

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Aggeu Magalhães  
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Taciana Mirely Maciel Higino

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DO COMPOSTO P-MAPA  
ISOLADO DE *Aspergillus oryzae* SOBRE *Trypanosoma cruzi*

Recife  
2017

TACIANA MIRELY MACIEL HIGINO

**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DOS EFEITOS DO COMPOSTO P-MAPA  
ISOLADO DE *Aspergillus oryzae* SOBRE *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada/ Biologia celular e molecular aplicada ao estudo da ação de fármacos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virginia Maria Barros de Lorena

RECIFE

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- H638a Higino, Taciana Mirely Maciel.  
Avaliação in vitro e in vivo dos efeitos do composto P-MAPA isolado de *Aspergillus oryzae* sobre *Trypanosoma cruzi* / Taciana Mirely Maciel Higino. Recife:[ s.n.], 2018.  
116 p. : il., graf., tab. ; 30 cm
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz  
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo; coorientadora: Virginia Maria Barros de Lorena
1. Doença de Chagas - quimioterapia. 2. Doença de Chagas - parasitologia. 3. Nitroimidazóis - administração & dosagem. 4. Agentes tripanosomicidas - administração & dosagem. 5. *Trypanosoma cruzi* - efeitos de drogas. 6. *Trypanosoma cruzi* - crescimento e desenvolvimento. 7. Cultura de células. 8. Avaliação Pré-Clínica de Medicamentos. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. I. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

TACIANA MIRELY MACIEL HIGINO

**AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DOS EFEITOS DO COMPOSTO P-MAPA  
ISOLADO DE *Aspergillus oryzae* SOBRE *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada/ Biologia celular e molecular aplicada ao estudo da ação de fármacos

APROVADO EM: 29/09/17

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo (Orientadora)  
Departamento de Microbiologia/ IAM – FIOCRUZ/PE

---

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti  
Departamento de Microbiologia/ IAM – FIOCRUZ/PE

---

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira  
Departamento de Imunologia/ IAM – FIOCRUZ/PE

---

Dr. Valdemiro Amaro Silva Junior  
Departamento de Patologia Animal/ UFRPE

---

Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro  
UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais Miguel e Elisabete que sempre me apoiaram e me ensinaram a persistir e lutar por meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar força, sabedoria e muita paciência para vencer os obstáculos;

Aos meus pais, Elisabete e Miguel, exemplos de superação, por me apoiarem e terem suportado tantos sacrifícios ao longo destes anos para que este momento pudesse acontecer;

Aos meus irmãos, Hyane e Miguel, pelo apoio, amor e paciência nos momentos de estresse;

Ao meu sobrinho Gabriel, por alegrar e encantar a vida;

À Dra Regina Bressan pela oportunidade e orientação nesse trabalho e todo o conhecimento adquirido ao longo desses 10 anos;

À Farmabrazilis e ao Dr Bruno Carvalho por disponibilizarem o composto testado neste trabalho;

À Dra Virginia Lorena, por ter co-orientado este trabalho, e mais, por ter me dado apoio, conselhos, orientação e por ter acreditado em mim (até quando eu mesma não acreditava). Uma pessoa muito especial a quem hoje chamo de amiga;

À Dra Sheila Andrade por ter aberto as portas do seu laboratório para que parte deste trabalho fosse realizada e pelo apoio;

À Dra Veruska Alexandrino e Roni Araújo, por terem me ajudado tanto no desenvolvimento deste trabalho. Pela força que me deram e pela amizade que se construiu. Muito obrigada!

À Dra Milena Cavalcanti e Rayana Morais, pelo conhecimento compartilhado e o apoio;

Ao Dr. Valdemiro Amaral pela paciência e pelos ensinamentos;

Aos membros do Biotério de Criação e Experimentação Animal do IAM por todo o suporte nos experimentos em modelo animal;

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, aos professores e funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos e do Departamento de Microbiologia pela convivência e companheirismo ao longo desses quatro anos e meio;

À Ana Carla Silva que foi mais que uma aluna de iniciação científica durante esse doutorado, uma pessoa brilhante, gentil, sábia e grande amiga.

Às amigas Amanda Aliança, Karla Ribeiro, Larissa Oliveira, Jana Sandes, Neyla Alves, Lívia Bandeira, Renata Almeida, Ana Karine e Bruna Mazulo. Agradeço a Deus pelo milagre de tê-las conhecido.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular Dr. Luís Carlos, Dr. Fábio Brayner, Dra Ana Paula, Camila Queiroz, Antônio Sérgio, Jorge, Rubens, Nairomberg e Fernanda pelo apoio e amizade;

À Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação (VPEIC) da Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

*“Estou agora repassando uma lista de pessoas famosas que afirmaram alguma coisa como sendo a palavra final, e não consigo pensar em uma única que não estivesse errada.”*

Jeffrey Satinover



HIGINO, Taciana Mirely Maciel. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos do composto P-MAPA isolado de *Aspergillus oryzae* sobre *Trypanosoma cruzi*.** 2017. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

## RESUMO

A doença de Chagas é uma das principais causas de cardiomiopatia infecciosa no mundo. O Benznidazol (Bz) é única droga disponível no Brasil para o tratamento desta enfermidade, contudo não é totalmente eficaz e apresenta uma série de severos efeitos colaterais. Além disso, o número de casos de resistência ao tratamento tem aumentado nos últimos anos. Assim, a procura por compostos menos tóxicos e mais eficazes contra a doença de Chagas ainda é uma necessidade. O composto P-MAPA apresenta atividade imunomoduladora comprovada, além de não apresentar efeitos tóxicos em modelo murino. No presente trabalho avaliamos o efeito tripanocida e imunomodulador do P-MAPA em modelos *in vitro* e *in vivo*. Nossos resultados mostraram que o P-MAPA teve efeito sobre a viabilidade de formas tripomastigotas e reduziu a infecção de células do exsudato peritoneal (CEP) de camundongos. Além disso, o composto apresentou baixa atividade tóxica sobre as CEPs e hemácias de humano. A comparação do índice de seletividade do P-MAPA com Bz mostrou que o primeiro foi duas vezes mais seletivo ao parasito e mais seguro para as células de mamífero. As análises morfológicas e ultraestruturais de tripomastigotas mostraram que o P-MAPA causa alterações no parasito que levam a perda de viabilidade celular, e que o principal alvo intracelular seria a mitocôndria. A marcação com Rodamina 123 e MitoSox confirmou que a mitocôndria do parasito é afetada pelo P-MAPA, no entanto de forma muito discreta. O P-MAPA induziu significativamente a produção de NO e TNF e elevou, não significativamente, os níveis de IL-10 e IL-1 $\beta$  em CEPs infectadas por *T. cruzi*, sugerindo que a ação da droga sobre a forma intracelular do parasito é via ativação da resposta imune. Estudos de fase aguda da doença de Chagas mostraram que a combinação Bz 50 mg/Kg + P-MAPA 5 mg/Kg reduziu os danos cardiovasculares causados pela infecção e aumentou a sobrevivência dos animais. Todos os nossos dados apontam o potencial adjuvante do P-MAPA contra a doença de Chagas.

