substâncias naturais para células H9c2. Sendo assim, 100 µL/poço de suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^3$  células /mL foi adicionado em duplicata em placas de 96 poços, em seguida, a placa foi incubada por 24 horas, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após



este período, removeu-se o meio substituindo-o por 200 µL/poço de um novo meio contendo sete diferentes concentrações do fármaco Bz e das substâncias ELF, TA e TC (diluição 1:2 iniciando com a concentração de 200 µg/mL). Utilizou-se em cada placa, controles negativos (meio) e controles positivos (meio+células). Após 72 horas de incubação, foram adicionados 20 µL/poço de resazurina e após um período de 12 horas foi realizada a leitura da placa a 570nm e 600nm em um leitor de microplacas (Anthos Zenyth 200rt).

A fórmula abaixo foi utilizada para o cálculo da porcentagem de inibição da proliferação induzida por cada substância testada:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}} / A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle+}}] \times 100$$

Onde,  $A_{570}$ = absorvância a 570nm;  $A_{600}$ = absorvância a 600nm e  $R_0$ = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (C-) (meio+resazurina na ausência de células) [ $R_0 = (A_{570} / A_{600})C^-$ ].

Após o cálculo do percentual de inibição de cada concentração do fármaco e das substâncias testadas, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5 a fim de se calcular a  $CC_{50}$  (concentração das substâncias e do fármaco que reduz 50% da viabilidade celular).

Foram realizados dois experimentos independentes.

## 5.5 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Abaixo, estão relacionados o material e as metodologias utilizadas para a realização dos estudos *in vivo*.

### 5.5.1 Animais

Foram utilizados 79 camundongos *Swiss* fêmeas com cerca de 30 dias de idade e pesando aproximadamente 37g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Durante os estudos experimentais, os animais foram alojados no biotério do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG, tratados com ração comercial. Antes da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, os camundongos receberam tratamento com anti-helmínticos por 21 dias.

Os experimentos foram realizados em concordância com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL-MG (CEUA nº646/2015).

### **5.5.2 Inoculação dos animais**

Os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, coletados no dia de pico máximo de parasitemia (7º dia de infecção) a partir do plexo venoso retro-orbital de camundongo *Swiss* previamente infectado.

### **5.5.3 Confirmação da infecção**

A confirmação da infecção se deu através da coleta e análise diária de sangue na ponta da cauda de cada animal, a partir do 4º dia após a inoculação do parasito. Iniciou-se o tratamento no primeiro dia em que os camundongos apresentaram parasitemia patente, confirmada pelo exame de sangue a fresco.

### **5.5.4 Estratégias de tratamento**

#### **5.5.4.1 Definição das dosagens dos compostos naturais**

A fim de se definir a dosagem dos compostos naturais que seria utilizada no tratamento dos camundongos, foi realizado um experimento prévio para análise do efeito de dose resposta, no qual, animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (n=3) foram tratados por um período de cinco dias através da via oral com uma dose diária de ELF, TC e TA. Foram selecionadas três doses de cada composto natural, 10 mg/Kg, 5 mg/Kg e 1 mg/Kg; a fim de que fossem avaliadas a eficácia de cada dosagem em relação à supressão da parasitemia, índice de mortalidade e o pico máximo de parasitemia após o tratamento.

#### 5.5.4.2 Grupos Experimentais

Para avaliar a eficácia *in vivo* dos compostos naturais na dosagem que se obteve o melhor resultado durante o tratamento no experimento prévio, utilizou-se setenta camundongos Swiss fêmeas, sendo divididos em sete grupos, cada grupo contendo dez animais, conforme mostra a tabela 1. Todos os camundongos, exceto os dos grupos controles positivos e negativos, receberam o tratamento por vinte dias consecutivos, por via oral com o auxílio de uma cânula de metal e de uma seringa, conforme protocolo descrito por Filardi E Brener (1987).

Cada comprimido de Bz contendo 100 mg foi macerado em gral com auxílio de um pistilo e posteriormente ressuspenso em 10 mL de água, utilizando-se carboximetilcelulose como agente suspensivo. Foi administrado um volume de 0,1mL (correspondente a 100 mg/Kg de peso corpóreo) uma vez ao dia a cada camundongo do grupo tratado com o fármaco.

O extrato de lavagem foliar e a tagitinina C foram solubilizados em 5% de cremofor e posteriormente foram feitas 20 alíquotas, sendo armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso. A cada dia de tratamento utilizou-se uma alíquota, onde um volume de 0,1 mL (correspondente a dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal) foi administrado uma vez ao dia a cada animal do grupo. Para os grupos que receberam tratamento em combinação foi administrado a cada animal primeiramente um volume de 0,1mL do composto natural e em seguida 0,1mL do fármaco Bz.

Tabela 1- Grupos experimentais utilizados na avaliação tripanocida do Extrato de Lavagem Foliar e da Tagitinina C, em monoterapia ou em combinação com benznidazol, no tratamento de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*.

| <b>Grupos experimentais</b>  | <b>Nº de animais</b> |
|--|----------------------|
| <b>G1</b> - Não infectados pelo <i>T. cruzi</i> (controle negativo)                      | 10                   |
| <b>G2</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e não tratado (controle positivo)            | 10                   |
| <b>G3</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e tratados com Bz (100 mg/Kg)                | 10                   |
| <b>G4</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e tratados com ELF (10 mg/Kg)                | 10                   |
| <b>G5</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e tratados com ELF + Bz (10 mg/mL+100 mg/Kg) | 10                   |
| <b>G6</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e tratados com TC (10 mg/Kg)                 | 10                   |
| <b>G7</b> - Infectados pelo <i>T. cruzi</i> e tratados com TC + Bz (10 mg/mL+100 mg/Kg)  | 10                   |

Fonte: Do autor

Os grupos de animais tratados e os controles foram utilizados para a determinação da susceptibilidade às substâncias naturais e ao Bz e ainda para avaliação da infectividade, curva de parasitemia, mortalidade, resposta imune e para histopatologia.

### 5.5.5 Avaliação da eficácia terapêutica - controle de cura

Conforme mostra a figura 4, a cura parasitológica foi baseada em três testes independentes: exame de sangue a fresco, teste de hemocultura e sorologia para detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* da classe IgG. Os animais foram considerados curados quando apresentaram resultados negativos nos três testes realizados.

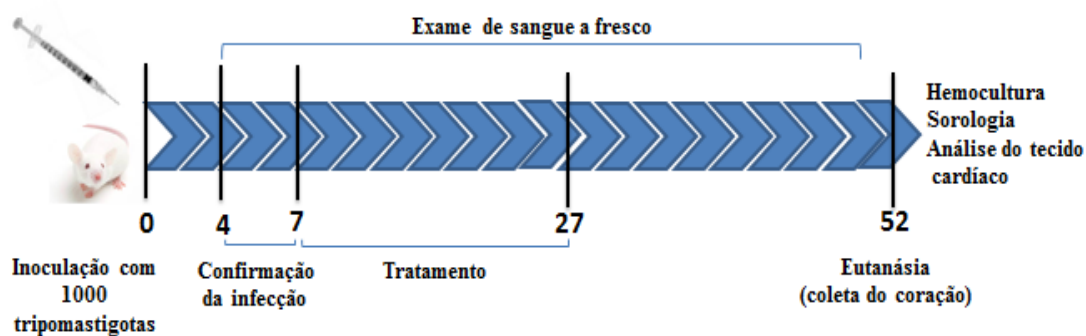


Figura 4 - Linha do tempo na avaliação da eficácia do tratamento.

Fonte: Do autor

Legenda: O exame de sangue a fresco foi iniciado no 4º dia após a inoculação e se estendeu por 25 dias após o término do tratamento. Animais que apresentaram resultados negativos no exame de sangue de sangue a fresco, foram submetidos ao teste de hemocultura, sendo que a análise foi realizada ao 30º, 45º e 60º dia após a data da coleta (dia da necropsia). A sorologia para a dosagem dos anticorpos da classe IgG total e subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b foi realizada 30 dias após o término do tratamento.

#### (i) *Exame de sangue a fresco*

O exame de sangue a fresco foi realizado diariamente a partir do quarto dia após a inoculação e até o vigésimo quinto dia após o término do tratamento para a observação da supressão e reativação natural da parasitemia. Para a avaliação da parasitemia, foram coletados 5µL de sangue da ponta da cauda de cada animal, transferidos para uma lâmina e coberto por uma lamínula 22x22 mm, obtendo-se uma camada única e homogênea de hemácias. Posteriormente, a lâmina foi levada diretamente ao microscópio óptico e contado

50 campos aleatórios na objetiva de 40x, a fim de se fazer a quantificação dos parasitos, segundo a técnica descrita por Brener (1962).

**(ii) Hemocultura**

Para a realização da hemocultura, momentos antes da eutanásia, foi coletado de forma asséptica um volume de 200 µL de sangue no seio venoso retro-orbital dos camundongos e transferidos para tubos tipo Falcon contendo 2 mL de meio LIT. Os tubos foram armazenados em estufa a 28°C e homogeneizados a cada 48 horas. Para a detecção das formas epimastigotas do parasito, uma gota (15µL) da hemocultura foi transferida para uma lâmina com lamínula e examinada diretamente ao microscópio óptico aos 30°, 45° e 60° dias após a data da coleta do sangue.

**(iii) Sorologia - Dosagem de IgG total e subclasses IgG1 e IgG2a e IgG2b**

Para dosagem dos anticorpos da classe IgG total e subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b foram utilizados os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) a técnica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Voller *et al.* (1976), com algumas modificações.

Para isso, momentos antes da eutanásia foram coletados aproximadamente 200µL de sangue no seio venoso retro-orbital de cada camundongo, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. Após coleta do sobrenadante, utilizando-se tubos eppendorf, o soro foi armazenado a -20°C. Utilizou-se antígenos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT e como conjugado utilizou-se anti-imunoglobulinas de camundongo (IgG e subtipos IgG1, IgG2a e IgG2b) marcadas com peroxidase.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Cada poço foi sensibilizado com 100µL de antígeno diluído em solução tampão carbonato de pH 9,6 e em seguida, as placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas por quatro vezes com a solução de lavagem (NaCl 9,0 g + 500 µL de *Tween 20*+ 1,0 L de H<sub>2</sub>O), esta solução foi utilizada em todas as etapas de lavagem. Posteriormente, foram adicionados 100 µL/poço de soro fetal bovino diluído em PBS (1 mL SFB+ 19 mL de PBS), as placas foram incubadas a 7°C por 45 minutos e em seguida lavadas por duas vezes.

Na etapa seguinte, adicionou-se 100 µL/poço do soro de cada animal, diluído na proporção de 1:80 em PBS/Tween 5%, após incubação a 7°C por 45 minutos, as placas foram lavadas por quatro vezes, a fim de se retirar os anticorpos não ligados. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço do conjugado diluído em PBS/Tween 5% na proporção de 1:5000, as placas foram novamente incubadas a 7°C por 45 minutos e em seguida lavadas por quatro vezes. Por fim, foram adicionados 100 µL/poço da solução de substrato (15 mL de solução de ácido cítrico + 1,5 mg de OPD e 3 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vol 30)). A fim de se interromper a reação, após 10 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados 32 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M (5 N).

A leitura foi realizada em leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados dez controles negativos e quatro controles positivos.

Para o cálculo do valor discriminante “cut-off”, foram utilizados os valores médios de absorbância dos dez animais negativos e acrescentados dois desvios-padrão. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentaram leitura da absorbância maior que a absorbância discriminante.

### **5.5.6 Avaliação da toxicidade**

#### **(i) Avaliação da mortalidade e alterações de peso dos camundongos**

Os animais foram monitorados durante o tempo experimental, e por meio de registro diário foi calculado a taxa de ocorrência de mortalidade e alterações físicas ou comportamentais. Todos os camundongos, desde o início do tratamento foram pesados semanalmente, e a alteração de peso foi calculada subtraindo-se o peso inicial (que corresponde ao primeiro dia de tratamento) do peso final (que corresponde ao trigésimo dia após o tratamento).

#### **(ii) Análise de toxicidade hepática**

A toxicidade hepática de cada tratamento, em monoterapia ou combinados ao Bz, foi avaliada através da quantificação dos níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no plasma de cada animal. As análises enzimáticas foram realizadas por meio do analisador automático Labmax Pleno seguindo as orientações do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

### 5.5.7 Sorologia para dosagem das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

Para o procedimento ELISA, foram utilizados kits para a detecção da citocinas anti-inflamatória IL-10 e das pró-inflamatórias IL-17, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . O protocolo ELISA foi realizado de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (PeproTech® Brasil-FUNPEC/Ribeirão Preto, SP).

Para isso, amostras sanguíneas coletadas imediatamente antes da necropsia foram centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C durante 10 minutos, posteriormente, o plasma foi coletado e armazenados em tubos eppendorf a -80°C até o momento do uso.

Foram utilizadas microplacas de poliestireno de alta afinidade contendo 96 poços sensibilizados com 100 $\mu$ L/poço de anticorpo de captura, as placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas *overnight*, em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram aspiradas e lavadas por quatro vezes com 300  $\mu$ L/poço da solução de lavagem (1L PBS 1x + 500  $\mu$ L de *Tween* 20), esta solução foi utilizada em todas as etapas de lavagem. Em seguida, adicionou-se 300  $\mu$ L/poço da solução bloqueio (7g de BSA + 700 mL de PBS 1x) a fim de se evitar ligações inespecíficas e novamente, as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após novamente serem lavadas por quatro vezes, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço da solução padrão, em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Decorridos 2 horas, as placas foram lavadas por quatro vezes e 100  $\mu$ L/poço de anticorpos de detecção foram adicionados, as placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas por quatro vezes e, em seguida adicionou-se 100  $\mu$ L/poço de Avidina-HRP, as placas foram novamente incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, após lavagem das placas, adicionou-se 100  $\mu$ L/poço do substrato líquido ABTS e novamente as placas foram incubadas na ausência de luz, até que desenvolvesse coloração (cerca de 30 minutos), posteriormente, a reação foi bloqueada com a adição de 50  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

Por fim, foi feita a leitura da intensidade de coloração em leitor de ELISA (Anthos Zenyth 200rt) utilizando-se o comprimento de onda de 405nm e a correção de comprimento de onda a 650nm.

### 5.5.8 Necropsia e coleta dos órgãos

Aos cinquenta e dois dias de infecção os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical, posteriormente, foi realizada uma incisão ventral para remoção do coração de cada camundongo. O órgão foi lavado em PBS e após pesagem, seccionado longitudinalmente, sendo que a porção direita foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C, enquanto a porção esquerda foi armazenada em solução tamponada de formol 10% (formol P.A. 100 mL, fosfato monossódico monohidratado 4 g, fosfato dissódico anidro 6,5 g, água destilada 900 mL) por no mínimo 48 horas, e posteriormente utilizada para análises histológicas.

### 5.5.9 Histopatologia

Para avaliação histopatológica, foi utilizada a técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. Cada porção esquerda do coração foi desidratada ficando imersa por uma hora no álcool em concentração crescente, 70°, 80°, 90°, 95°, e absoluto I, absoluto II e absoluto III.

Posteriormente, foram utilizados dois banhos de xilol onde os órgãos ficaram imersos por uma hora em cada banho, a fim de que se ocorresse a diafanização. Por fim, os órgãos foram imersos em três banhos de parafina, permanecendo em estufa à 56°C por uma hora no banho um, *overnight* no banho dois, e em seguida, através da parafina III foram confeccionados os blocos. Os blocos foram moldados e levados ao micrótomo para cortes seriados de 6µm.

#### 5.5.9.1 Técnica de Hematoxilina & Eosina

Para quantificação do infiltrado inflamatório, os cortes seriados dos fragmentos cardíacos foram fixados em lâminas e, em seguida foram desparafinizados em dois banhos de xilol, com duração de 5 minutos cada banho. Posteriormente foram hidratados por 1 minuto em seis banhos de álcool em concentração decrescente, absoluto I, Absoluto II, Absoluto III, 95°, 90°, e 70°, e em seguida, lavados em água corrente por 5 minutos.