**Palavras – chave:** *Trypanosoma cruzi*. Cardiopatia chagásica. Resposta imune. Quimioterapia.

HIGINO, Taciana Mirely Maciel. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of the effects of P-MAPA compound isolated from *Aspergillus oryzae* on *Trypanosoma cruzi*.** 2017. Thesis (*Doctorate degree in Biological and Biotechnologies in Health*) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2017.

## ABSTRACT

Chagas disease is one of the main causes of infectious cardiomyopathy in the world. Benznidazole (Bz) is the only drug available in Brazil for the treatment of this disease, however it is not totally effective and presents a series of severe side effects. In addition, the number of cases of resistance to treatment has increased in recent years. Thus, the search for less toxic and more effective compounds against Chagas disease is still a need. The compound P-MAPA has demonstrated immunomodulatory activity and non-toxic effects in murine model. In the present work, we evaluated the trypanocidal and immunomodulatory effect of P-MAPA in *in vitro* and *in vivo* models. Our results showed that P-MAPA had an effect on the viability of trypomastigote forms and reduced the infection of peritoneal exudate cells (PEC) from mice. In addition, the compound showed low toxic activity on PECs and human erythrocytes. Comparison of P-MAPA indices with Bnz showed that the former is twice more selective to the parasite and safer for mammalian cells. Morphological and ultrastructural analyzes of trypomastigote showed that P-MAPA causes alterations in the parasite that lead to loss of cell viability, and the main intracellular target would be mitochondria. Dye with Rhodamine 123 and MitoSox confirmed that the mitochondrion of the parasite is affected by P-MAPA, however in a discrete way. P-MAPA induced significant NO and TNF production and elevated, but not significantly, IL-10 and IL-1 $\beta$  levels in *T. cruzi*-infected PECs, suggesting that the action of the compound on the intracellular form of the parasite is via activation of the immune response. Acute model of Chagas disease studies showed that the combination Bz 50 mg/Kg + P-MAPA 5 mg/Kg reduced cardiovascular damage caused by the infection and increased survival of the animals. Taken together, our data point the adjuvant potential of P-MAPA against Chagas' disease.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. Chagas cardiomyopathy. Immune response. Chemotherapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição global de indivíduos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>18</b>
<b>Figura 2</b>	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>21</b>
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática da secção longitudinal da forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>22</b>
<b>Figura 5</b>	Ultraestrutura da mitocôndria de <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>25</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura e localização do cinetoplasto nas formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	Acidocalcisoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>28</b>
<b>Figura 8</b>	Evolução da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e da patologia da doença de Chagas	<b>31</b>
<b>Figura 9</b>	Mecanismos envolvidos na miocardite provocada pela infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>35</b>
<b>Figura 10</b>	Resposta Imune Inata e Adquirida durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>38</b>
<b>Quadro 1</b>	Desafios e prioridades na pesquisa e desenvolvimento para a doença de Chagas	<b>42</b>
<b>Quadro 2</b>	Principais tendências na descoberta de drogas contra a doença de Chagas	<b>44</b>
<b>Figura 11</b>	Estrutura química do P-MAPA	<b>48</b>
<b>Figura 12</b>	Cristais de P-MAPA	<b>49</b>
<b>Figura 13</b>	Equação para cálculo da atividade citotóxica do P-MAPA e Benznidazol	<b>57</b>
<b>Figura 14</b>	Equação para cálculo da atividade hemolítica do P-MAPA e Benznidazol	<b>57</b>
<b>Figura 15</b>	Cronograma dos procedimentos para avaliação do efeito do P – MAPA sobre a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos Balb/c	<b>63</b>
<b>Figura 16</b>	Viabilidade de células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de P-MAPA e Bz	<b>66</b>
<b>Figura 17</b>	Atividade hemolítica do P-MAPA sobre hemácias de humanos	<b>67</b>

- Figura 18** Viabilidade de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* 68  
tratadas com diferentes concentrações de P-MAPA e Bz
- Figura 19** Análise da sobrevivência de formas amastigotas de *Trypanosoma* 69  
*cruzi* submetidas a diferentes concentrações de P-MAPA e Bz
- Figura 20** Efeito do P-MAPA sobre a infecção de células do exsudato 71  
peritoneal de camundongos infectado com *Trypanosoma cruzi*
- Figura 21** Ultraestrutura e morfologia de formas tripomastigotas de 74  
*Trypanosoma cruzi* após 24 horas de tratamento com diferentes  
concentrações do P-MAPA
- Figura 22** Histograma da análise por citometria de fluxo do efeito do P-MAPA 75  
sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) de formas  
tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*
- Figura 23** Histograma da análise por citometria de fluxo do efeito do P-MAPA 77  
sobre a produção de ROS pelas mitocôndrias de formas  
tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 24** Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de 78  
camundongos Balb/c
- Figura 25** Produção de citocinas em células do exsudato peritoneal de 79  
camundongos Balb/c tratadas com diferentes concentrações de P-  
MAPA
- Figura 26** Parasitemia de animais infectados com *Trypanosoma cruzi* tratados 81  
com P-MAPA e/ou Benznidazol
- Figura 27** Níveis séricos de AST, ALT e Ureia em camundongos Balb/c, 83  
infectados ou não com *T. cruzi*, 24 horas após o fim do tratamento  
com P-MAPA e/ou Benznidazol
- Figura 28** Análise histológica de tecido cardíaco de camundongo Balb/c 24 85  
horas após o fim do tratamento com P-MAPA e/ou Benznidazol
- Figura 29** Intensidade dos danos cardíacos em camundongos Balb/c, 86  
infectados ou não com *T. cruzi*, e tratados com P-MAPA e/ou  
Benznidazol, isolados ou em associação

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Atividade in vitro do P-MAPA sobre as formas tripomastigota e amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade em células de mamífero	<b>72</b>
<b>Tabela 2</b>	Análise através da citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>76</b>
<b>Tabela 3</b>	Análise através da citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	<b>77</b>
<b>Tabela 4</b>	Avaliação da sobrevivência e parasitemia pós-acompanhamento de 30 dias dos camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com P-MAPA e/ou Bz	<b>87</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BENEFIT	BENZnidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
Bz	Benznidazol
CC <sub>50</sub>	Concentração que causar a perda de viabilidade em 50% das células
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEP	Células do exsudato peritoneal
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CPY51	Esterol 14- $\alpha$ demetilase/ Citocromo P450
Cy	Ciclofosfamida
Cz	Cruzipaína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DND <i>i</i>	Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas
DPI	Dias pos-infecção
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GILPs	Glicoinositolfosfolipídios
gRNA	<i>Guide Ribonucleic Acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inibir 50% da proliferação
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISe	Índice de Seletividade
IS	Índice de Sobrevida
IV	Índice de Variação
kDNA	DNA mitocondrial
LC <sub>50</sub>	Concentração capaz de causar 50% de perda de viabilidade celular