Feito isso, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina por 1 minuto, em seguida foram lavadas por 5 minutos em água corrente e coradas pela Eosina por 2 minutos.



Após rápida passagem pela água, as lâminas foram desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, por 2 minutos, e posteriormente, foram imersas em dois banhos de xilol por 2 minutos cada banho.

Por fim, as lâminas foram confeccionadas com auxílio de Entellan e os núcleos celulares quantificados a partir de 10 imagens aleatórias, representativas de todas as regiões do miocárdio.

As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x, e digitalizadas através de microcâmera AxionCam IC3 Zeiss, acoplada ao programa Axio Vision. Para a quantificação da miocardite, foi realizada em cada imagem a contagem dos núcleos inflamatórios com auxílio do software Image J.

### **Análises estatísticas**

#### *- Experimentos in vitro*

O percentual de inibição e curvas de dose-efeito foram construídas no programa Excel e o cálculo de  $IC_{50}$  foi realizado com o auxílio dos software *CompuSyn* e *Graph Pad Prism 5*.

A fim de se classificar a natureza da interação entre Bz e os compostos naturais foram utilizadas a fração de concentração inibitória (FIC) e análise do isoblograma.

Para cálculo das FICs utilizou-se:

$$FIC = IC_{50} \text{ composto na combinação} / IC_{50} \text{ composto em monoterapia}$$

$$\sum FICs = FIC_{\text{fármaco}} + FIC_{\text{da substância natural}}$$

$$\text{Média } \sum FICs = \frac{\text{Soma do } \sum FICs}{4}$$

A média do  $\sum FICs$  foi utilizada para a classificação da interação, de modo que, se  $\leq 0,5$  indica sinergismo;  $0,5 < FIC \leq 4$ , aditividade e se  $> 4$  indica antagonismo (DINIZ, 2013). Para construção dos isobogramas, plotou-se a FIC da  $IC_{50}$  do Bz versus as substâncias naturais.

- *Experimentos in vivo*

Os resultados dos testes *in vivo* referentes aos níveis de parasitemia, parâmetros imunológicos e quantificação do infiltrado inflamatório, foram analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. Foi fixado em 95% ( $p < 0,05$ ) o nível de confiança dos testes.

## 6 RESULTADOS

Abaixo, são apresentados os resultados obtidos durante este estudo.

### 6.1 Avaliação *in vivo* da atividade do ELF, TA e TC sobre as formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (IC<sub>50</sub>) e sobre células H9c2 (CC<sub>50</sub> e índice de seletividade)

Inicialmente foi avaliada a eficácia do ELF e das LSTs isoladas TA e TC em relação à capacidade tripanocida *in vitro* contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*, o índice de seletividade e a citotoxicidade dos compostos naturais. Conforme é demonstrado na tabela 2, a TA apresentou menor atividade nos três parâmetros analisados, sendo a sua IC<sub>50</sub> de 36,52 µg/mL, a citotoxicidade de 0,26 µg/mL e o índice de seletividade de 0,007.

Tabela 2. Valores da concentração inibitória de 50 % (IC<sub>50</sub>), Concentração citotóxica de 50 % (CC<sub>50</sub>) e índice de seletividade, obtidos através dos ensaios *in vitro* da atividade tripanocida do extrato de lavagem foliar e das Tagitinininas A e C contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*

|            | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | IC <sub>50</sub> (µM) | CC <sub>50</sub> (µg/mL) | Índice de seletividade |
|------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Bz</b>  | 9,32 ± 1,81              | 35,81 ± 6,95          | 185,7 ± 102              | 19,92                  |
| <b>ELF</b> | 0,6428 ± 0,107           | -                     | 1,69 ± 1,47              | 2,64                   |
| <b>TA</b>  | 36,52 ± 30,79            | 99,12 ± 83,56         | 0,26 ± 0,32              | 0,007                  |
| <b>TC</b>  | 0,4022 ± 0,07            | 1,15 ± 0,20           | 2,29 ± 0,39              | 5,69                   |

Fonte: Do autor

Em relação ao ELF e a TC, observou-se que estas substâncias apresentaram maior capacidade de inibição sendo os valores de IC<sub>50</sub> iguais a 0,6426 µg/mL e 0,4022 µg/mL respectivamente, tais atividades foram superiores à apresentada pelo fármaco de referência, 9,32 µg/mL. Embora o índice de seletividade e a concentração citotóxica do ELF e da TC não

tenham sido superiores aos do Bz, a partir dos resultados foi possível verificar que estas duas substâncias naturais são mais ativas que a TA.

Na figura 5 estão representadas as curvas de dose-resposta construídas a partir do cálculo de percentagem de inibição da proliferação do fármaco Bz e das substâncias naturais ELF, TA e TC, em monoterapia, sobre as formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

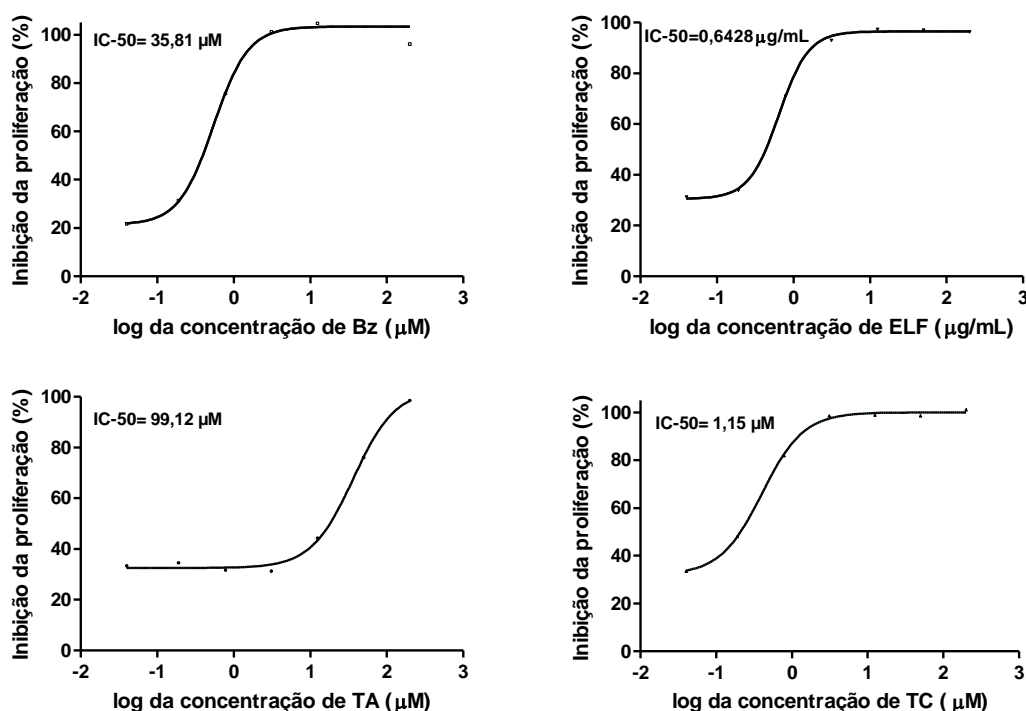


Figura 5 - Atividade do benznidazol (Bz) e das substâncias naturais (ELF, TC e TA) sobre epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*: curvas dose-resposta.

Fonte: Do autor

Legenda:  $1 \times 10^6$  formas epimastigotas das cepas Y foram incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes de benznidazol e ELF, TA ou TC, por 72 horas. A atividade tripanocida foi medida pelo teste de redução da resazurina. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes. O cálculo de  $IC_{50}$  foi realizado utilizando-se o software CalcuSyn.

Uma vez que foi observado que o ELF e a TC apresentaram os melhores resultados nos três parâmetros inicialmente analisados, a próxima etapa foi verificar a atividade das duas substâncias naturais combinadas ao Bz, contra as formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

A figura 6 demonstra as curvas de dose-resposta produzidas a partir da percentagem de inibição da proliferação de epimastigotas induzidas pelas combinações das substâncias naturais com o Bz. Na figura 6A estão representadas as curvas de dose-resposta considerando a concentração de Bz em cada uma das misturas ou em monoterapia, em 6B estão representadas as curvas de dose-resposta para TC e em 6C as curvas para ELF.

De modo geral, através das curvas é possível perceber que é menor a percentagem de inibição do fármaco e das substâncias quando utilizados em monoterapia. Verifica-se que o percentual de inibição de proliferação é maior à medida que se aumenta a concentração das combinações, efeito observado, sobretudo nas curvas de TC e ELF.

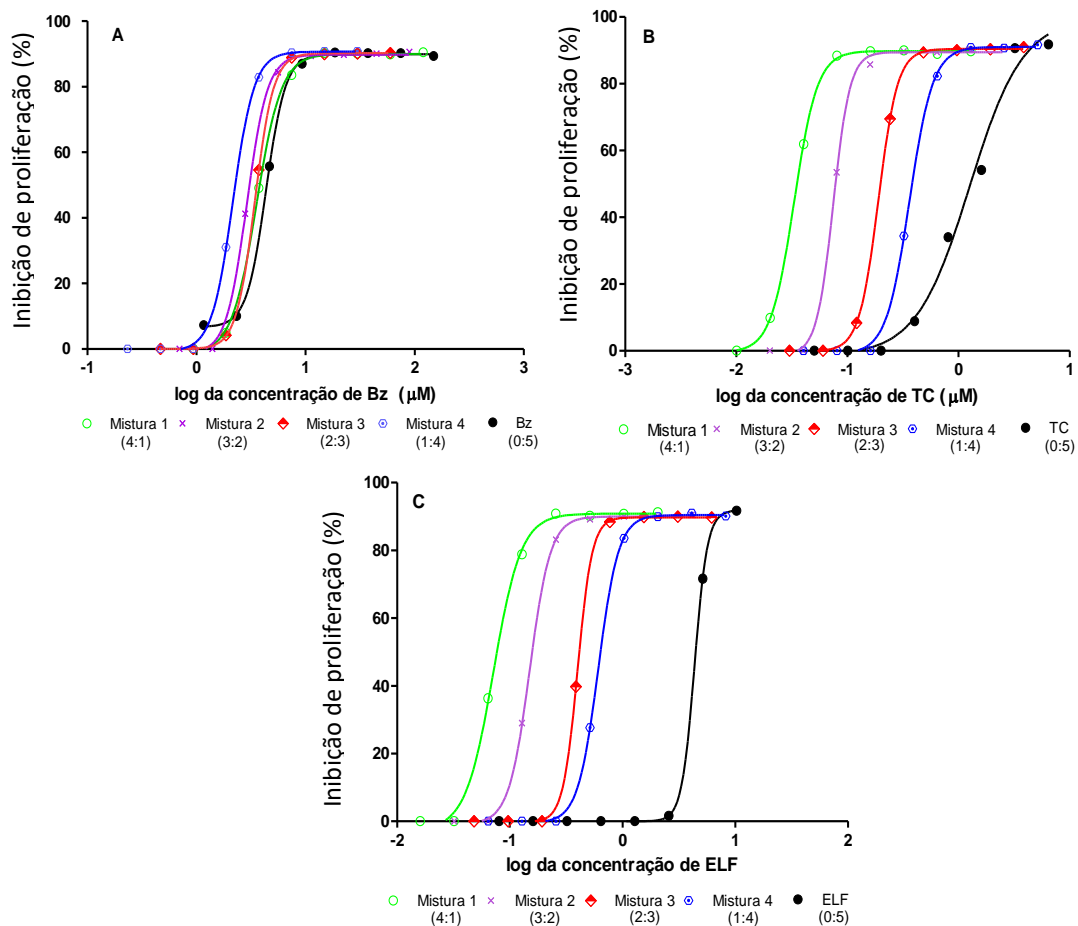


Figura 6 - Efeitos antiproliferativos das combinações entre benznidazol e TC ou ELF sobre formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*: curvas dose-resposta.

Fonte: Do autor

Legenda:  $1 \times 10^6$  formas epimastigotas da cepa Y foram incubadas na presença ou ausência de concentrações decrescentes do benznidazol (A), TC (B) ou ELF (C) em diferentes combinações, por 72 horas. As combinações foram preparadas a partir do método de proporções fixas: 5:0; 4:1; 3:2; 2:3; 1:4 e 0:5 partes de benznidazol, TC ou ELF. Cada ponto das curvas de dose-resposta corresponde à média de 2 experimentos independentes.

Uma vez que as análises dos resultados à respeito do percentual de inibição de proliferação sugeriram um efeito aditivo nas combinações entre o fármaco e as substâncias naturais, utilizou-se o método de FICs a fim de se comprovar tais observações. As tabelas 3 e 4 resumem a classificação da natureza da interação das combinações Bz+TC e Bz+ELF,

respectivamente. A análise foi realizada considerando a IC<sub>50</sub> do fármaco Bz e de cada substância natural, isoladamente e a sua respectiva proporção na combinação e posteriormente foi utilizado o somatório das FICs.

Tabela 3 - Efeitos antiproliferativos do benznidazol e da TC em combinação sobre epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*: FICs da IC<sub>50</sub>.

| Fármaco/TC e misturas | Média das FICs (IC <sub>50</sub> ) ± DP |             | FIC Bz+FIC TC |
|-----------------------|---|-------------|---------------|
|                       | FIC Bz                                  | FIC TC      | ∑ FICs        |
| <b>Bz monoterapia</b> | 1                                       | 0           | 1             |
| <b>Bz+TC (4+1)</b>    | 1,42 ± 0,69                             | 0,04 ± 0,04 | 1,46          |
| <b>Bz+TC (3+2)</b>    | 1,28 ± 0,06                             | 0,09 ± 0,06 | 1,37          |
| <b>Bz+TC (2+3)</b>    | 1,52 ± 0,19                             | 0,24 ± 0,19 | 1,76          |
| <b>Bz+TC (1+4)</b>    | 1,03 ± 0,08                             | 0,43 ± 0,28 | 1,46          |
| <b>TC monoterapia</b> | 0                                       | 1           | 1             |
| <b>Média</b>          | 1,31 ± 0,25                             | 0,2 ± 0,14  | 1,51          |

Valores correspondentes a 2 experimentos independentes. Fonte: Do autor

Após a realização do método de FICs (tabelas 3 e 4), foi possível confirmar o perfil de efeito aditivo observado nas análises das curvas de dose-resposta, onde verificou-se que nas duas combinações (Bz+TC e Bz+ELF) a média dos valores do somatório das FICs foram superiores a 0,5 e inferiores a 4,0.

Tabela 4 - Efeitos antiproliferativos do benznidazol e do ELF em combinação sobre epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*: FICs da IC<sub>50</sub>.

| Fármaco/ELF e misturas | Média das FICs (IC <sub>50</sub> ) ± DP |              | FIC Bz+FIC ELF |
|------------------------|---|--------------|----------------|
|                        | FIC Bz                                  | FIC ELF      | ∑ FICs         |
| <b>Bz monoterapia</b>  | 1                                       | 0            | 1              |
| <b>Bz+ELF (4+1)</b>    | 1,88 ± 0,58                             | 0,023 ± 0,02 | 1,90           |
| <b>Bz+ELF (3+2)</b>    | 1,54 ± 0,32                             | 0,05 ± 0,04  | 1,59           |
| <b>Bz+ELF (2+3)</b>    | 1,60 ± 0,28                             | 0,11 ± 0,10  | 1,71           |
| <b>Bz+ELF (1+4)</b>    | 1,10 ± 0,11                             | 0,18 ± 0,23  | 1,28           |
| <b>ELF monoterapia</b> | 0                                       | 1            | 1              |
| <b>Média</b>           | 1,53 ± 0,32                             | 0,09 ± 0,09  | 1,62           |

Valores correspondentes a 2 experimentos independentes. Fonte: Do autor

A figura 7 é um isoblograma produzido à partir dos valores de IC<sub>50</sub> de FIC, e é uma representação gráfica da interação entre o Bz e as substâncias naturais TC (A) e ELF (B). É possível mais uma vez comprovar a natureza da interação das combinações, sendo visualizado o efeito aditivo, uma vez que as interações ficaram muito próximas da linha de aditividade.

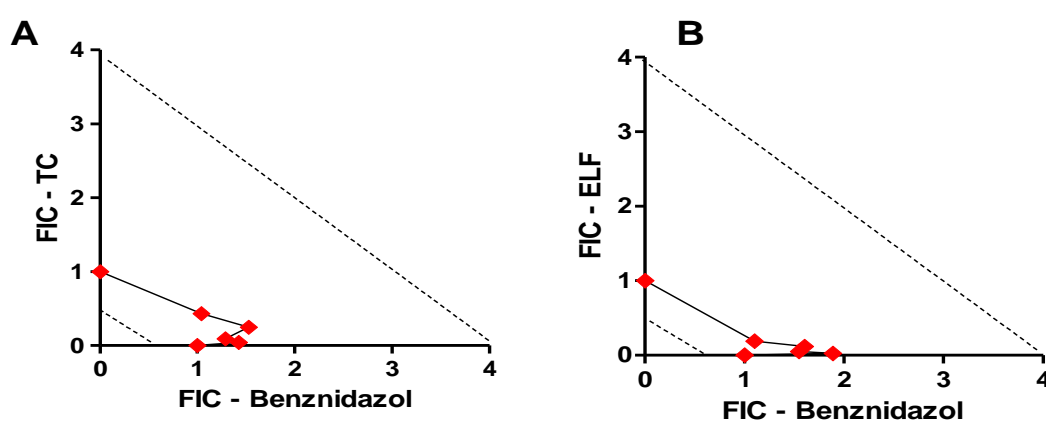


Figura 7 - Isoblograma representativo da interação *in vitro* entre benznidazol e TC ou ELF sobre as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: Os números na abcissa representam os FICs da IC<sub>50</sub> da TC (A) e do ELF(B) e os na ordenada, do benznidazol. Os pontos em vermelho correspondem às IC<sub>50</sub> do fármaco ou de cada LSTs em monoterapia ou combinação de proporção fixa em série diluída. As linhas pontilhadas correspondem às posições previstas dos pontos experimentais para um efeito aditivo. Os dados representam a média de 2 experimentos independentes.

## 6.2 Avaliação da atividade tripanocida do ELF e das LSTs isoladas TA e TC contra as formas amastigotas da cepa Y do *T. cruzi*

A avaliação da atividade tripanocida *in vitro* do ELF e das LSTs isoladas TA e TC contra as formas amastigotas foi realizado a partir do ensaio de infecção de células H9c2 e o parâmetro utilizado no cálculo foi o percentual de células infectadas em relação ao controle infectado e não tratado e em relação ao fármaco de referência, o benznidazol.

Após a infecção das células pela cepa Y do *T. cruzi* e incubação por 72 horas com as diferentes concentrações do fármaco e dos compostos naturais testados, foi possível observar a eficácia de cada composto em relação à redução do número de células parasitadas.

De acordo com a figura 8, a TC apresentou uma potente atividade anti-*T. cruzi*, sendo capaz de reduzir em 51% o número de células infectadas. Observou-se que a TC apresentou menores índices de células parasitadas com amastigotas tanto em relação ao controle infectado e não tratado quanto ao percentual apresentado pelo Bz, que foram de 78% e 64%, respectivamente.

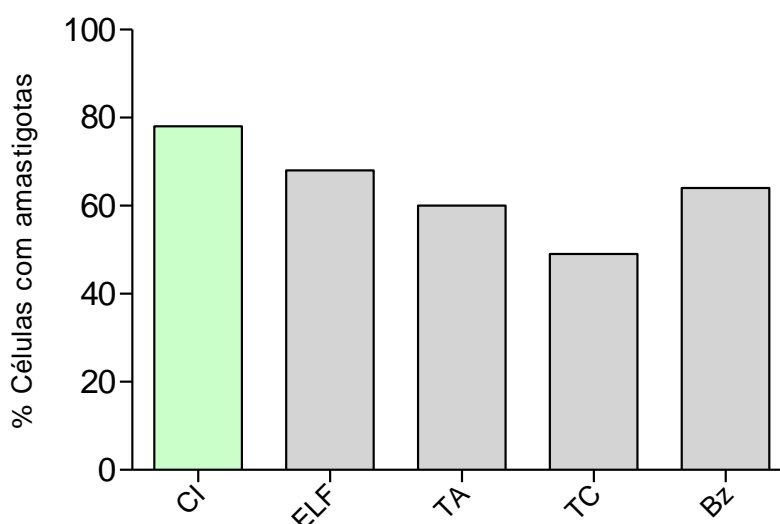


Figura 8 - Atividade das substâncias naturais e do benznidazol sobre a infecção de células H9c2 pela cepa Y de *T. cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: Células H9c2 foram infectadas pela cepa Y do *T. cruzi* e posteriormente incubadas na concentração de 0,6 µg/mL do extrato de lavagem foliar (ELF), tagitinina A (TA), tagitinina C (TC) e do benznidazol (Bz). CI, controle infectado e não tratado.



Foi observada também, uma significativa redução no percentual de células parasitadas após tratamento com a TA, onde 60% das células encontravam-se parasitadas, sendo este valor menor que o índice apresentado pelo fármaco de referência, o Bz. Já em relação ao ELF, esta foi a substância que apresentou menor atividade em relação à redução do número de células infectadas. Porém, apesar de 68% das células tratadas com o ELF terem se apresentado infectadas, este resultado ainda pode ser considerado significativo quando comparado ao controle infectado e não tratado, de 78%.

## 6.2 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

Abaixo, são apresentados os resultados relacionados às análises *in vivo*.

### 6.2.1 Avaliação *in vivo* da atividade tripanocida do ELF e das LSTs isoladas TA e TC.

Uma vez que os resultados dos testes *in vitro* foram satisfatórios em relação à atividade tripanocida do ELF, TA e TC, o próximo passo foi avaliar a capacidade de supressão de parasitemia em testes *in vivo*, e definir a dose ideal para o tratamento dos camundongos infectados.

Os resultados da parasitemia diária realizada através do exame de sangue a fresco nos grupos de camundongos tratados com as diferentes dosagens dos compostos estão representados nas figuras 9, 10 e 11. Em geral, é possível verificar que houve supressão da parasitemia no primeiro dia de tratamento com as três doses utilizadas dos diferentes compostos naturais, porém, sendo observada a partir do sexto dia de tratamento, reativação da parasitemia. No grupo tratado com 5 mg/Kg de TA, a reativação da parasitemia foi proporcionalmente maior inclusive, superando o número de parasitos encontrados no grupo controle positivo (figura 9).

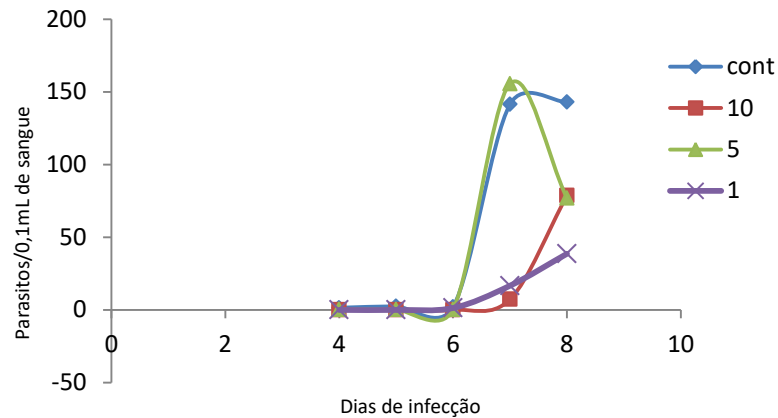


Figura 9 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do *T. cruzi* e tratados com a Lactona Sesquiterpênica isolada TA.

Fonte: Do autor

Legenda: Os animais foram tratados por cinco dias consecutivos, através da via oral com três diferentes dosagens de TA. Em vermelho está representado o grupo de camundongos tratados com 10 mg/Kg, grupo de camundongos tratados com 5 mg/Kg em verde e grupo de camundongos tratados com 1 mg/Kg em roxo. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais infectados e que não receberam tratamento (em azul).

Na figura 10 estão representados os resultados do grupo de animais tratados com ELF sendo possível observar que, embora todas as três dosagens tenham sido efetivas em reduzir a parasitemia sanguínea, os animais tratados com 10 mg/Kg de ELF apresentaram menor número de parasitos circulantes na corrente sanguínea.

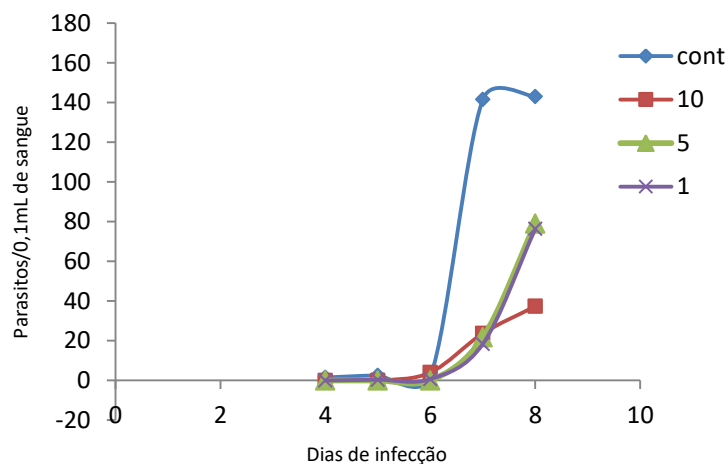


Figura 10 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do *T. cruzi* e tratados com o ELF.

Fonte: Do autor

Legenda: Os animais foram tratados por cinco dias consecutivos, através da via oral com três diferentes dosagens de ELF. Em vermelho está representado o grupo de camundongos tratados com 10 mg/Kg, grupo de camundongos tratados com 5 mg/Kg em verde e grupo de camundongos tratados com 1 mg/Kg em roxo. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais infectados e que não receberam tratamento (em azul).

Um perfil semelhante foi observado nos resultados dos grupos tratados com 5 mg/Kg e 1 mg/Kg de TC, havendo supressão e subsequente reativação da parasitemia (figura 11). Já a maior dosagem (10 mg/Kg) de TC foi capaz de suprimir totalmente a parasitemia.

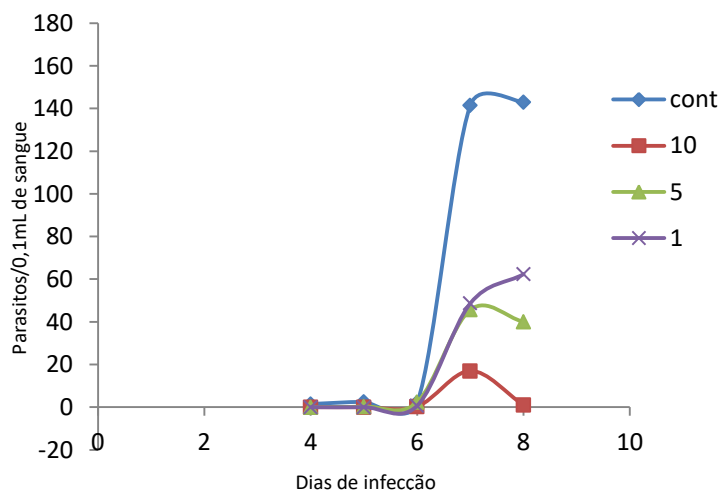


Figura 11 - Parasitemia diária dos grupos de camundongos infectados por cepa Y do *T.cruzi* e tratados com a Lactona Sesquiterpênica isolada TC.

Fonte: Do autor

Legenda: Os animais foram tratados por cinco dias consecutivos, através da via oral com três diferentes dosagens de ELF. Em vermelho está representado o grupo de camundongos tratados com 10 mg/Kg, grupo de camundongos tratados com 5 mg/Kg em verde e grupo de camundongos tratados com 1 mg/Kg em roxo. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais infectados e que não receberam tratamento (em azul).

Considerando os resultados obtidos nos experimentos preliminares *in vitro* e *in vivo* em relação à atividade anti-*T.cruzi* do ELF e da TC, que foram mais promissoras que a TA, ficou estabelecido que a próxima etapa deste estudo seria avaliar o benefício que a dosagem de 10 mg/Kg de ELF e TC trariam aos animais durante um esquema de tratamento de 20 dias, em monoterapia e também em combinação com o Bz.

### 6.2.2 Curvas de parasitemia dos animais tratados com o ELF e com a LST isolada TC, em monoterapia e combinadas ao Bz

A figura 12 mostra o resultado da parasitemia diária realizada através do exame de sangue a fresco a partir do quarto dia após a inoculação e até o vigésimo quinto dia após o término do tratamento para a observação da supressão ou reativação natural da parasitemia. O período pré-patente foi de seis dias em todos os grupos, e o período patente mais longo e com

maior parasitemia foi observado no grupo de animais tratados com ELF em monoterapia, permanecendo por treze dias. Os menores períodos patentes foram de dois dias, sendo observados entre os grupos de animais tratados em combinação (ELF+Bz e TC+Bz) e os tratados com Bz em monoterapia.

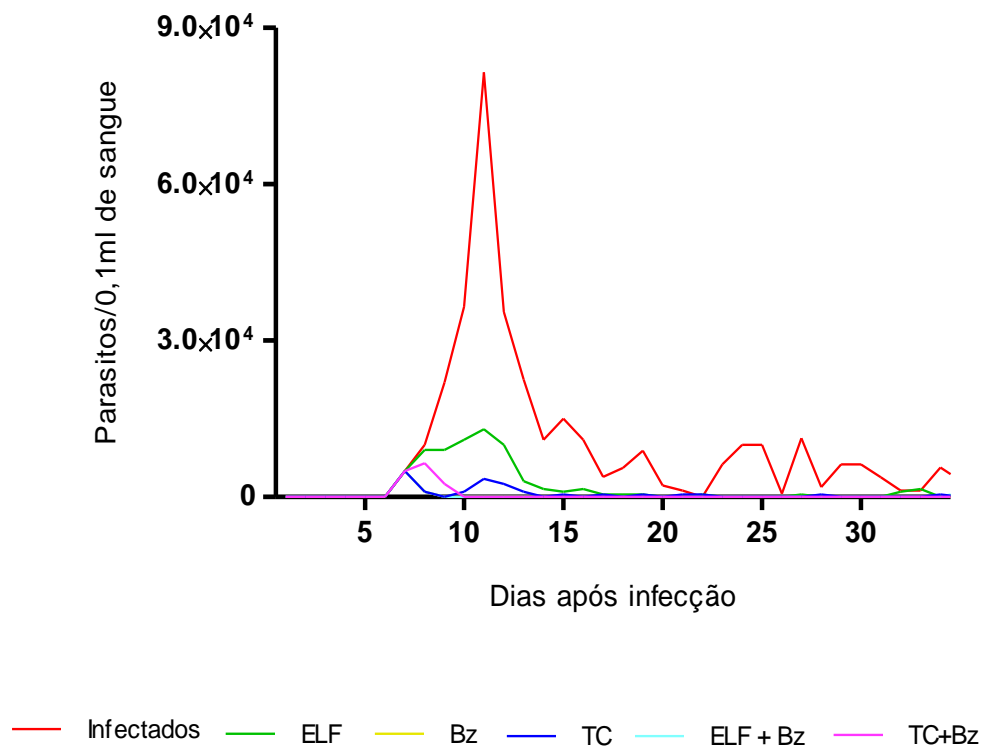


Figura 12 - Avaliação da parasitemia diária realizada em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y e posteriormente, receberam diferentes tratamentos por via oral, por 20 dias, iniciando-se a partir do diariamente, a partir do quarto dia de inoculação e até o vigésimo quinto dia após o término do tratamento. Como controle positivo, foram utilizados camundongos infectados e que não receberam nenhum tipo de tratamento.

Verificou-se que todos os tratamentos, foram efetivos em suprimir a parasitemia a partir do quarto dia de tratamento, com exceção do ELF em monoterapia, que foi capaz de reduzir o número dos parasitos somente ao oitavo dia de tratamento (tabela 5), já os animais tratados com TC em monoterapia tiveram a supressão da parasitemia por volta do terceiro dia de tratamento.