MASPs	<i>Mucin-Associated Surface Proteins</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótideo fostato-fumarato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein</i>
OMS	Organização Mundial De Saúde
P-MAPA	Agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico
Rh 123	Rodamina 123
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT-qPCR	<i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pi	Fósforo inorgânico
PPi	Pirofosfato inorgânico
Poli P	Polifosfato
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
TcTs	<i>Trypanosoma cruzi</i> transialidase
TcTox	<i>Trypanosoma cruzi</i> hemolisina
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TSs	Transialidases
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WHA	<i>World Health Assembly</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
1.1	<b>Doença de Chagas: Considerações gerais</b>	17
1.2	<b>Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	18
1.3	<b>Biologia Celular do <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	21
1.3.1	Superfície celular	22
1.3.2	Mitocôndria e Cinetoplasto	24
1.3.3	Núcleo	27
1.3.4	Acidocalcisoma	28
1.3.5	Glicossomos	29
1.3.6	Inclusões Lipídicas	29
1.4	<b>Patologia da Doença de Chagas</b>	30
1.5	<b>Resposta Imune na doença de Chagas</b>	35
1.6	<b>Quimioterapia da Doença de Chagas</b>	40
1.7	<b>P-MAPA</b>	47
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	52
<b>3</b>	<b>PERGUNTA CONDUTORA</b>	53
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	54
4.1	Objetivo geral	54
4.2	Objetivos específicos	54
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	55
5.1	Preparo das soluções de P-MAPA e Benznidazol para experimentos <i>in vitro</i>	55
5.2	Cultura de parasitos e células de mamíferos	55
5.3	Potencial citotóxico do P-MAPA sobre células de mamíferos	56
5.4	Efeito do P-MAPA sobre as formas tripomastigota e amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
5.5	Produção de Óxido Nítrico (NO)	59
5.6	Produção de Citocinas	59
5.7	Avaliação dos efeitos do P-MAPA sobre a morfologia e ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
5.8	Avaliação dos efeitos do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS mitocondrial do <i>Trypanosoma cruzi</i>	60



<b>5.9</b>	<b>Manutenção dos animais para experimentos <i>in vivo</i></b>	<b>61</b>
<b>5.10</b>	<b>Infecção experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> e divisão dos grupos</b>	<b>61</b>
<b>5.11</b>	<b>Cronograma de tratamento</b>	<b>62</b>
<b>5.12</b>	<b>Avaliação de parâmetros parasitológicos e de mortalidade</b>	<b>64</b>
<b>5.13</b>	<b>Quantificação de marcadores bioquímicos</b>	<b>64</b>
<b>5.14</b>	<b>Análise Histológica</b>	<b>64</b>
<b>5.15</b>	<b>Análise Estatística</b>	<b>64</b>
<b>5.16</b>	<b>Considerações éticas</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>6.1</b>	<b>Atividade citotóxica do P-MAPA</b>	<b>66</b>
<b>6.2</b>	<b>Atividade hemolítica do P-MAPA</b>	<b>67</b>
<b>6.3</b>	<b>Atividade tripanocida do P-MAPA</b>	<b>68</b>
<b>6.4</b>	<b>Efeito do P-MAPA sobre a ultraestrutura e morfologia de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>72</b>
<b>6.5</b>	<b>Efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS</b>	<b>75</b>
<b>6.6</b>	<b>Efeito do P-MAPA sobre a produção de NO</b>	<b>78</b>
<b>6.7</b>	<b>Efeito do P-MAPA sobre a produção de citocinas</b>	<b>79</b>
<b>6.8</b>	<b>Parasitemia de camundongos Balb/c infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>, tratados com P-MAPA, Benznidazol ou associação</b>	<b>80</b>
<b>6.9</b>	<b>Quantificação de Marcadores Bioquímicos ALT, AST e Ureia</b>	<b>81</b>
<b>6.10</b>	<b>Avaliação Histopatológica de Tecido Cardíaco de Camundongos Balb/c</b>	<b>84</b>
<b>6.11</b>	<b>Sobrevivência e avaliação da parasitemia após acompanhamento de 30 dias pós-tratamento</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>100</b>
	<b>Anexo A – Parecer do CEUA/CPqAM-FIOCRUZ</b>	<b>111</b>
	<b>Anexo B – Produção Científica Artigo: 1</b>	<b>112</b>
	<b>Anexo C – Produção Científica: Artigo 2</b>	<b>113</b>

# 1 INTRODUÇÃO

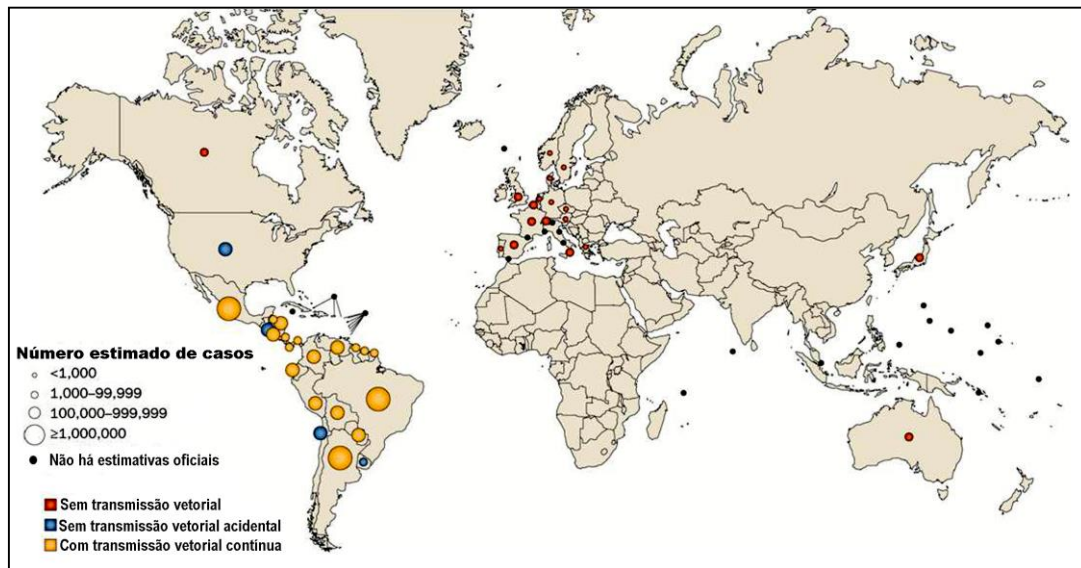
## 1.1 Doença de Chagas: Considerações gerais