Através do exame de sangue a fresco ainda foi verificada a eficácia entre a associação TC+Bz, que foi mais efetiva em induzir a total supressão da parasitemia em 100% dos camundongos a partir do segundo dia do tratamento, não sendo observada a reativação natural

dos parasitos durante o período de realização de exame de sangue a fresco. Embora, também tenha sido verificado que no grupo tratado com Bz, 100% dos animais tiveram a total supressão da parasitemia durante o período em que se realizou a avaliação da parasitemia diária.

Durante o pico máximo de parasitemia, que se deu no décimo primeiro dia após a infecção, não foram observados parasitos entre os animais tratados com Bz, de igual modo, durante este período não houve a presença de parasitos na corrente sanguínea dos animais tratados com as combinações ELF+Bz e TC+Bz, dados representados na tabela 5.

Tabela 5. Área sob a curva, pico máximo de parasitemia (tripomastigotas/0,1mL de sangue) e a média de doses dos fármacos necessárias para supressão da parasitemia.

|                   | <b>Área sob a curva</b> | <b>Pico máximo de parasitemia</b> | <b>Doses para a supressão da parasitemia (média)</b> |
|-------------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| <b>Infectados</b> | 341.806                 | 81.500                            | ...  |
| <b>Bz</b>         | 6.000                   | 0                                 | 1,2/20*  |
| <b>ELF</b>        | 69.500                  | 13.500                            | 7,9/20*  |
| <b>ELF+Bz</b>     | 7.000                   | 0                                 | 1,2/20*  |
| <b>TC</b>         | 18.500                  | 3.500                             | 2,6/20*  |
| <b>TC+Bz</b>      | 14.000                  | 0                                 | 1,9/20*  |

Fonte: Do autor

Nota: Foi considerado como supressão da parasitemia, um período mínimo de 05 dias de não observação de parasitos na corrente sanguínea. \* 20: representa o total de doses durante o tratamento.

Em relação aos tratamentos em monoterapia com as LSTs, foi verificado pico máximo de parasitemia com cerca de 13.500 e 3.500 tripomastigotas sanguíneos/0,1 mL de sangue no grupo de animais tratados com ELF e TC, respectivamente. Animais do grupo controle positivo, durante o pico máximo de parasitemia, apresentaram em torno de 81.500 tripomastigotas sanguíneos/0,1 mL de sangue.

### **6.2.3 Avaliação da eficácia do ELF e da LST isolada TC em induzir a cura parasitológica em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi***

Para avaliar a eficácia de cada composto natural, testados em monoterapia ou em combinação com o Bz, em induzir a cura parasitológica em camundongos experimentalmente

infectados pela cepa Y, foram utilizados como controle de cura três testes independentes: exame de sangue a fresco, teste de hemocultura e sorologia para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. Foram considerados curados, os animais que apresentaram resultado negativo em todos os três testes (tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros utilizados no controle de cura de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

| <b>Controle de cura</b>   | <b>BZ</b><br>(100mg/Kg)<br>n=10 | <b>ELF</b><br>(10mg/Kg)<br>n=10 | <b>ELF+BZ</b><br>(10mg/Kg+<br>100mg/Kg)<br>n=10 | <b>TC</b><br>(10mg/Kg)<br>n=10 | <b>TC+Bz</b><br>(10mg/Kg+<br>100mg/Kg)<br>n=10 | <b>Controle<br/>Positivo</b><br>n=10 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|--|--------------------------------------|
| <b>Reativação da parasitemia após o tratamento (Exame de sangue a fresco)</b> | 0/10                            | 6/10                            | 2/10  | 5/10                           | 0/10   | ---                                  |
| <b>Hemocultura Positiva</b>   | 3/10                            | 4/4                             | 1/8   | 5/5                            | 0/10   | 10/10                                |
| <b>Dosagem de anticorpos da classe IgG (+)</b>                                | 3/10                            | 10/10                           | 1/10  | 10/10                          | 0/10   | 8/8                                  |
| <b>Total de camundongos Curados</b>   | 7/10<br>(70%)                   | 0/10<br>(0%)                    | 7/10<br>(70%)                                   | 0/10<br>(0%)                   | 10/10<br>(100%)                                | 0/8<br>(0%)                          |

Fonte: Do autor

Legenda: Os animais foram tratados através de via oral, por vinte dias consecutivos, com um dos seguintes esquemas terapêuticos descritos na tabela. Os tratamentos foram iniciados a partir do primeiro dia após a confirmação da infecção. O exame de sangue a fresco foi realizado a partir do dia da inoculação e se estendeu até 25 dias após o término do tratamento. Foi realizada a leitura da hemocultura ao 30°, 45° e 60° dias após a data da coleta do sangue.

Observa-se que nos grupos tratados com a combinação ELF+Bz, e os tratados em monoterapia com o ELF e com a TC, verificou-se a reativação espontânea da infecção durante a realização do exame de sangue a fresco, sendo que, 2, 6 e 5 animais de cada grupo, respectivamente, foram considerados não curados de acordo com os resultados deste primeiro teste. Os demais animais, por não terem apresentado positividade no exame de sangue a fresco, foram submetidos ao teste de hemocultura. Durante a avaliação da parasitemia diária, também foi verificado a ausência da reativação natural em todos os animais tratados com o fármaco Bz e de igual modo, o tratamento combinado de TC+Bz, foi eficaz em inibir a reativação da parasitemia em 100% dos animais; sendo assim, seguindo o critério de cura, todos os animais destes dois grupos foram submetidos à próxima etapa, ou seja, a hemocultura.

Nos testes de hemocultura, o sangue coletado em cada animal, no dia da necropsia, foi examinado aos 30, 45 e 60 dias após a data da coleta para a detecção de epimastigotas que se multiplicam no meio de cultura. O teste de hemocultura evidenciou a ineficácia quanto à indução à cura dos dois compostos naturais quando utilizados em monoterapia, uma vez que 100% dos camundongos apresentaram positividade durante este teste.

Dentre os animais tratados com o fármaco de referência Bz e submetidos à hemocultura, 30% (3/10) dos animais apresentaram resultado positivo. De forma semelhante, a combinação ELF+Bz foi eficiente em inibir a reativação natural dos parasitos em 70% dos animais, uma vez que deste grupo, apenas três animais apresentaram positividade durante a hemocultura. Entretanto, a associação entre TC e Bz apresentou o melhor resultado dentre as estratégias terapêuticas, não sendo observada positividade dentre os 10 animais submetidos à hemocultura.

Ao 25º dia após o término do tratamento, realizou-se a coleta do plasma de cada camundongo para posterior avaliação dos níveis de anticorpos da classe IgG. A dosagem dos anticorpos foi realizada em todos os animais, infectados ou não, e submetidos aos diferentes tratamentos. Os resultados da sorologia, demonstrados ainda na tabela 6, confirmaram os resultados dos dois testes do controle de cura realizados anteriormente, onde 100% dos animais tratados com as LSTs (ELF e TC) em monoterapia apresentaram positividade em relação à produção de anticorpos IgG, sendo assim, foi considerado que nenhum animal obteve a cura parasitológica a partir deste tratamento. Já o grupo de animais tratados com o Bz, conforme esperado, apresentaram 30% de positividade, ou seja, 07 animais foram curados de acordo com os três testes do critério de cura.

A combinação TC+Bz, apresentou resultados mais satisfatórios que os resultados apresentados pelo fármaco de referência, onde os resultados da sorologia mostraram que os 10 animais deste grupo apresentaram negatividade em relação à produção de anticorpos da classe IgG. Tais resultados evidenciam o benefício do tratamento em combinação, visto que, teve a capacidade de induzir a 100% de cura parasitológica nos animais, estes valores foram superiores aos valores apresentados pelo Bz.

#### 6.2.4 Efeito do tratamento com o ELF e com a TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração do peso corporal de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do *T.cruzi*.

Durante todo o período de experimento não foram detectadas mudanças comportamentais e/ou físicas nos grupos experimentais tratados com os diversos esquemas terapêuticos. Além disso, os animais foram submetidos à pesagem semanal para avaliação do impacto dos diversos tratamentos em relação à alteração no peso. Estes resultados estão representados na figura 13, onde é possível perceber que os tratamentos não induziram à queda significativa nos pesos dos animais, uma vez que quando comparados aos animais infectados e não tratados, observa-se um perfil semelhante. Verifica-se uma leve redução no peso corpóreo em todos os grupos infectados (tratados ou não) a partir da segunda semana de experimento, e após o término do tratamento observa-se o ganho de peso corpóreo. Este perfil observado sugere que a alteração de peso corporal seja proveniente à infecção pelo *T. cruzi* e não devido ao tratamento.

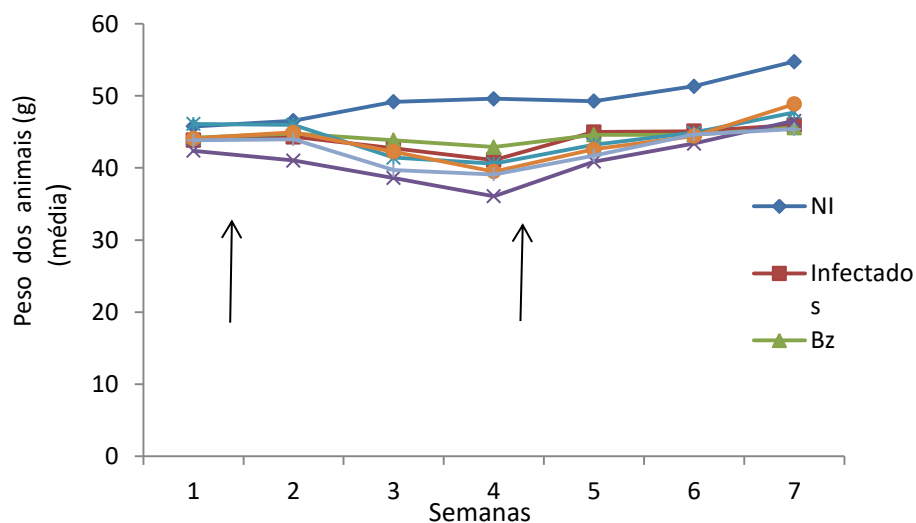


Figura 13 - Efeito do tratamento com ELF e TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração do peso corporal de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do *T.cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol. Os animais foram pesados semanalmente a partir do dia da inoculação e até ao dia da necropsia. As setas em preto indicam o início e o término do tratamento, realizado pela via oral.



Não foi observada mortalidade dentre os grupos de animais infectados e tratados, no entanto, foi notificada a ocorrência de duas mortes (aos 14º e 18º dias de infecção) no grupo de animais inoculados e não tratados. Juntos, tais resultados demonstram a boa tolerabilidade dos tratamentos com o ELF e com a LST isolada TC, tanto em monoterapia ou quando combinados ao Bz.

### 6.2.5 Efeito do tratamento com o ELF e com a TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na alteração dos níveis séricos de AST e ALT nos camundongos experimentalmente infectados pela cepa Y do *T.cruzi*.

Na figura 14 encontram-se representados os níveis séricos das enzimas de função hepática. De modo geral, houve aumento significativo no nível de AST em todos os grupos infectados que receberam ou não o tratamento (figura 14A).

Observa-se que de modo geral todos os grupos de animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e que receberam os diferentes tratamentos, apresentaram significativamente menores níveis da enzima hepática ALT (fig.14B) Somente o grupo controle positivo apresentou diferença estatística em relação ao grupo de animais não infectados, já os grupos de animais tratados com Bz, ELF e TC apresentaram níveis de ALT significativamente menores aos observados nos animais do grupo controle positivo.

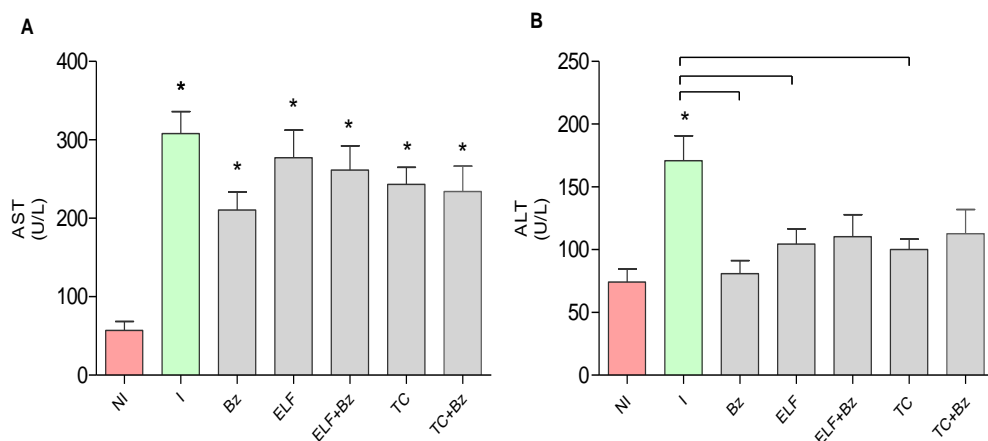


Figura 14 - Níveis séricos das enzimas de função hepática.

Fonte: Do autor

Legenda: Níveis séricos das enzimas de função hepática, aspartato aminotransferase AST (A) e alanina aminotransferase ALT (B), em camundongos dos diferentes grupos experimentais: NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol. \* representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras que ligam as colunas representam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### **6.2.6 Influência dos tratamentos com ELF e taginina C, em monoterapia ou combinados ao Bz, na produção de Imunoglobulina G (IgG) e isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b), nos plasmas de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi***

A figura 15 mostra os índices de anticorpos da classe IgG e isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b detectados no plasma dos camundongos inoculados ou não com a cepa Y do *T. cruzi* e que receberam ou não o tratamento por 20 dias consecutivos. É possível perceber que em animais não infectados os níveis de IgG foram muito reduzidos (figura 15A), sendo significativamente menores que os níveis apresentados pelos animais infectados e que foram submetidos ou não ao tratamento. Animais infectados e não tratados apresentaram alta produção de anticorpos IgG e um perfil semelhante foi observado nos animais tratados com o ELF em monoterapia. Animais tratados com a TC em monoterapia apresentaram níveis de IgG intermediários aos níveis apresentados pelos animais do grupo controle positivo e aos detectados nos animais do grupo não infectado. Os níveis de IgG destes animais foram menores quando comparados aos produzidos pelos animais tratados com ELF em monoterapia, sendo porém, maiores que os detectados nos grupos tratados com as combinações.

Foi observado que o fármaco de referência Bz induziu a uma baixa produção de anticorpos dessa classe se comparado com os níveis observados na dosagem dos animais infectados não submetidos aos tratamentos, entretanto superiores quando comparados à produção de IgG apresentada pelos animais saudáveis. Porém, estes resultados não superaram os observados nos grupos tratados com as combinações, sendo estes os que mais influenciaram de forma significativa na produção de anticorpos IgG. Os dois grupos de animais submetidos a tratamentos em combinações apresentaram níveis similares de anticorpos IgG, estes resultados demonstraram novamente o benefício da estratégia da combinação, uma vez que os níveis de anticorpos nesses animais foram significativamente menores aos detectados nos demais grupos de animais infectados, que receberam ou não o tratamento.

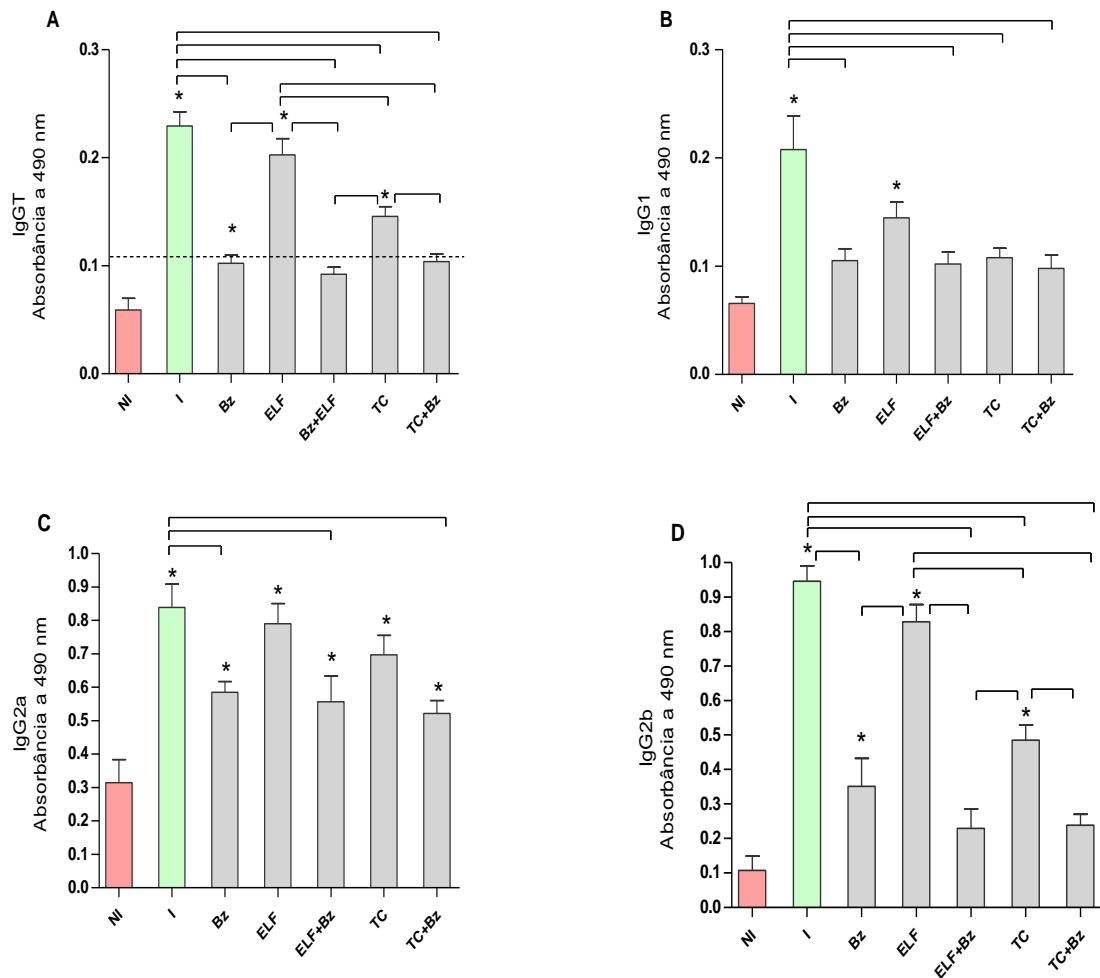


Figura 15 - Níveis de produção de anticorpos da classe IgG e isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b.

Fonte: Do autor

Legenda: 30 dias após o término do tratamento, foram dosados os níveis de IgGT (A) e isotipos IgG1 (B), IgG2a (C) e IgG2b (D) a partir do plasma de camundongos infectados ou não pela cepa Y do *T. cruzi*. NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol

\* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras que ligam as colunas representam diferença estatística entre os grupos de animais ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada na fig. 15A representa a absorbância discriminante (0,111).

A análise da figura 15B revela que nos animais do grupo controle positivo foram detectados elevados títulos de anticorpos da classe IgG1, tais níveis foram significativamente maiores quando comparados a todos os demais grupos de animais, exceto o grupo tratado com ELF. Os tratados com o ELF em monoterapia apresentaram níveis intermediários dessa subclasse de anticorpo, quando comparados aos animais não infectados.

Os resultados apresentados pelos grupos de animais que foram tratados com as combinações, mais uma vez chamou a atenção, visto que os níveis de produção de IgG1

nestes animais foram considerados semelhantes aos apresentados pelos animais tratados com o Bz. De forma semelhante foram os níveis detectados em animais tratados com a TC em monoterapia. Estes quatro grupos de animais, não apresentaram diferença estatística em relação à produção do isotipo IgG1 quando comparados ao grupo de animais não infectados.

Em relação à dosagem de IgG2a, a figura 15C demonstra que animais não tratados exibiram altos títulos desse isotipo. Os camundongos que foram submetidos ao tratamento com ELF não apresentaram diferença estatística em relação aos animais do grupo controle positivo, sendo seus títulos de IgG2a muito elevados. De modo semelhante foi o resultado observado no grupo tratado com a TC em monoterapia, que apresentaram quase os mesmos títulos de IgG2a apresentados pelos animais tratados com o ELF em monoterapia.

Os níveis de IgG2a apresentados pelos grupos tratados com ELF+Bz e ELF+Bz foram muito similares aos observados nos animais tratados com o Bz, podendo ser considerados intermediários aos níveis apresentados pelos animais não infectados.

Na figura 15D, é possível observar que não há diferença estatística em relação aos níveis do isotipo IgG2b detectados nos grupos de animais tratados com o ELF em monoterapia quando comparados aos apresentados pelos animais infectados e não tratados, sendo estes níveis muito elevados. Já os animais tratados com a TC em monoterapia, tiveram uma significativa redução da produção dessa subclasse de anticorpo, sendo muito menores que os títulos de IgG2b observados nos resultados apresentados pelos animais tratados com o ELF em monoterapia e considerados intermediários os níveis quando comparados aos animais não infectados. Por fim, ao comparar os resultados das dosagens de IgG2b no plasma de animais tratados com as combinações de LSTs e Bz, verifica-se que tais animais apresentaram reduzidos níveis de produção dessa subclasse, superando novamente os resultados demonstrados pelos animais tratados com o fármaco Bz.

### **6.2.7 Influência dos tratamentos com ELF e LST isolada TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 no plasma de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi***

Foram verificados no plasma dos animais os níveis de produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias a fim de se avaliar a influência dos diversos tratamentos na resposta imune celular e posteriormente relacioná-la à intensidade da inflamação no coração dos animais infectados e submetidos ao tratamento, de modo a compará-los aos animais não tratados. Na figura 16 estão representados os níveis da citocina IFN- $\gamma$  detectados no plasma

dos animais tratados com Bz, ELF e TC, em monoterapia e em combinação com o Bz. É possível observar que dentre os grupos analisados, os animais não infectados apresentaram os menores níveis de IFN- $\gamma$ . Já os animais infectados e não tratados, apresentaram os maiores níveis de produção da citocina, sendo considerado significativamente maior em relação ao grupo não infectado.

Os três grupos de animais que foram submetidos aos tratamentos em monoterapia, e o grupo de animais tratados com a combinação de ELF+Bz apresentaram níveis semelhantes de produção dessa citocina inflamatória, sendo detectada alta produção de IFN- $\gamma$ , não havendo portanto, diferença estatística em relação aos níveis apresentados pelo grupo de animais do controle positivo. Os níveis detectados nesses animais foram significativamente maiores em relação ao grupo de animais não infectados.

Observou-se que a combinação TC+Bz foi a única estratégia de tratamento capaz de reduzir a produção de IFN- $\gamma$  de forma significativa. Os níveis da citocina pró-inflamatória neste grupo de animais, não apresentaram diferença estatística em relação aos níveis observados nos animais não infectados.

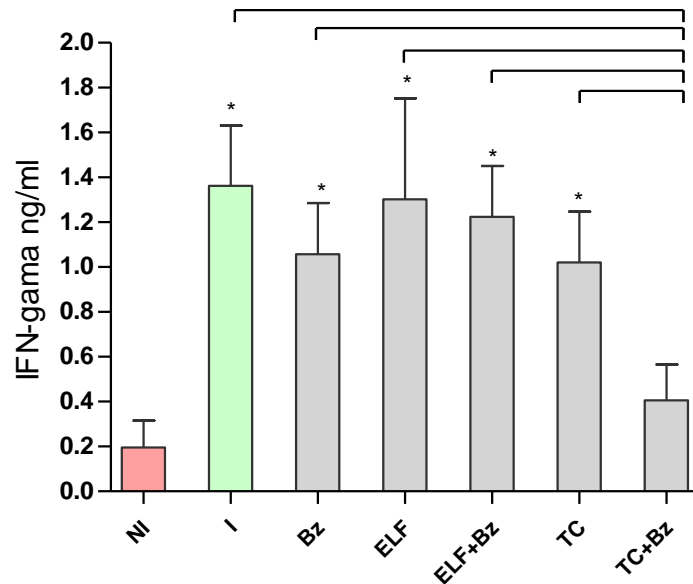


Figura 16 - Níveis da citocina IFN-gama avaliados por ELISA.

Fonte: Do autor

Legenda: Produção da citocina IFN-gama dosada no plasma dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais

tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol. \* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras que ligam as colunas representam diferença estatística entre os grupos de animais ( $p < 0,05$ ).

A análise do impacto dos tratamentos com ELF e TC em monoterapia ou combinadas ao Bz em relação à produção de TNF- $\alpha$  estão representadas na figura 17. É possível verificar que os animais infectados e não tratados apresentaram alto índice de produção desta citocina, sendo encontrada diferença estatística em relação aos animais não infectados. Foi observado que as estratégias de tratamento utilizando Bz em monoterapia e ELF combinado ao Bz não foram eficazes em reduzir o índice de produção de TNF- $\alpha$  nos animais destes grupos, sendo detectados índices semelhantes aos observados nos animais infectados e não tratados.

Ao analisar os resultados relacionados aos animais tratados com as LSTs em monoterapia, verificou-se que tanto o ELF quanto a TC isolada foram capazes de reduzir de forma significativa os níveis de TNF- $\alpha$  nos animais, resultado semelhante foi observado nos animais tratados com a combinação TC+Bz, que apresentou o resultado mais satisfatório dentre todas as estratégias de tratamento. Estes três últimos grupos foram os únicos que não apresentaram níveis de produção de TNF- $\alpha$  estatisticamente diferente em relação aos animais não infectados.

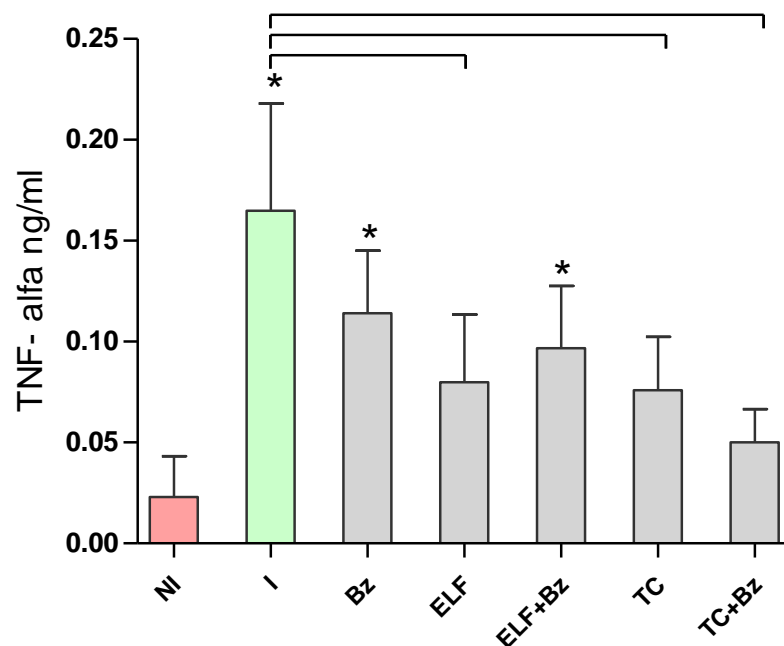


Figura 17 - Níveis da citocina TNF-alfa avaliados por ELISA.

Fonte: Do autor

Legenda: Produção da citocina TNF-alfa dosada no plasma dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol. \* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras que ligam as colunas representam diferença estatística entre os grupos de animais ( $p < 0,05$ ).

A figura 18 representa os resultados da dosagem dos níveis de produção da citocina IL-10 no plasma dos animais infectados e submetidos ou não ao tratamento e dos animais não infectados. Os resultados mostram que os animais não infectados apresentaram baixa produção desta citocina anti-inflamatória, por outro lado, já os animais infectados e não tratados, produziram maiores índices de IL-10 se comparados ao grupo não infectado.

É possível verificar que os animais tratados com Bz não apresentaram diferença estatística em relação aos animais do grupo não infectado, demonstrando dessa forma, que o Bz não causou significativo impacto na resposta imune celular durante o tratamento, sendo detectada baixa produção de IL-10.

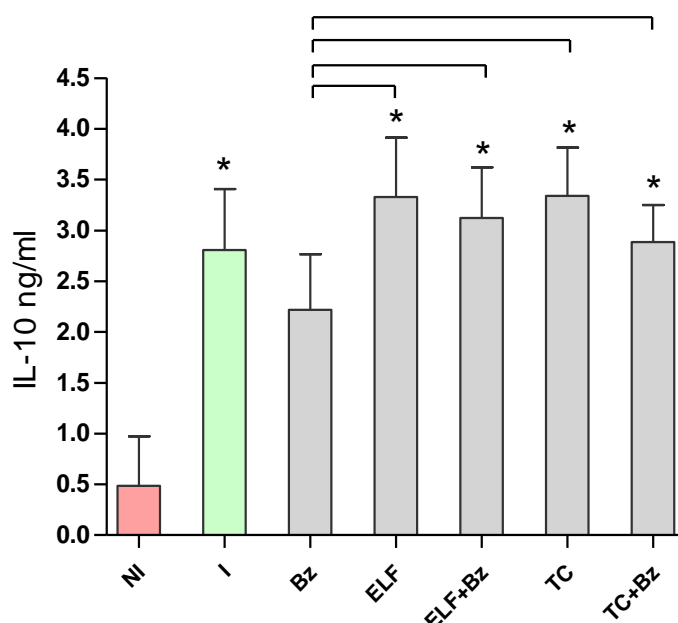


Figura 18 - Níveis da citocina IL-10 avaliados por ELISA.

Fonte: Do autor

Legenda: Produção da citocina IL-10 dosada no plasma dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinado ao benznidazol. \* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras que ligam as colunas representam diferença estatística entre os grupos de animais ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que os animais que receberam tratamentos com as LSTs, tanto em combinação, quanto em monoterapia apresentaram os maiores índices de produção de IL-10, superando inclusive os resultados demonstrados pelos grupos infectados, de modo que não foi observada diferença significativa entre estes grupos. Os níveis de IL-10 verificados nos

grupos tratados com as LSTs superaram os níveis observados nos animais tratados pelo fármaco Bz.

### 6.2.8 Avaliação da capacidade dos tratamentos com ELF e TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, em prevenir ou reduzir a miocardite em camundongos infectados pelo *T. cruzi*

O número de núcleos celulares presentes no miocárdio dos camundongos inoculados ou não com a cepa Y do *T. cruzi* estão representados nas figuras 19 e 20. Dentre os animais inoculados e tratados, o único grupo que apresentou diferença estatística em relação aos animais do grupo controle negativo foram os dos animais tratados com ELF em monoterapia.

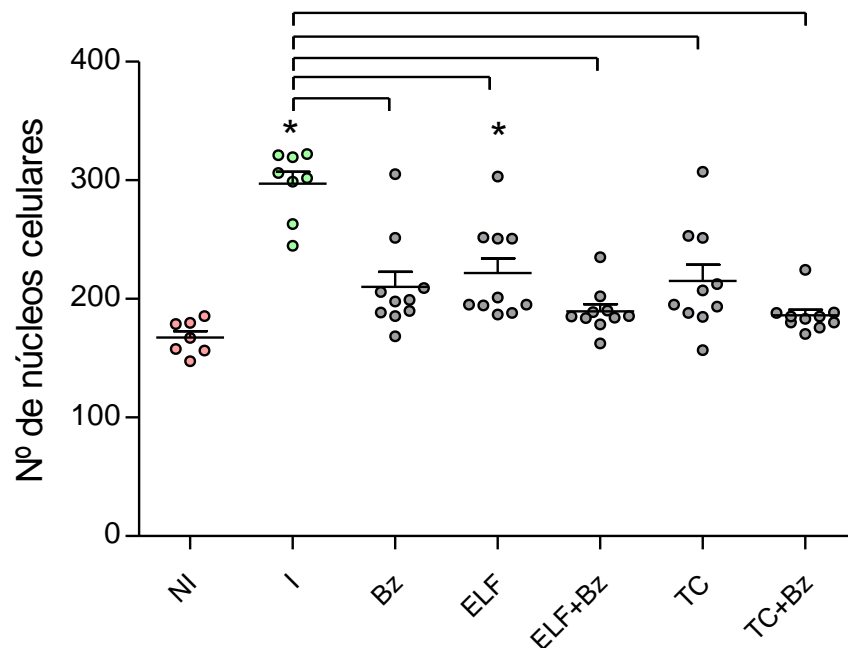


Figura 19 - Inflamação na área cardíaca dos camundongos inoculados ou não com a cepa Y do *T. cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: NI = animais não infectados; I = animais infectados e não tratados; Bz = animais tratados com benznidazol; ELF = animais tratados com ELF; ELF+Bz = animais tratados com ELF combinado ao benznidazol; TC = animais tratados com TC; TC+Bz = animais tratados com TC combinada ao benznidazol. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. Foi fixado em 95% ( $p < 0,05$ ) o nível de confiança dos testes.