Estudos paleoparasitológicos de múmias de 4000 a 9000 anos infectadas com *Trypanosoma cruzi* mostraram que o ciclo da doença de Chagas tem existido na natureza por milhões de anos. Provavelmente, a interação entre o agente etiológico e o hospedeiro humano iniciou-se quando humanos invadiram o ambiente selvagem, ou quando os vetores invadiram o domicílio humano (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014). Apesar da interação entre o *T. cruzi* e os humanos ocorrer desde a antiguidade, somente em 1909 a doença viria a ser descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que descreveu detalhadamente todo o ciclo biológico do parasito e manifestações clínicas da doença (CHAGAS, 1909; RASSI Jr., et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença de Chagas acomete cerca de 7 - 8 milhões de pessoas do sudeste dos Estados Unidos ao nordeste do Chile e da Argentina. A doença afetando 22 países e 14 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (Figura 1) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

Na 63ª Assembleia Mundial da Saúde, ocorrida em 2010, foi aprovada a resolução WHA 63.20, que destacou a gravidade da doença de Chagas e a importância de controlar todas as suas formas de transmissão tanto em países endêmicos como não endêmicos. A presença crescente do mal de Chagas nestes últimos deve-se principalmente à imigração e outras vias de transmissão (transfusão de sangue e de órgãos transplante). Adicionalmente, o reaparecimento da doença em países endêmicos, têm sido um dos principais focos de organizações de saúde nos últimos anos exigindo medidas de diagnóstico e tratamento mais enérgicas para conter o avanço da doença (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; SCHMUNIS; YADON, 2010).

**Figura 1-** Distribuição global de indivíduos infectados com *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Adaptado de Ribeiro et al. (2012).

**Legenda:** Estimativa oficial entre 2006 - 2009.

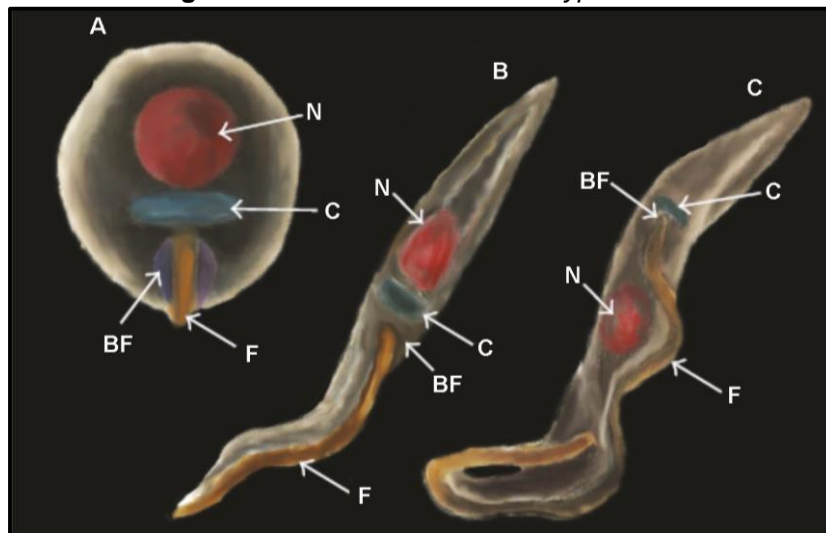
## 1.2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta várias cepas com características morfológicas, fisiológicas, infectividade, virulência e patogenicidade distintas (JUNQUEIRA et al., 2010). No entanto, durante seu ciclo biológico, o parasito apresenta três estágios de desenvolvimento os quais são comuns a todas as cepas. Estes estágios de desenvolvimento se diferenciam pela forma, metabolismo e capacidade replicativa, e representam uma forma de adaptação ao meio extra- e intracelular nos hospedeiros invertebrados ou vertebrados (Figura 2) (JIMENEZ, 2014).

No intestino médio do inseto vetor o *T. cruzi* se encontra na forma epimastigota replicativa, a qual apresenta corpo fusiforme e o cinetoplasto, uma região especializada na qual se encontra o DNA mitocondrial, em forma de bastão localizado anterior ao núcleo. A emergência do flagelo nestas formas se dá lateralmente ao corpo do parasito (Figura 2a). A forma tripomastigota, encontrada na porção final do intestino do inseto vetor e na corrente circulatória do hospedeiro mamífero, constitui a forma infectiva e apresenta corpo delgado, cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, com o flagelo emergindo nesta região, se estendendo lateralmente à bolsa flagelar e aderindo ao longo do corpo do parasito, tornado-se livre na região anterior (Figura 2b). A forma amastigota, responsável pela patogênese da doença de Chagas, apresenta corpo arredondado,

sem um flagelo aparente e cinetoplasto em forma de bastão na região anterior ao núcleo (Figura 2c) (TEXEIRA et al., 2012).