\* Representa diferença estatística em relação aos animais não infectados. As barras representam diferença estatística entre os grupos de animais que se interligam.



De modo geral, todos os esquemas de tratamentos foram eficazes em reduzir o número de células inflamatórias, sendo significativamente menores quando comparados ao grupo controle positivo. O menor índice de miocardite foi observado entre os animais tratados com as LSTs combinadas ao Bz, sendo estes valores inferiores aos apresentados pelo fármaco de referência utilizado em monoterapia. Através da figura 20 é possível perceber um significativo infiltrado inflamatório no grupo controle positivo, sendo o número de células inflamatórias detectadas em menores quantidades nos grupos de animais que receberam tratamentos.

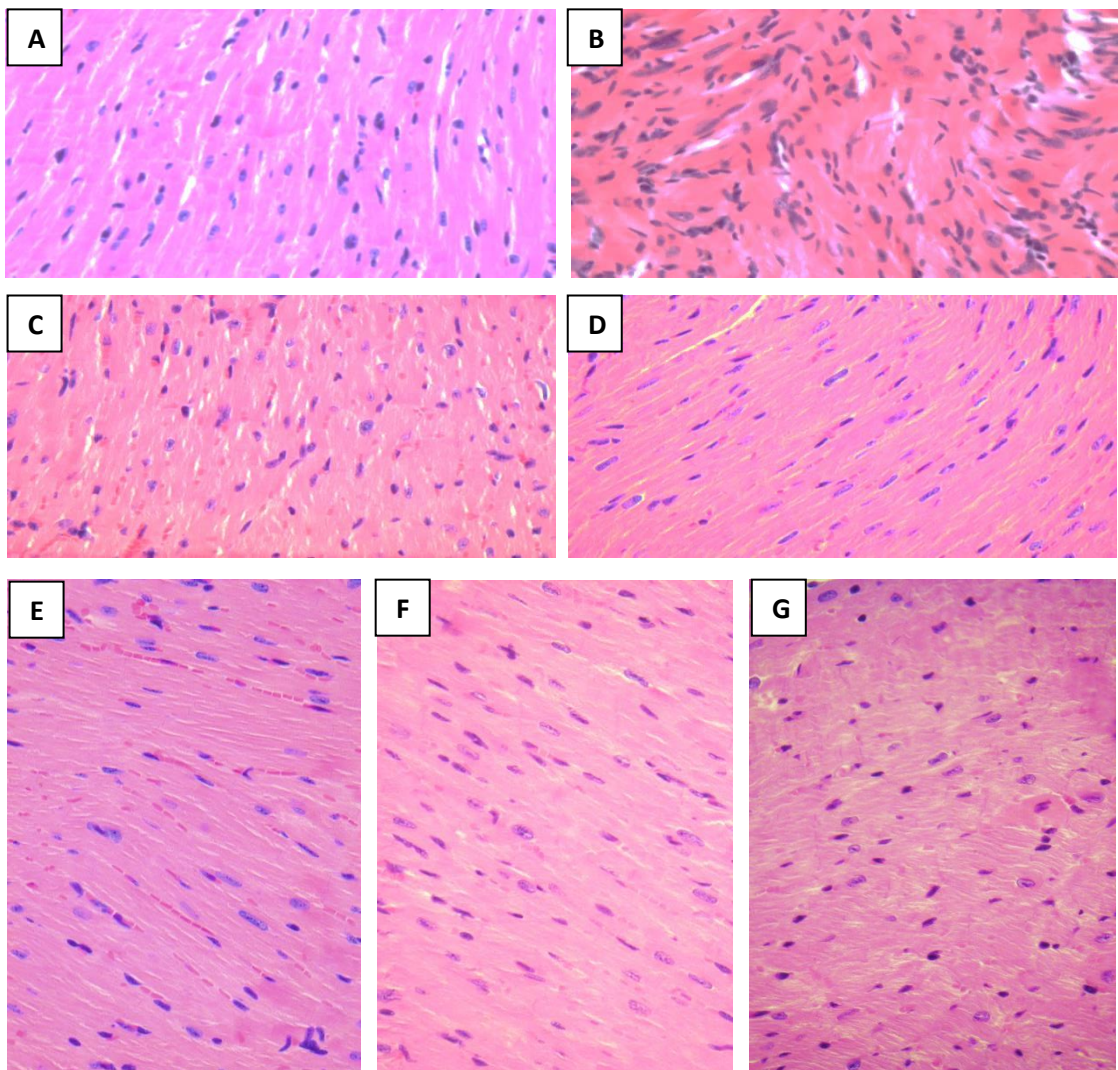


Figura 20 - Imagens obtidas de lâminas com seções do coração de camundongos infectados ou não pela cepa Y do *T. cruzi*.

Fonte: Do autor

Legenda: A: Grupo de animais não infectados (controle negativo); B: Grupo de animais infectados e não tratados (controle positivo); C: Grupo de animais infectados e tratados com benznidazol; D: Grupo de animais infectados e tratados com ELF; E: Grupo de animais infectados e tratados com a combinação benznidazol+ELF; F: Grupo de animais infectados e tratados com TC; G: Grupo de animais infectados e tratados com a combinação benznidazol+TC. Os órgãos foram coletados para análise histopatológica aos 50º dia de infecção. As lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina e posteriormente visualizadas pela objetiva de 40X.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar de recentemente ter sido comemorado o centenário da descoberta da doença de Chagas, por se tratar de uma doença debilitante e na maioria das vezes incurável, ela ainda é considerada como um grave problema de saúde pública. Após a malária e a esquistossomose, a doença de Chagas é a terceira doença parasitária mais comum em todo o mundo (WHO, 2015). Dados oficiais da Organização Mundial de Saúde revelam que atualmente há no Brasil aproximadamente 1,2 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, e uma estimativa do ano de 2015 revelou que cerca de 430.000 chagásicos apresentaram complicações cardíacas (DNDi, 2016).

O tratamento específico da doença de Chagas atualmente é baseado no uso do benznidazol, que apresenta boa eficácia quando é realizado durante a fase aguda da infecção. No entanto, o medicamento induz baixíssimos índices de cura quando o tratamento é realizado na fase crônica, não sendo capaz na maioria das vezes de reduzir a progressão clínica cardíaca da doença, especialmente em indivíduos com cardiomiopatia chagásica estabelecida (MORILLO *et al.*, 2015).

Estes dados a respeito do atual cenário do tratamento etiológico da doença de Chagas reforçam a necessidade de se voltar a atenção para a busca de novos tratamentos, mais eficazes, com novos medicamentos ou combinações de fármacos. Os compostos naturais representam uma fonte rica e promissora, de propriedades químicas e biológicas ativas, sendo considerados como alto potencial farmacológico. As LSTs são uma classe reconhecida com várias propriedades biológicas, como antiparasitárias, antimicrobianas e anti-inflamatórias, entre outras (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2012). Vários estudos tem comprovado a atividade antiparasitária das diversas classes de LSTs. Recentemente Wulsten *et al.* (2017) demonstraram que as LSTs possuem atividade contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania sp.*, em um outro estudo foi verificada a atividade anti-malárica contra três cepas de *Plasmodium falciparum*, dessa vez envolvendo a LST isolada TC, extraída da espécie *T. diversifolia* (GOFFIN *et al.*, 2002).

Considerando estes estudos antecedentes, o presente trabalho propôs avaliar o potencial tripanocida *in vitro* e *in vivo* de duas LSTs isoladas (TA e TC) e do ELF composto por várias LSTs. Uma das primeiras etapas da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas consiste no estudo *in vitro* para a avaliação das propriedades biológicas das moléculas obtidas (FERREIRA *et al.*, 2009; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; LOMBARDINO;

LOWE, 2004). Sendo assim, inicialmente as LSTs foram avaliadas quanto à atividade tripanocida *in vitro* frente às formas epimastigotas e amastigotas da cepa Y do *T.cruzi*. Os resultados dos testes *in vitro*, comprovaram o potencial tripanocida das LSTs contra ambas as formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo que o ELF e a TC apresentaram os resultados mais satisfatórios, com valores de concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) inferiores ao apresentado pelo fármaco Bz. Estes resultados *in vitro* estão de acordo com os observados por Saeidnia *et al.* (2013), que demonstraram que as LSTs, tanto em extrato como isolada, são compostos ativos contra o parasito. Em outros estudos foi demonstrado que a IC<sub>50</sub> desses compostos eram consideravelmente menores que a concentração inibitória de 50% apresentada pelo fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas (CHATURVEDI, 2011; JIMENEZ-ORTIZ *et al.*, 2005).

Em relação à capacidade de reduzir o índice de células H9c2 parasitadas por amastigotas, somente foi possível avaliar o percentual de inibição nas células incubadas na presença da concentração de 0,6 µg/mL de cada substância natural, devido ao fato das maiores concentrações terem causado morte celular. Contudo, foi verificado que novamente o ELF e a TC isolada apresentaram os melhores resultados de inibição da infecção quando comparados à TA. Apesar de também ter apresentado atividade *in vitro* contra ambas as formas do *T. cruzi*, a LST isolada TA não foi capaz de superar os resultados das demais LSTs e do Bz.

Uma vez que o ELF e a TC apresentaram resultados superiores aos observados em TA, as duas primeiras LSTs foram novamente avaliadas em testes *in vitro* contra as formas epimastigotas, porém, nesta etapa foram combinadas ao Bz. Através das curvas de dose-resposta, foi verificado que quando utilizados em monoterapia, o fármaco e as substâncias naturais induziram à menor percentagem de inibição de proliferação de epimastigotas. À medida que se aumentaram as concentrações nas combinações entre Bz e ELF ou TC, também foi maior o percentual de inibição de proliferação, sugerindo um efeito aditivo. Este perfil foi confirmado através do método de FICs, onde os valores do somatório das FICs foram superiores a 0,5 e inferiores a 4,0.

De acordo com Odds, (2003), é atribuída como uma interação do tipo sinérgica quando os valores do somatório das FICs são  $\leq 0,5$ , do tipo aditivo  $>0,5$  e  $<4,0$  e interação do tipo antagônico quando  $\geq 4,0$ . Embora um pouco confusa a terminologia utilizada para interpretar os resultados de um isoblograma, o termo “aditivo” geralmente refere-se a uma interação positiva entre duas diferentes substâncias ou fármacos (REIMÃO; TEMPONE,

2011). Desse modo, o perfil da interação observado na combinação entre o Bz e as LSTs pode ser considerado um efeito positivo, visto que os valores do somatório das FICs ficaram próximos da linha de aditividade e muito distantes da linha de antagonismo.

Em seguida, foi avaliado o potencial tripanocida *in vivo* das LSTs, em ELF e isoladas (TA e TC), em um rápido esquema terapêutico, de nove dias, analisando três diferentes dosagens de cada composto. De acordo com o resultado da parasitemia diária realizada pelo exame de sangue a fresco, foi observado que os animais infectados experimentalmente pela cepa Y do *T. cruzi* e que foram tratados com a maior dosagem (10 mg/Kg) da LST isolada TC, tiveram a total supressão da parasitemia, resultado não observado em nenhuma outra LST, independente da dose utilizada. Nesse sentido, os resultados *in vivo* e *in vitro* estavam correlacionados, uma vez que dentre as LSTs avaliadas, novamente a TC apresentou maior potencial tripanocida. Estes resultados corroboram os achados de outros pesquisadores, que também observaram atividade tripanocida *in vivo* durante o tratamento com LST (ZIMMERMANN *et al.*, 2013).

Uma vez que o critério estabelecido para continuidade da avaliação tripanocida de determinada LST foi a sua atividade similar ou superior ao fármaco de referência BZ, a LST isolada TA não foi classificada como um composto potencialmente ativo, visto que, os resultados *in vitro* foram inferiores ao Bz, e inferiores ao ELF e à TC isolada. E de igual modo, nos experimentos *in vivo* os resultados apresentados não foram considerados satisfatórios. Somado a isso, outro fator que colaborou para a não continuidade da avaliação da TA isolada, está relacionado com o grau de dificuldade do isolamento desta LST e a baixa quantidade extraída a partir da *T. diversifolia*. Sendo assim, prosseguiu-se com a avaliação tripanocida somente do ELF e da TC isolada, ficando definido que 10 mg/Kg seria a dose escolhida para as etapas posteriores de tratamento, uma vez que apresentou o melhor efeito tripanocida *in vivo*.

Depois de comprovada a ação tripanocida *in vivo* das LSTs, em ELF e TC (isolada), traçou-se uma metodologia a fim de se avaliar a capacidade dos compostos naturais em induzir a cura parasitológica de animais infectados experimentalmente pela cepa Y do *T. cruzi*. Para isso, foi estabelecido um esquema de tratamento de 20 dias com a dosagem definida anteriormente, de 10 mg/Kg do ELF e da TC, em monoterapia e combinadas ao Bz.

Nestes experimentos, foi utilizado o Bz como referência, uma vez que é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas, e apresenta capacidade tripanocida sobre todas as formas do parasito (COURA; DE CASTRO, 2002).

A supressão da parasitemia observada nos grupos que foram submetidos ao tratamento evidenciou novamente o potencial tripanocida das LSTs, uma vez que foi observada a supressão da parasitemia em todos os grupos tratados. Verificou-se que a TC isolada possui maior potencial em comparação com o ELF, evidenciado pelos resultados apresentados pelo exame de sangue a fresco. Desse modo, apesar de ter sido utilizada a mesma dosagem de ambas as LSTs durante o tratamento dos animais, a TC foi capaz de suprimir a parasitemia com uma média de 2,6 doses, já nos animais tratados com o ELF, uma média de 7,9 doses foram necessárias para que se observasse a supressão dos parasitos sanguíneos. Outra análise feita foi em relação à quantidade de parasitos observados no dia do pico máximo de parasitemia, de modo que os animais tratados com a TC em monoterapia apresentaram cerca de 3.500 parasitos/0,1 mL de sangue, enquanto que nos animais tratados com ELF em monoterapia, apresentaram 13.500 parasitos/0,1 mL de sangue. Estes resultados estão de acordo com os demonstrados pelos testes *in vitro*, que também demonstraram que a TC isolada possuía maior atividade em relação ao ELF.

Esta diferença observada em relação ao potencial tripanocida poderia ser atribuída devido ao fato do processo de isolamento proporcionar maiores concentrações da LST TC, conseqüentemente, o composto ativo terá maior atividade sobre o parasito. Já em relação ao ELF, mesmo havendo a presença de vários tipos de LSTs em sua composição, o que se observa é que a concentração de cada LST e seus respectivos pesos molares pode ser proporcionalmente menor em relação à TC que foi isolada.

Quando comparados os resultados apresentados pelo tratamento utilizando LST em monoterapia com os apresentados pelo fármaco de referência Bz, foi observado que foram necessárias em média 1,2 doses do fármaco durante o tratamento para verificar a total supressão da parasitemia nos animais infectados. Apesar de uma média de 2,6 doses de TC em monoterapia já terem sido suficientes para observar a total supressão, esta LST não foi eficaz em inibir a reativação da parasitemia nos animais durante o exame de sangue a fresco, onde se verificou que 50% dos animais apresentaram reativação natural da parasitemia após o término do tratamento, e no grupo tratado com o ELF 60% dos animais apresentaram a reativação da parasitemia. O mesmo não aconteceu com os animais tratados com o Bz, que foi eficiente em inibir a reativação dos parasitos em 100% do grupo após o término do tratamento, observado durante o exame de sangue a fresco.

É importante mencionar que a maioria dos compostos ativos que são testados como candidatos a novos fármacos apresentam eficácia apenas durante os testes *in vitro*,

demonstrando ineficácia durante os testes *in vivo* por fatores relacionados à alta toxicidade, redução da absorção através da via oral, entre outros (BUCKNER *et al.*, 2001; GOFFIN *et al.*, 2002; URBINA *et al.*, 2004). Ganfon *et al.* (2012) demonstraram este fato ao testar a atividade anti-parasitária de duas LSTs isoladas da espécie *Acanthospermum hispidum*, que apresentaram interessantes atividades anti-parasitárias *in vitro* contra *Trypanosoma brucei* e *Leishmania mexicana*, porém, demonstraram fracas atividades nos testes *in vivo*.

Nesse sentido, nossos resultados podem ser considerados muito positivos, pois apesar das LSTs em monoterapia não terem sido capazes de superar a atividade tripanocida do fármaco Bz, os resultados observados podem ser considerados satisfatórios uma vez que foram evidenciadas as propriedades das LSTs tanto na etapa *in vitro* quanto na *in vivo*. De modo que os tratamentos em monoterapia com o ELF e com a TC isolada foram eficazes em reduzir o número de parasitos sanguíneos com uma dosagem muito bem tolerada e inclusive 10 vezes menor que a utilizada no tratamento com Bz.

Já em relação aos tratamentos combinados entre as LSTs e o Bz, foi demonstrado que a terapia da combinação potencializou a atividade do fármaco, induzindo a resultados similares (ELF+Bz) e superiores (TC+Bz) em relação ao tratamento com o Bz em monoterapia. De acordo com alguns estudos envolvendo a cepa Y do *T. cruzi* o percentual de cura observado na doença de Chagas experimental utilizando como tratamento o Bz, chega a 70% (OLIVEIRA *et al.*, 2008; URBINA; DOCAMPO, 2003). Segundo Shikanai-Yasuda *et al.* (2016), um dos métodos tradutores de cura na doença de Chagas é a sorologia com resultados negativos após o tratamento antiparasitário da doença de Chagas, entretanto, o critério de cura estabelecido por este presente estudo envolveram três testes independentes: (i) exame de sangue a fresco, (ii) hemocultura e (iii) dosagem de anticorpos da classe IgG. Sendo assim, os animais somente foram considerados curados, quando apresentaram a negatividade em todos os três testes.

Desse modo, além da total supressão dos parasitos durante o exame se sangue a fresco, foi verificado que a combinação TC+Bz foi eficaz em inibir a reativação natural dos parasitos evidenciado pelo teste de hemocultura. Todos os animais deste grupo de tratamento apresentaram negatividade diante da dosagem de anticorpos da classe IgG, de modo que 100% dos animais obtiveram a cura parasitológica. Esse resultado foi superior ao apresentado pelo tratamento somente com Bz, que induziu a 70% de cura dos animais, resultado similar ao apresentado pela combinação ELF+Bz. Além disso, durante e após o término do tratamento, não foram constatadas reações adversas, mortes e, através da análise realizada em relação ao

peso corporal foi demonstrado que após o tratamento, os animais voltaram a ganhar peso corpóreo. Sabidamente, as atividades de ALT e AST são indicadores-chave da toxicidade hepática induzida por drogas envolvendo animais de laboratórios e para monitoramento geral de pacientes, porém, diante de uma lesão puramente hepática, os níveis de ALT sobem ligeiramente mais que os níveis de AST (TARRANT; MEYER; KATAVOLOS, 2013). Dessa forma, os achados em nossos estudos demonstraram que todos os esquemas de tratamentos foram eficazes em reduzir os níveis séricos de ALT, sugerindo a ausência de dano hepático. Uma vez que a AST é encontrada também em outros tecidos como o coração e músculo esquelético, os níveis mais elevados desta enzima poderiam estar relacionados à miocardite e não a lesões em hepatócitos.

Juntas, estas observações evidenciam a boa tolerabilidade do tratamento com as LSTs, tanto em monoterapia ou quando combinadas ao Bz. Esses resultados estão de acordo com o analisado por vários pesquisadores que testaram a terapia da combinação com o objetivo de intensificar a eficácia do tratamento e induzir à ocorrência de menos efeitos adversos. Em um recente estudo, Leite *et al.* (2017) demonstraram que a terapia combinada entre Enalapril e Bz resultou em uma redução de 20% dos parâmetros inflamatórios observados na terapia em monoterapia com Bz, consequentemente reduzindo a miocardite de animais infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*. Em outro estudo, foi verificada que a combinação entre os fármacos benznidazol e itraconazol além de suprimir os parasitos de forma mais eficaz também conferiu redução ou prevenção de lesões típicas associadas à doença de Chagas com doses significativamente menores que as utilizadas no tratamento com Bz em monoterapia (ASSÍRIA FONTES MARTINS *et al.*, 2015).

Considerando os resultados obtidos nas etapas já descritas, este estudo verificou ainda a influência dos tratamentos com ELF e TC, em monoterapia ou combinados ao Bz, na produção de Imunoglobulina G (IgG) e isotipos (IgG1, IgG2a e IgG2b). Há muito tempo a análise de anticorpos anti-*T. cruzi* é considerada a base do diagnóstico imunológico da doença de Chagas, e na infecção experimental a resposta específica é observada com predomínio dos isotipos IgG2a e IgG2b (ARAÚJO-JORGE, TANIA C. DE; CASTRO, 2012).

A análise dos níveis de anticorpos no plasma dos animais permitiu verificar que os grupos tratados em monoterapia com ELF ou TC apresentaram os maiores títulos de IgG, não apresentando diferença estatística com os animais infectados e que não receberam tratamentos. Logo, estes dois grupos experimentais foram os únicos que não apresentaram animais curados, portanto, estes perfis de anticorpos já eram esperados, uma vez que os

parasitos são capazes de desencadear inúmeras alterações no sistema imunológico, e os anticorpos IgG respondem contra as formas sanguíneas do parasito. Levin *et al.* (1989) foram um dos pioneiros a reportar a presença de altos títulos de anticorpos em chagásicos, e desde então, outros pesquisadores também tem confirmado esta correlação (GARCIA *et al.*, 2005). Sendo assim, os nossos resultados corroboram os dados encontrados na literatura.

Foi observado que as maiores titulações dos isotipos IgG1 e IgG2b prevaleceram entre os animais submetidos ao tratamento em monoterapia com ELF. Estes resultados da dosagem dessas subclasses foram similares aos resultados apresentados pelos animais infectados e não submetidos a tratamento.

A alta produção do isotipo IgG2b pode estar relacionada com a intensa ativação das células B convencionais, o que levaria a lesões inflamatórias e auto-ímmunes (D'ÁVILA *et al.*, 2009). Em um recente estudo, Caldas *et al.*, (2017) utilizando dois diferentes modelos experimentais, demonstraram que há correlação entre a miocardite e o índice de reatividade de anticorpos IgG, sobretudo o isotipo IgG1, de modo que, cães e camundongos experimentalmente infectados por diferentes cepas do *T.cruzi* apresentaram níveis mais altos de miocardite quando haviam a intensa produção de IgG1. De fato em nossos resultados foi observado que os animais tratados com o ELF em monoterapia apresentaram os maiores índices de IgG2b e IgG1, conseqüentemente também foi observado que dentre os grupos que foram tratados, o grupo que recebeu o ELF como tratamento, apresentou o maior número de animais com intensa miocardite. Em contrapartida, os animais submetidos às terapias combinadas apresentaram os menores níveis de IgG1, IgG2b, conseqüentemente, também foi verificado os menores índices de infiltrado inflamatório, de modo que a combinação ELF+Bz preveniu ou reduziu a miocardite em 08 animais e a combinação TC+Bz em 09 animais. Um fato interessante foi observado entre os animais tratados em monoterapia com a TC, onde apesar de ter sido evidenciado pelos testes do controle de cura que este tratamento não induziu a cura parasitológica de nenhum dos animais, esta LST isolada foi capaz de induzir à redução de núcleos inflamatórios no miocárdio de 7 animais, este fato pode ser devido às suas propriedades anti-inflamatórias.

Estes resultados demonstram que a resposta imunológica do hospedeiro é de suma importância na determinação do curso da infecção, sendo assim, modular as respostas imunes, humoral e celular, podem induzir a prevenção da patogênese.

Sabidamente, citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , são essenciais para a proteção inicial do hospedeiro. Tais citocinas são necessárias para a erradicação dos



parasitos através do estímulo para a produção de óxido nítrico (NO) (TALVANI *et al.*, 2004). Vários trabalhos têm demonstrado que o IFN- $\gamma$  tem atividade tripanocida e através de macrófagos ativados controlam a replicação intracelular do *T. cruzi* através da produção do NO. Já o TNF- $\alpha$  é produzido pelos macrófagos na presença de tripomastigotas vivos, porém, a produção do IFN- $\gamma$  potencializa em cerca dez vezes a produção de TNF- $\alpha$ ; juntos, desempenham importante e essencial papel no controle da quantidade de parasitos circulantes (ARAÚJO-JORGE, TANIA C. DE; CASTRO, 2012; TALVANI *et al.*, 2004; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994).

Entretanto, Souza *et al.*, (2004) relatam que enquanto essenciais para a proteção durante a fase inicial da doença, tais citocinas também são correlacionadas com os danos teciduais e a gravidade da doença. Embora a resposta imune seja extremamente fundamental para a defesa contra o parasito, os principais aspectos patológicos nem sempre estão relacionados diretamente ao agente agressor, mas sim com a resposta imune exacerbada e não modulada, levando a danos teciduais (MACHADO *et al.*, 2004).

Foi observado que animais tratados com a combinação TC+Bz apresentaram os menores títulos dessas duas citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a produção do TNF- $\alpha$  em partes está envolvida com a produção do IFN- $\gamma$ , conforme já mencionado anteriormente, os nossos achados confirmam o que outros autores também já relataram. E esses baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  também podem ter contribuído para a ausência ou redução da inflamação nestes animais. Um fato que chamou a atenção foi que todos os tratamentos contendo LSTs, induziram a baixos índices de TNF- $\alpha$ , o mesmo não foi observado com o tratamento em monoterapia com o Bz.

De acordo com Cunha-Neto *et al.*, (2009), a interleucina 10 (IL-10) é uma importante citocina anti-inflamatória que inibe os efeitos das citocinas pró- inflamatórias, proporcionando um equilíbrio das respostas imunes. De fato, os baixos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  observados nos grupos que receberam os tratamentos com as LSTs, em monoterapia ou combinadas ao Bz, podem ser justificados devido à modulação da resposta imune induzida pelas propriedades anti-inflamatórias das LSTs. Este fato foi evidenciado através da dosagem da citocina IL-10, demonstrando a alta produção desta citocina em animais que receberam tratamentos com LSTs, tanto em monoterapia quanto combinadas ao Bz. Este perfil tão acentuado não foi observado em relação ao Bz em monoterapia, que apresentou baixos índices de produção de IL-10, e altos índices de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sugerindo que o tratamento com o Bz, promoveu menor influência na resposta imunológica

do hospedeiro. Este resultado corrobora os estudos de Costa *et al.*, (2009) que demonstraram que, quanto menor a expressão de IL-10, pior a função cardíaca dos pacientes chagásicos, sendo assim, a baixa expressão de IL-10 está associada ao desenvolvimento de cardiomiopatia em pacientes chagásicos crônicos. Este detalhe também pode justificar a redução de miocardite nos animais tratados com TC em monoterapia, mesmo sem terem apresentado a cura parasitológica.

Esta modulação da resposta imune observada apenas entre os animais tratados com as LSTs seja em monoterapia ou combinadas, se deve em parte pelas propriedades anti-inflamatórias atribuídas às LSTs extraídas da espécie *Thitonia diversifolia* que são consideradas promissoras, inclusive apresentando um mecanismo de ação que inibe os efeitos colaterais comumente observados em outros anti-inflamatórios não-esteroidais atuais (CHAGAS-PAULA, 2010). De acordo com um recente estudo através de análises metabolômicas de plantas complexas, foi possível verificar que as LSTs atuam inibindo concomitantemente as enzimas ciclooxigenase (COX-1) e lipoxigenase (5-LOX), consideradas as principais vias da inflamação (CHAGAS-PAULA *et al.*, 2015). Alguns pesquisadores têm demonstrado que os anti-inflamatórios capazes de inibir concomitantemente as vias dependentes de (COX-1) e (5-LOX) resultam em maior eficácia do tratamento e menores efeitos adversos ao paciente, e vários compostos naturais com este mecanismo de ação tem sido apontado como promissores para o tratamento de variadas patologias (MINUTOLI *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2017).

Monteiro (2013), relatou que a miocardite aguda, uma das consequências da doença de Chagas, é caracterizada por uma resposta inflamatória intensa com envolvimento de mediadores inflamatórios como a prostaglandina, que apresenta um importante papel no desenvolvimento da doença contribuindo para o remodelamento cardíaco e deficiências funcionais deste órgão após a infecção pelo *T. cruzi*. Os níveis de produção deste eicosanoide estão diretamente relacionados com a expressão e atividade da enzima ciclooxigenase. Foi demonstrado durante seu trabalho que a infecção pela cepa Berenice-62 do *T. cruzi* induz ao aumento da expressão e da atividade da proteína COX-2. Desse modo, uma vez que é comprovada a ativação da via COX-2 durante a infecção pelo *T. cruzi*, o mecanismo de ação anti-inflamatório das LSTs, inibindo de forma concomitante as vias dependentes de COX-1 e 5-LOX, pode contribuir significativamente com a potencialização do tratamento e induzir a prevenção da patogênese da doença de Chagas.

Além dessa importante propriedade anti-inflamatória das LSTs extraídas da *T. diversifolia*, é importante mencionar também, sobre a potente atividade tripanocida já relatada por outros autores e demonstrada através de nossos resultados. Considerando que existem várias classes de LSTs, porém, com semelhanças estruturais, é provável que haja diferentes alvos pelos quais as LSTs exercem seu mecanismo anti-*T. cruzi*, sendo assim, vários estudos tem tentado demonstrar os possíveis mecanismos de ação das LSTs. Sülsen *et al.*, (2016), após um extensivo trabalho demonstrou que as LSTs são capazes de inibir a biossíntese de ergosterol do *T. cruzi*, e induzir a morte celular por apoptose, fato evidenciado através da observação de alterações na camada superficial da membrana plasmática e despolarização da membrana mitocondrial, levando à fragmentação do DNA, além disso, as LSTs induziram ao aumento do estresse oxidativo no parasito através da inibição da HaemOx-1.

Segundo Ciccarelli *et al.*, (2007), HaemOx-1 exerce uma resposta de defesa antioxidante em *T. cruzi*, a sua inibição leva a alterações morfológicas com lesão da maquinaria enzimática do parasito, ocasionando diminuição da síntese de proteína, bem como menor atividade de enzimas antioxidantes, como a tripanotiona redutase. Estes resultados estão de acordo com Barrera *et al.*, (2013), que verificaram que as LSTs reduziram significativamente a concentração endógena de glutathiona no interior do parasito, aumentando entre 2,7 e 5,4 vezes a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que pelo menos um dos mecanismos de ação das LSTs é através da indução do estresse oxidativo.

São escassos os trabalhos descritos na literatura que avaliaram o potencial das LSTs, sobretudo as extraídas de *T. diversifolia*, em relação à indução do índice de cura e interferências na resposta imunológica durante o tratamento experimental da doença de Chagas. Recentemente, De Mello *et al.*, (2016) testaram a atividade da LST Lychnopholide, extraída de *Lychnophora trichocarpha*, avaliando-a em solução livre e encapsulada em nanocápsulas poliméricas. O resultado demonstrou que quando administrada a LST Lychnopholide em solução livre, embora não tenha sido observada cura, houve redução da parasitemia em comparação com os animais do grupo controle positivo. Porém, quando a LST foi associada à nanocápsulas poliméricas, a eficácia da LST Lychnopholide foi aumentada, induzindo à redução da parasitemia, aumento da taxa de sobrevivência e alta percentagem de cura na fase aguda (62,5%) e fase crônica (55,5%) em infecção experimental com *T. cruzi*.