**Figura 2-** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



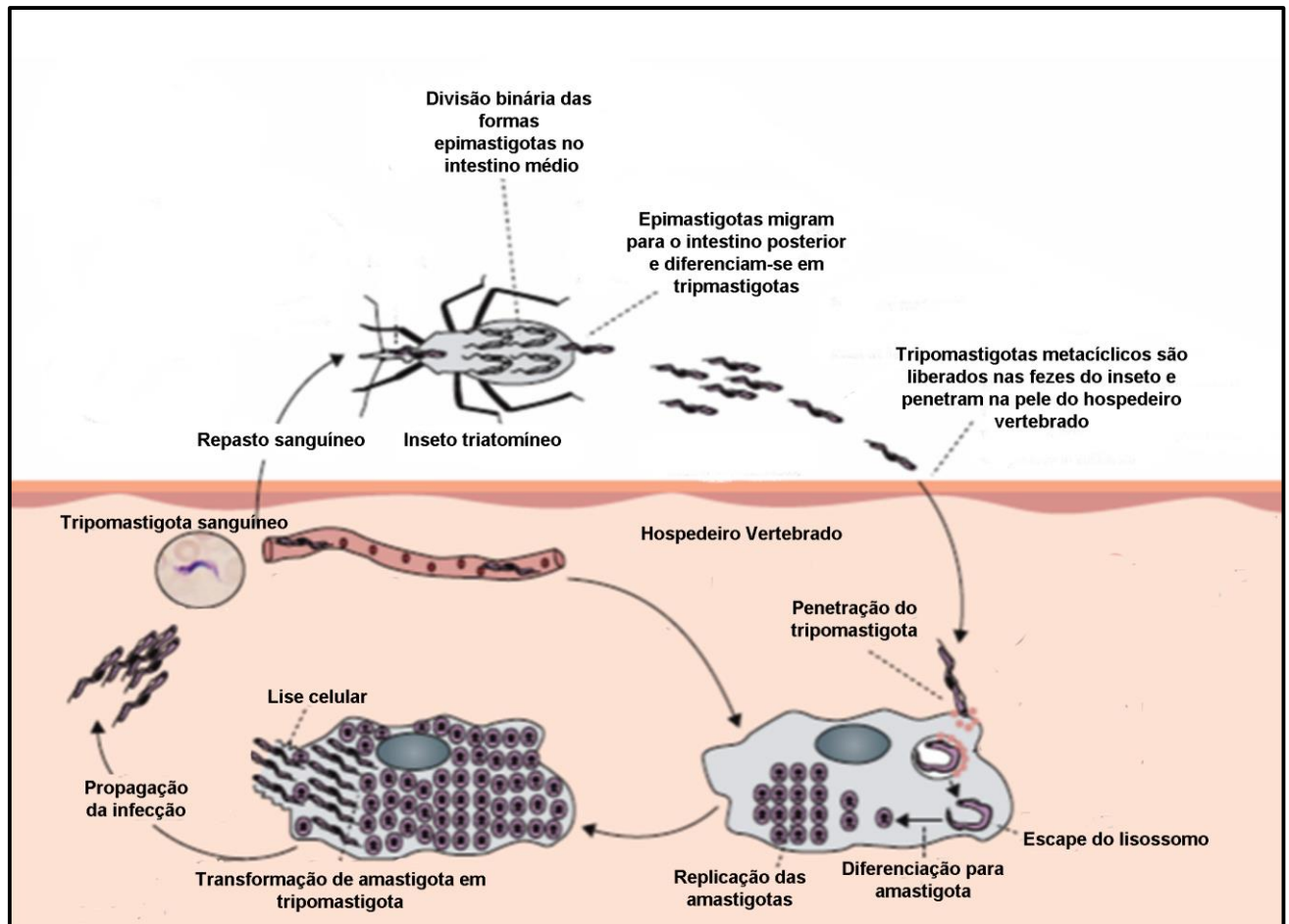
**Fonte:** Pench-Canul et al. (2017).

**Legenda:** Diferentes estágios evolutivos do *Trypanosoma cruzi*: (A) amastigota; (B) epimastigota; e (C) tripomastigota. N – núcleo; C – cinetoplasto; F- flagelo; BF – bolsa flagelar.

O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ter início quando o vetor invertebrado triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro (Família Reduviidae), realizam o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados com formas tripomastigotas. No estômago do inseto, estas formas são lisadas por enzimas digestivas, mas as sobreviventes se diferenciam em formas epimastigotas em poucos dias. Após o processo de diferenciação, as epimastigotas migram para o intestino posterior e se aderem à membrana perimicrovilar do intestino. Esta etapa é necessária para disparar o processo de transformação das formas epimastigotas não-infectivas para formas tripomastigotas metacíclicas infectivas não-replicativas (formas tripomastigotas metacíclicas). Na região posterior do intestino e no reto do triatomíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas são misturadas com urina e fezes, e liberadas junto com os excretas. Ao se alimentar novamente em um hospedeiro vertebrado, formas tripomastigotas metacíclicas altamente infectivas, eventualmente penetram na mucosa ou pela lesão causada pela picada e invadem fibroblastos, macrófagos e células epiteliais no local da inoculação, em um processo que envolve uma ampla variedade de moléculas presentes tanto no parasito quanto nas células do hospedeiro (NOGUEIRA et al., 2015; PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017).

A internalização do parasito se dá através da formação de um vacúolo endocítico, chamado de vacúolo parasitóforo de conteúdo ácido, o qual estimula as formas tripomastigotas a secretar a proteína lítica TcTox (*Trypanosoma cruzi* hemolisina) que, em associação com a ação da *tras*-sialidase, rompe a membrana do vacúolo parasitóforo liberando-as. Uma vez no citoplasma, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas replicativas, que se dividem binariamente inúmeras vezes antes de se diferenciar novamente em formas tripomastigotas sanguíneas, as quais rompem a célula do hospedeiro sendo liberadas para corrente sanguínea. As formas tripomastigotas sanguíneas podem infectar células vizinhas, se disseminar para outros órgãos ou serem ingeridas por outro inseto vetor reiniciando o ciclo (Figura 3). Eventualmente, algumas células contendo formas amastigotas se rompem precocemente liberando estas formas que também possuem a capacidade de infectar novas células (LIMA et al., 2010; JIMENEZ, 2014; MUÑOZ-SARAIVA et al., 2010).

**Figura 3** - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Rassi, Rassi e Marin-Neto (2010).

**Legenda:** Formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas por insetos triatomíneos durante o seu repasto sanguíneo em indivíduos infectados; No tubo digestivo do inseto se transformam em epimastigotas, as quais se dividem intensamente no estômago do inseto; No final do tubo digestivo os epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas; Estas formas são eliminadas nos excretas do inseto durante novo repasto sanguíneo e são transmitidas para o hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas infectam as células e se diferenciam em amastigotas, as quais se dividem intensamente no interior das células infectadas. As amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células e caem na corrente sanguínea onde podem invadir novas células ou serem novamente ingeridas pelo inseto vetor.

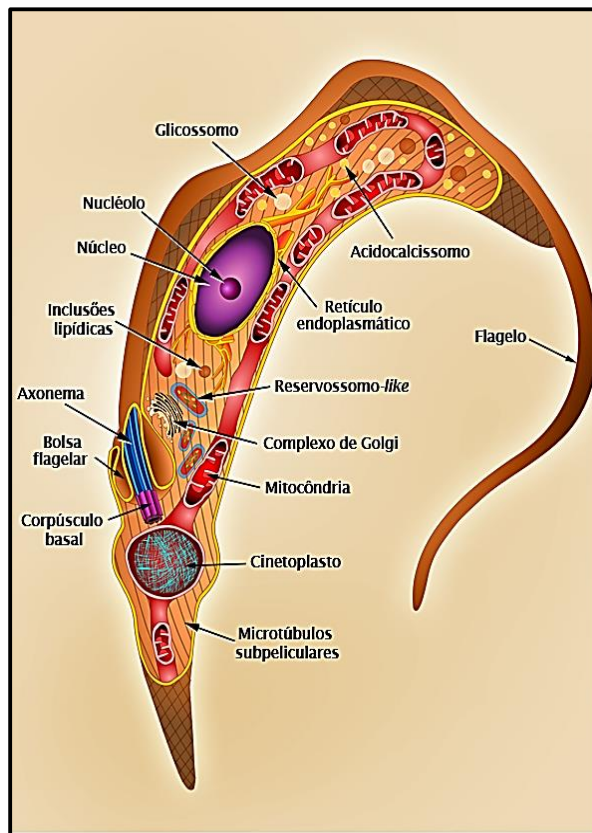
### 1.3 Biologia Celular do *Trypanosoma cruzi*

A busca por novos tratamentos contra as doenças negligenciadas deve se basear em compostos que atuem seletivamente em moléculas e organelas alvos do parasito. Este fato reflete a necessidade de aprofundamento do conhecimento sobre a biologia dos tripanosomatídeos (FIELD et al., 2017).