Embora no presente estudo tenha sido demonstrada a atividade tripanocida e os benefícios que o tratamento com LSTs extraídas de *T. diversifolia* durante a fase aguda da infecção, um passo futuro poderia ser analisar a influência das LSTs durante a fase crônica experimental, e

buscar estratégias que visem aumentar a eficácia terapêutica destes compostos naturais, assim como as nanocápsulas poliméricas. Porém, os resultados obtidos até o momento, já evidenciam o potencial das LSTs como uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento combinado na doença de Chagas, visto que, as atividades tripanocidas e anti-inflamatórias, conferidas pelas LSTs em associação com o Bz, induziram a resultados superiores aos apresentados pelo fármaco de referência Bz, em monoterapia.

E, embora ainda haja a necessidade de elucidar mais detalhes sobre os mecanismos de ação das LSTs, os resultados obtidos por meio deste trabalho e somados aos dados da literatura, evidenciam o potencial farmacológico destas moléculas, apontando-as como opções viáveis e com boas perspectivas no âmbito do tratamento para a doença de Chagas.

## 8 CONCLUSÃO

A partir destes estudos, é possível inferir que:

- O extrato de lavagem foliar rico em lactonas sesquiterpênicas e a LST isolada Tagitinina C, extraídos de *Tithonia diversifolia*, possuem alta atividade tripanocida *in vitro*, evidenciado pela IC<sub>50</sub> menor que o apresentado pelo Bz, e quando combinadas ao Bz, estas LSTs induzem a uma interação com efeito aditivo.

- O extrato de lavagem foliar e a LST isolada Tagitinina C, extraídos de *Tithonia diversifolia* são capazes de reduzir e suprimir a parasitemia de animais experimentalmente infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

- As atividades das LSTs (ELF e TC) quando combinadas ao Bz, sobretudo a TC isolada, foi capaz de induzir a cura de 100% dos animais submetidos a este tratamento e prevenindo e/ou reduzindo a miocardite de 90% dos animais, atividade superior à obtida com o tratamento de Bz em monoterapia, onde foi observado 70% de cura e com prevenção e/ou redução da miocardite em 80% dos animais.

- Tais LSTs, devido à sua atividade anti-inflamatória, interferem na resposta imune humoral e celular, com perfis favoráveis à prevenção ou retardo das lesões típicas da doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

- ABE, A. E. et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 111–116, 2015.
- ACEVEDO, C. H. et al. Computer-Aided drug design using sesquiterpene lactones as sources of new structures with potential activity against infectious neglected diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
- ANTONIO MARIN-NETO, J. et al. The Benefit trial: Testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 319–324, 2009.
- APARECIDA PAIVA, F. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and  $\beta$ -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 15, 2015.
- ARAÚJO-JORGE, TANIA C. DE; CASTRO, S. L. DE. Doença de chagas: manual para experimentação animal. **Editora FIOCRUZ**, v. 20, p. 368, 2012.
- ARORA, D.; RANI, A.; SHARMA, A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 7, n. 14, p. 179–187, 2013.
- ASCHENBRENNER, A.-K.; HORAKH, S.; SPRING, O. Linear glandular trichomes of *Helianthus* (Asteraceae): morphology, localization, metabolite activity and occurrence. **AoB Plants**, v. 5, p. 28, 2013.
- ASSÍRIA FONTES MARTINS, T. et al. Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2015.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. D. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 9, p. 1225–1237, 2014.
- BANERJEE, S. et al. Evaluation of Phytochemical Screening and Anti Inflammatory Activity of Leaves and Stem of *Mikania scandens* (L.) Wild. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 4, n. 4, p. 532–536, 2014.
- BARBOSA, M. DAS G. V. et al. Chagas disease in the state of Amazonas: History, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. Dec. 2013, p. 27–33, 2015.
- BARRERA, P. et al. Natural sesquiterpene lactones induce oxidative stress in *Leishmania mexicana*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

BAUER, A.; BRÖNSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 35–60, 2014.

BELLO CORASSA, R. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspectives in Public Health**, v. 137, n. 5, p. 289–295, 2016.

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31–47, 2017.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BIANCHI, F. et al. Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

BORGES, B. C. et al. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. Nov., p. 1–7, 2016.

BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo 4, 389-396, 1962.

BRENER, Z. Laboratory-acquired Chagas disease: comment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 527, 1987.

BUCKNER, F. S. et al. Potent Anti- *Trypanosoma cruzi* Activities of Oxidosqualene Cyclase Inhibitors Potent Anti- *Trypanosoma cruzi* Activities of Oxidosqualene Cyclase Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1210–1215, 2001.

BUSSMANN, R. W. et al. Plant use of the Maasai of Sekenani Valley, Maasai Mara, Kenya. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 22, 2006.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612–1661, 2014.

CALDAS, I. S. et al. Myocarditis in different experimental models infected by *Trypanosoma cruzi* is correlated with the production of IgG1 isotype. **Acta Tropica**, v. 167, p. 40–49, mar. 2017.

CARRIER, Y.; TRUYENS, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. **Acta Tropica**, v. 151, n. Supplement C, p. 103–115, 2015.

CARNEIRO, C. M. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, p. 1289–1303, 2017.

CAROD-ARTAL, F. J. American trypanosomiasis. **Elsevier B.V.** v. 114, p. 103-123, 1. ed., 2013.

CHADWICK, M. et al. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780–12805, 2013.

CHAGAS-PAULA, D. A. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. 2010, 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210–235, 1 fev. 2012.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. A metabolomic approach to target compounds from the asteraceae family for dual COX and LOX inhibition. **Metabolites**, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze Humana. Esudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*. n. gen., n. SP. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, p. 159-218, 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 5, p. 175–181, 2011.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities. **Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry**, v. 661, n. 2, p. 313–334, 2011.

CICCARELLI, A. et al. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 134, n. 7, p. 959–965, 2007.

COGO, J. et al. Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benzimidazole. **Phytomedicine**, v. 20, n. 1, p. 59–66, 2012.

COLI, J. C.; BOWDEN, B. F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 934-936, 1986.

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 3, p. 451–454, 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.



COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenaries in the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 51–57, 2015.

CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 252–258, 2009.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-12, 19 ago. 2014.

D'ÁVILA, D. A. et al. Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 100–105, 2009.

DA SILVA, C. F. et al. Activities of psilostachyin A and cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *in Vitro* and *in Vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5307–5314, 2013.

DAMERUM, A. et al. Elucidating the genetic basis of antioxidant status in lettuce (*Lactuca sativa*). **Horticulture Research**, v. 2, p. 1-13, 25 nov. 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DE MELLO, C. G. C. et al. Efficacy of lychnopholide polymeric nanocapsules after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5215–5222, 2016.

DE NOYA, B. A. et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377–386, 2015.

DE NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 94–102, 2015.

DI GIACOMO, C. et al. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Extract on Adipocyte Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 1-15, 7 abr. 2015.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R.; YASUDA, M. A. S. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 123–125, 2014.

DINIZ, L. DE F. **Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***. 2013, 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Ouro Preto, MG, 2013.

DINIZ, L. DE F. et al. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DNDI, América Latina. **Novo consenso nacional propõe ampliar tratamento para pacientes com doença de Chagas**. 2016. Disponível em: < <http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/pres-releases/728-consensochagasbrasil2016.html> > acesso em: 26 Jul.2017

EICKHOFF, C. S. et al. Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 508–511, 2013.

FERREIRA, A. M. et al. Benznidazole use among patients with chronic Chagas' cardiomyopathy in an endemic region of Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–13, 2016.

FERREIRA, F. G. et al. Fármacos: Do Desenvolvimento À Retirada Do Mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 14–24, 2009.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, M. T. DE O. AND A. D. Advances and Progress in Chagas Disease Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.16, n.20, p. 2290-2302, 2016.

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.

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina Clínica**, v. 148, n. 3, p. 125–131, 2017.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 2004.

FRANK, F. M. et al. Trypanocidal activity of smallanthus sonchifolius: Identification of active sesquiterpene lactones by bioassay-guided fractionation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

GANFON, H. et al. Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 411–417, 2012.

GARCÍA, M. C. et al. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3700–3708, 2016.

GARCIA, S. et al. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas ' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

GOFFIN, E. et al. *In Vitro* Antiplasmodial Activity of *Tithonia diversifolia* and Identification of its Main Active Constituent : Tagitinin C. **Planta Med**, v. 68, p. 543–545, 2002.

GÓMEZ-P, C. F.; MANTILLA-H, J. C.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal Chagas Disease Among Solid-Organ Transplant Recipients in Colombia. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. ofu032-ofu032, 1 mar. 2014.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUSTAVO BENAİM, JOHN M. SANDERS, YAEL GARCIA-MARCHÁN, CLAUDIA COLINA, R. L. Amiodarone Has Intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity and Acts Synergistically with Posaconazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49 (3), p. 892–899, 2006.

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

HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of mexican asteraceae (compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539–565, 1 abr. 1998.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 10, p. e69-75, 2010.

JANSEN, O. et al. Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15- O-acetate as the main active compound. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 289, 2012.

JÁTEM-LÁSSER, A.; RICARDI, M. S.; ADAMO, G. Herbal traditional medicine of Venezuelan Andes: An ethnopharmacological study. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. SUPPL. 1, 1998.

JIMENEZ-ORTIZ, V. et al. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. **The Journal of parasitology**, v. 91, n. 1, p. 170–4, 2005.

JIMENEZ, V. et al. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: A new therapeutic target? **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 11, p. 1411–1418, 2014.

- KARIOTI, A. et al. Trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects of anthecotulide-type linear sesquiterpene lactones from *Anthemis auriculata*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 8, p. 783–787, 2009.
- KATINAS, L. et al. The origin of the bifurcating style in Asteraceae (Compositae). **Annals of Botany**, v. 117, n. 6, p. 1009–1021, 20 maio 2016.
- KINOSHITA-YANAGA, A. T. et al. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 295–298, 2009.
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 11, p. 2097–2105, 1990.
- LEITE, A. L. J. et al. The immunomodulatory effects of the Enalapril in combination with Benznidazole during acute and chronic phases of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 174, p. 136–145, 2017.
- LEVIN, M.J. et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 5, p. 530-538, 1989.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery [mdash] then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.
- MARZOTTO, M. et al. *Arnica montana* Stimulates Extracellular Matrix Gene Expression in a Macrophage Cell Line Differentiated to Wound-Healing Phenotype. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 1-25, 10 nov. 2016.
- MATHEUS ANDRADE RAJAO, CAROLINA FURTADO, C. L. A. et al. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309–321, 2014.
- MEIRA, C. S. et al. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata L.* concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11, p. 969–974, 2015.
- MILES, M. A; FELICIANGLI, M. D.; ARIAS, A. R. DE. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **Bmj**, v. 326, n. 1, p. 1444–1448, 2003.
- MINUTOLI, L. et al. A Dual Inhibitor of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase Protects Against Kainic Acid-Induced Brain Injury. **NeuroMolecular Medicine**, v. 17, n. 2, p. 192–201, 2015.

- MIRANDA, N. et al. Pheophorbide a, a compound isolated from the leaves of *Arrabidaea chica*, induces photodynamic inactivation of *Trypanosoma cruzi*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 256–265, 2017.
- MIURA, T. et al. Antidiabetic Effect of Nitobegiku, the Herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay Diabetic Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2152–2154, 2005.
- MOLINA, I. et al. Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials. v. 61, n. 4, p. 1–7, 2017.
- MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.
- MORILLO, C. A.; ENCINA, J.; RIBEIRO, L. Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. v. 62, n. 9, 2013.
- MUÑOZ, M. J.; MURCIA, L.; SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 1, p. 5–7, 1 jan. 2011.
- MONTEIRO, C.J. Análise da expressão de COX-2 em células H9c2 infectadas com *T. cruzi* cepa Berenice-62. Dissertação (Mestrado); Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. **Universidade Federal de Ouro Preto, MG**; p.95, 2013.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11<sup>o</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 584, 2013.
- NOUVELLET, P.; DUMONTEIL, E.; GOURBIERE, S. The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p.e2505 (1-12), 2013.
- NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.
- OLIVEIRA, M. DE F. et al. Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas No Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.
- 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. 1–13, 2017.

- OWOYELE, V. B. et al. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2, p. 317–321, 2004.
- PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.
- PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, E. M.-V. AND S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v.23, n.28, p. 3154 - 3170, 2016.
- PELLETIER, S. W.; CHOKSHI, H. P.; DESAI, H. K. Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures using Vacuum Liquid Chromatography. **Journal of Natural Products**, v. 49, n.5, p. 892-900, 1986.
- PÉREZ-AYALA, A. et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 1108–1113, 19 set. 2017.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Old and new challenges in Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.15, n.11, p. 1347–1356, 2015.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Seminar**, v. 6736, n. 17, p. 1–13, 2017.
- PERIN, L. 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.
- PINAZO, M.-J. et al. Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 390–395, 2013.
- PINHEIRO, E.; BRUM-SOARES, L.; REIS, R. Mini Review Chagas disease : review of needs , neglect , and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 50, n.3, p. 296–300, 2017.
- RABITO, M. F. et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. Supplement C, p. 18–23, 2014.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 17 2010.
- REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G. Investigation into *in vitro* anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1032–1038, 2011.

- ROSENBERG, C. S.; MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. CD8<sup>+</sup> T Cells Specific for Immunodominant *Trans*-sialidase Epitopes Contribute to Control of *Trypanosoma cruzi* Infection but are Not Required for Resistance. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 560 LP-568, 2010.
- SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; HADDADI, A. Biogenic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs - a mini review. **Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 35, 2013.
- SAHOO, A. K. et al. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 42–73, 2018.
- SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. et al. High Resolution Esophageal Manometry in Patients with Chagas Disease: A Cross-Sectional Evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2016.
- SCHMIDT, T. J. et al. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. **Planta Medica**, v. 68, n. 8, p. 750–751, 2002.
- SHEN, F.-Q. et al. Synthesis of novel hybrids of pyrazole and coumarin as dual inhibitors of COX-2 and 5-LOX. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 16, p. 3653–3660, 2017.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas , 2015 \*. v. 25, p. 7–86, 2016.
- SILVA-DOS-SANTOS, D. et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 1–26, 2017.
- SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1016–1030, 2015.
- SILVA, J. J. N. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.
- SIMÕES-SILVA, M. R. et al. Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 46–53, 2017.
- SINGH, O. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 82–95, 2011.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. **Moléstia de Chagas**. 2<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antiveterial” em questão. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 2, p. 677–687, 2011.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5283–5291, 2004.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 517–554, 2008.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57–80, 2017.

SÜLSEN, V. P. et al. Mode of Action of the Sesquiterpene Lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**, v. 11, n.3, p. 1–14, 2016.

TALVANI, A. et al. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical infectious diseases**, v. 38, n. 7, p. 943–950, 2004.

TARRANT, J.; MEYER, D.; KATAVOLOS, P. Use of optimized aminotransferase methods in regulated preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 4, p. 535–538, 2013.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease : Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463–491, 2006.

TROCHINE, A. et al. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

URBINA, J. A. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of E5700 and ER-119884 , Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors , against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2379–2387, 2004.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177–5182, 1994.

VIEIRA, P. M. DE A. et al. Different Infective Forms Trigger Distinct Immune Response in Experimental Chagas Disease. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. e32912 (1-10), 2012.

VIVAS, L. et al. Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination *in vitro* and *in vivo*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 3, p. 222–228, 2008.



VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, n. 1, p. 55–65, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Media centre. Fact sheet N°340, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/> > Acesso em: 23 Jan. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO), Geneva. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, n. 6, p. 33–44, 2015.

WULSTEN, I. F. et al. Investigation of the anti-*Leishmania (Leishmania) infantum* activity of some natural sesquiterpene lactones. **Molecules**, v. 22, n. 5, p.2-12, 2017.

ZIMMERMANN, S. et al. Cynaropicrin targets the trypanothione redox system in *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7202–7209, 2013.