O *T. cruzi*, como outros tripanosomatídeos, apresentam organelas semelhantes às células dos eucariotos superiores, ao mesmo tempo em que também possuem algumas estruturas citoplasmáticas que lhes são próprias (Figura

4). Baseado-se nos aspectos bioquímicos e fisiológicos do parasito, mesmo organelas como o retículo endoplasmático ou complexo de Golgi, por exemplo, podem apresentar vias metabólicas e funcionais distintas daquelas encontradas nas células de eucariotos superiores. Desta forma, estas diferenças tornam-se importantes na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (FIGALGO; GILLE, 2011; RODRIGUEZ; FALCONE; SZAJNMAN, 2016).

**Figura 4-** Representação esquemática da secção longitudinal da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Texeira et al. (2012).

### 1.3.1 Superfície Celular

A superfície celular do *T. cruzi* possui um papel importante no processo de infecção sendo responsável pela interação com a superfície das células e com a membrana do vacúolo parasitóforo do hospedeiro vertebrado. É também através dela que o parasita se adere às células epiteliais do intestino do hospedeiro invertebrado permitindo sua sobrevivência e diferenciação. O *T. cruzi* apresenta uma membrana plasmática que varia em densidade e distribuição de proteínas, lipídeos e carboidratos de acordo com o estágio evolutivo do parasito bem como de uma

região para outra ao longo do corpo celular (MUCCI et al., 2017). Notavelmente, algumas famílias de proteínas de superfície se destacam durante o processo de infecção da célula hospedeira, fazendo com que sejam consideradas como alvo potencial para tratar ou mesmo prevenir a entrada do parasita nas células (PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017).

Uma grande variedade de moléculas envolvidas na interação do *T. cruzi* à célula hospedeira está presente no glicocálix do parasito, e são agrupadas em várias famílias que incluem mucinas, transialidases (TSs), proteínas integrais de membrana e outras glicoproteínas, como gp82, gp80, gp35/50, e gp85. As mucinas são as principais glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* e seus resíduos de açúcares são capazes de interagir com células de mamífero. Estas proteínas são amplamente distribuídas pelo corpo celular, flagelo e bolsa flagelar nas diferentes formas evolutivas do parasita. As mucinas desempenham um papel importante tanto na proteção e infectividade do parasita, bem como na modulação da resposta imune do hospedeiro (MUCCI et al., 2017).

As trans-sialidases de *T. cruzi* (TS) representam uma ampla família de 1,430 genes e 693 pseudogenes. Esta classe de proteína pode ser dividida em Grupo I, II, III e IV, com base nas suas similaridades e propriedades funcionais. As pertencentes ao Grupo I incluem as proteínas com atividade enzimática de transialidase e/ou neuraminidase. Sabe-se que os tripanosomatídeos são incapazes de sintetizar ácido siálico, dependendo da atividade das TS de superfície para transferir este monossacarídeo, principalmente para as mucinas. Por outro lado, a atividade de neuraminidase ocorre quando ocorre hidrólise de resíduos de ácido siálico de eritrócitos e de proteínas do plasma (NARDI et al., 2016). O processo de sialização em *T. cruzi* é essencial para sua viabilidade e propagação no hospedeiro (PECH-CANUL, MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017). TSs pertencentes ao grupo II compreendem membros das famílias de glicoproteínas GP85, tais como ASP-1, ASP2, TSA-1, Tc85 entre outras, implicadas na adesão e invasão das células hospedeiras. As TSs do grupo III constituem proteínas da superfície de tripomastigotas tais como: CRP, FL160, CEA e TESA, as quais são reconhecidas pelo soro de pacientes chagásicos e funcionam como um mecanismo de proteção do parasita a lise por complemento nesta forma. Finalmente o grupo IV é composto por antígenos de superfície de tripomastigotas, cuja função biológica ainda é desconhecida. Outras famílias de proteínas e glicoproteínas tais como a amastina e



as proteínas de superfície associadas a mucinas ou MASPs (*Mucin-Associated Surface Proteins*) também fazem parte da superfície do *T. cruzi* onde desempenham diferentes funções vitais para a sobrevivência do parasita nos seus hospedeiros (PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017).

Essa diversidade de moléculas na superfície do parasita e seus receptores/ligantes na superfície da célula hospedeira têm sido implicados na versatilidade de mecanismos utilizados pelo *T. cruzi* ao invadir diferentes tipos celulares e evadir do sistema imune (BARRIAS et al., 2013).

### 1.3.2 Mitocôndria e Cinetoplasto

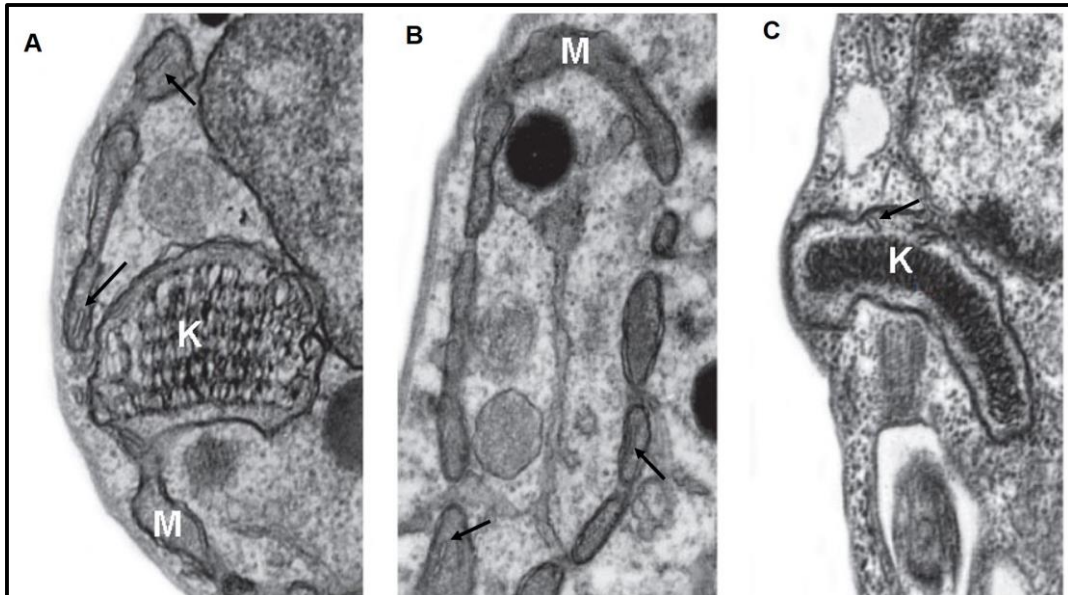
A mitocôndria dos tripanosomatídeos é considerada uma das organelas mais fascinantes destes microrganismos, pois apresenta características únicas tanto na arquitetura quanto nos processos bioquímicos que realiza (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

As características mais marcantes da mitocôndria de tripanosomatídeos, em relação à mitocôndria de eucariotos superiores, são o número de organelas distribuídas no citoplasma, o volume e a forma destas estruturas. Enquanto os eucariotos superiores possuem milhares de mitocôndrias, com forma arredondada e ocupando cerca de 20% do volume celular, os tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria ramificada, que se estende por todo o corpo celular destes protozoários (Figura 5). Esta organela se localiza logo abaixo dos microtúbulos subpelículas e ocupa aproximadamente 12% do volume celular, percentual que pode variar de acordo com o ambiente e os recursos nutritivos disponíveis para a sobrevivência dos protozoários (FIDALGO; GUILLE, 2011; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014; PAES et al., 2011).

Com relação a organização ultraestrutural, a mitocôndria dos tripanosomatídeos tem uma construção clássica, a mesma encontrada em mitocôndrias de eucariotos superiores, apresentando uma membrana externa, o espaço intermembrana e uma membrana interna que forma invaginações denominadas cristas mitocondriais. Contudo, estas são as únicas semelhanças estruturais encontradas entre as organelas dos eucariotos superiores e do tripanosomatídeos. A mitocôndria dos protozoários flagelados apresenta uma estrutura diferenciada: uma região dilatada da matriz mitocondrial, perpendicular ao

eixo do flagelo e próxima ao corpo basal denominada cinetoplasto, no qual se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) (PAES et al., 2011).

**Figura 5** - Ultraestrutura da mitocôndria de *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Menna-Barreto e Castro (2014).

**Legenda:** Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão da mitocôndria (M) de formas tripomastigotas (A) e epimastigotas (B). Cinetoplasto (K), cristas mitocondriais (setas).

A mitocôndria dos protozoários flagelados é muito dinâmica e apresenta uma plasticidade funcional, pois possui a capacidade de modificar sua forma e funções em resposta ao microambiente do hospedeiro. Além disso, mudanças no metabolismo bioenergético podem causar alterações na morfologia da organela (GONÇALVES et al., 2011; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

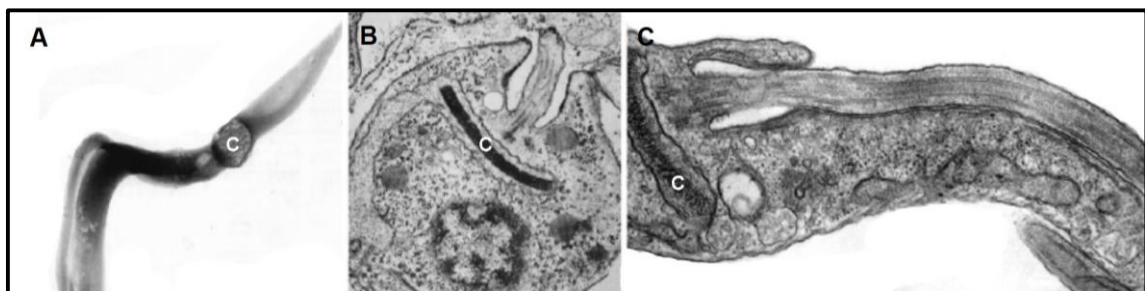
A mitocôndria do *T. cruzi* se distingue por ser única, enquanto as células de mamíferos, por exemplo, apresentam milhares. Neste sentido, o bom funcionamento desta única organela é vital para a viabilidade do parasito (FIDALGO; GUILLE, 2011). A mitocôndria de tripanosomatídeos apresenta uma intensa atividade metabólica, que envolve uma variedade de enzimas e proteínas, como o ácido L-amina e Actil-CoA, que por sua vez se conectam com outras vias metabólicas. Esta organela apresenta um papel importante nas atividades biossintéticas, na manutenção da homeostase redox e no mecanismo para detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAES et al., 2011).

Na pesquisa por candidatos à fármacos contra o *T. cruzi*, a mitocôndria vem sendo apontada como um alvo bastante relevante, e isso tem sido demonstrado

pelos resultados obtidos com diferentes drogas que apresentaram efeito sobre esta organela. Os principais efeitos observados foram alterações funcional e estrutural da mitocôndria, perda da produção de ATP por fosforilação oxidativa e disparo da morte celular programada no parasito (BORGES et al., 2012; FIDALGO; GUILLE, 2011; FONSECA-BERZAL et al., 2016; LECHUGA et al., 2016).

A organização do kDNA no cinetoplasto é a característica mais peculiar dos Tripanosomatídeos, sendo o DNA mitocondrial estruturalmente o mais complexo encontrado na natureza. A morfologia desta estrutura varia de acordo com a forma evolutiva do parasito: formas epimastigotas (Figura 6 C) e amastigotas (Figura 6 B) apresentam um cinetoplasto em forma de barra, enquanto que nas formas tripomastigotas o cinetoplasto é arredondado (Figura 6 A) (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014; PAES et al., 2011).

**Figura 6** - Estrutura e localização do cinetoplasto nas formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** De Souza, (2009).

**Legenda:** Diferentes visualizações do cinetoplasto e organização geral das formas tripomastigota (A), amastigota (B) e epimastigota (C) de *Trypanosoma cruzi*. C – cinetoplasto.

O kDNA é formado por milhares de cadeias de DNA circular, divididos em maxicírculos e minicírculos, concatenados formando uma grande rede que representa aproximadamente 30% do genoma total do parasito (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Cerca de 50 unidades de maxicírculos (com tamanho de 20 – 40 kb, dependendo da espécie) são encontrados na organela, enquanto os minicírculos (0,5 – 10 kb, dependendo da espécie) variam de 5.000 – 10.000 unidades, representando mais de 90% da rede na organela (PAES et al., 2011).

Os maxicírculos codificam produtos gênicos mitocondriais típicos, como os genes envolvidos nos complexos da cadeia respiratória (tais como citocromo oxidase, NADH desidrogenase, e subunidades da ATP sintase) e rRNAs. Todavia, os transcritos primários destes genes precisam ser processados para gerar RNAs

mensageiros funcionais. Para isso, os transcritos dos maxicírculos sofrem uma modificação pós-transcricional via um intrincado processo de edição de RNA. Este processo de edição depende de um modelo, chamado de RNA guia (gRNA), codificado principalmente pelos minicírculos, responsável por 60% dos gRNA sintetizados *de novo*. Esta é a principal função conhecida dos minicírculos (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014).

Alterações no cinetoplasto podem resultar no comprometimento da maquinaria respiratória do parasito, comprometendo o equilíbrio redox e aumentando a geração de ROS, bem como interferir no ciclo celular do parasito (GIRARD et al., 2016; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Zuma et al. (2015) mostraram que o berenil, um agente que se liga preferencialmente ao kDNA, causou mudanças estruturais na organização do kDNA, inibiu a descatenação dos minicírculos, o que levou ao impedimento da replicação do DNA e lesões nesta estrutura. Além disso, parasitos tratados com berenil apresentaram níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e discreta redução no potencial de membrana mitocondrial e no consumo de oxigênio.

### 1.3.3 Núcleo

O núcleo do *T. cruzi* é envolvido por uma membrana porosa e apresenta a cromatina condensada e dispersa pelo nucleoplasma. Apenas a forma epimastigota apresenta um nucléolo bem definido, com aproximadamente  $0,6 \mu\text{m}^2$  e uma alta atividade de síntese de rRNA. Na forma tripomastigota o núcleo é alongado e localizado na porção central do corpo celular, enquanto que nas forma epimastigota e amastigota esta estrutura apresenta uma forma arredondada, e contém aglomerados de cromatina compactada em contanto com a membrana interna do núcleo Outra característica do núcleo do *T. cruzi* é a continuidade entre a membrana externa e o retículo endoplasmático (NEPOMUCENO-MEJÍA, 2016).

O *T. cruzi* realiza a divisão por mitose fechada, e durante esse processo ocorrem mudanças na organização do conteúdo nuclear, o nucléolo fica disperso durante a divisão e reaparece na fase final da divisão celular (ZUMA et al., 2011). Além disso, durante o processo de divisão a integridade do envelope nuclear é mantida e cromossomos não são observados. Inibidores das enzimas topoisomerase I e topoisomerase II, e drogas que se ligam ao DNA têm se

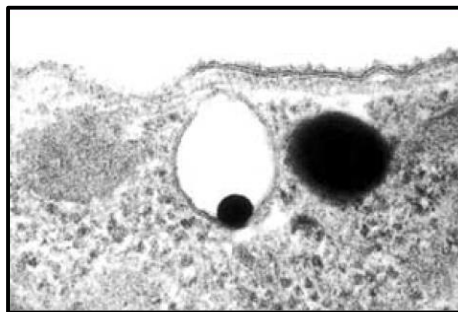
demonstrado candidatos promissores contra o *T. cruzi*, além de bloquear o processo de replicação, estas drogas apresentam ação sobre a viabilidade do parasito (PAES et al., 2011; ZUMA et al., 2011).

#### 1.3.4 Acidocalcisoma

Acidocalcisoma são organelas ácidas presente em bactérias, fungos, algas e protozoários, porém a organela é melhor estudada em tripanosomatídeos parasitas. (DOCAMPO et al., 2015; NIYOGI et al., 2015).

O acidocalcisoma dos tripanosomatídeos apresenta forma esférica e sua localização e quantidade na célula depende da espécie e da forma evolutiva dos protozoários flagelados (Figura 7). No *T. cruzi*, as formas epimastigotas apresentam o acidocalcisoma localizado na periferia do corpo celular, já nas formas tripomastigota a organela se localiza na região anterior. Na forma amastigota o acidocalcisoma está localizado próximo ao citoesqueleto. A forma intracelular do *T. cruzi* vive e se prolifera em um microambiente com baixa concentração de cálcio, por isso apresenta uma maior número de acidocalcisoma em relação as outras duas formas evolutivas (DE SOUZA, 2010).

**Figura 7** - Acidocalcisoma de *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** De Souza (2009).

**Legenda:** Distribuição do acidocalcisoma em formas amastigotas, imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Secções finas do parasito e (B) distribuição pelo corpo celular.

O acidocalcisoma tem como principal função o armazenamento de compostos fosforados (fósforo inorgânico - Pi; pirofosfato inorgânico - PPI; e polifosfato - poliP) e de cátions (cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco e ferro). Esta estocagem em um compartimento intracelular é necessária para reduzir os efeitos osmóticos que poderiam ser causados pela grande quantidade destes compostos no citosol. O polifosfato (poliP) tem um importante papel na adaptação ao estresse,

principalmente nas mudanças de ambiente, e na osmoregulação. Parasitos que contém alta concentração de poliP no acidocalcisoma apresentam uma maior virulência. Em experimento *in vitro* foi observado que a superexpressão de uma pirofosfatase vacuolar solúvel (TcVSPPPase), localizada no acidocalcisoma e no citosol, leva a redução dos níveis de PPI e PoliP, menor resposta ao estresse osmótico e redução da persistência do parasito no tecido de camundongos (DOCAMPO, 2015).

### 1.3.5 Glicossomos

Os glicossomos são estruturas que se assemelham aos peroxissomos das células de mamíferos, os quais contém algumas enzimas da via glicolítica e da via da pentose fosfato. Desta forma, muitas enzimas envolvidas na defesa antioxidante são encontradas na matriz glicossomal, com exceção da catalase, enzima ausente no *T. cruzi* (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2017; PAES et al., 2011). Nos tripanosomatídeos, os glicossomos desempenham um importante papel, já que a maioria das vias glicolíticas ocorre nesta organela. Outras vias, também importantes para a sobrevivência dos tripanosomatídeos, ocorrem nos glicossomos, como por exemplo, fixação de dióxido de carbono, salvamento de purinas e biossíntese *de novo* de pirimidinas, alongamento de ácidos graxo, biossíntese de isoprenóides e esterol (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2017).

### 1.3.6 Inclusões Lipídicas

As inclusões lipídicas, ou corpos lipídicos, são encontradas no citoplasma do *Trypanosoma cruzi* apresentando-se como estruturas esféricas que tem tamanhos variados. Essas estruturas estão envolvidas não por uma unidade de membrana típica, mas por uma monocamada de fosfolípidos. As inclusões lipídicas são organelas dinâmicas, capazes de modificar suas estruturas de acordo com a atividade celular, a maioria delas são eletróluscentes enquanto outras apresentam densidade média (DE SOUZA, 2009; TOLEDO et al., 2016). Inicialmente acreditava-se que as inclusões lipídicas, encontradas principalmente na forma tripomastigota do parasito, seriam utilizadas como reserva energética (FIGUEIREDO et al., 2000).

Entretanto, as inclusões lipídicas podem desempenhar outras funções na célula do parasito.

Durante a infecção de células de mamífero por formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o parasito aumenta o número e o tamanho dos corpos lipídicos, alterando a elétrton densidade desta organela na visualização por microscopia eletrônica de transmissão. Estas modificações na organela podem estar associadas a diferenças na composição lipídica, estágio de formação da inclusão lipídica, e/ ou a proporção de lipídios/fosfolipídios dentro das inclusões lipídicas (TOLEDO et al., 2016).

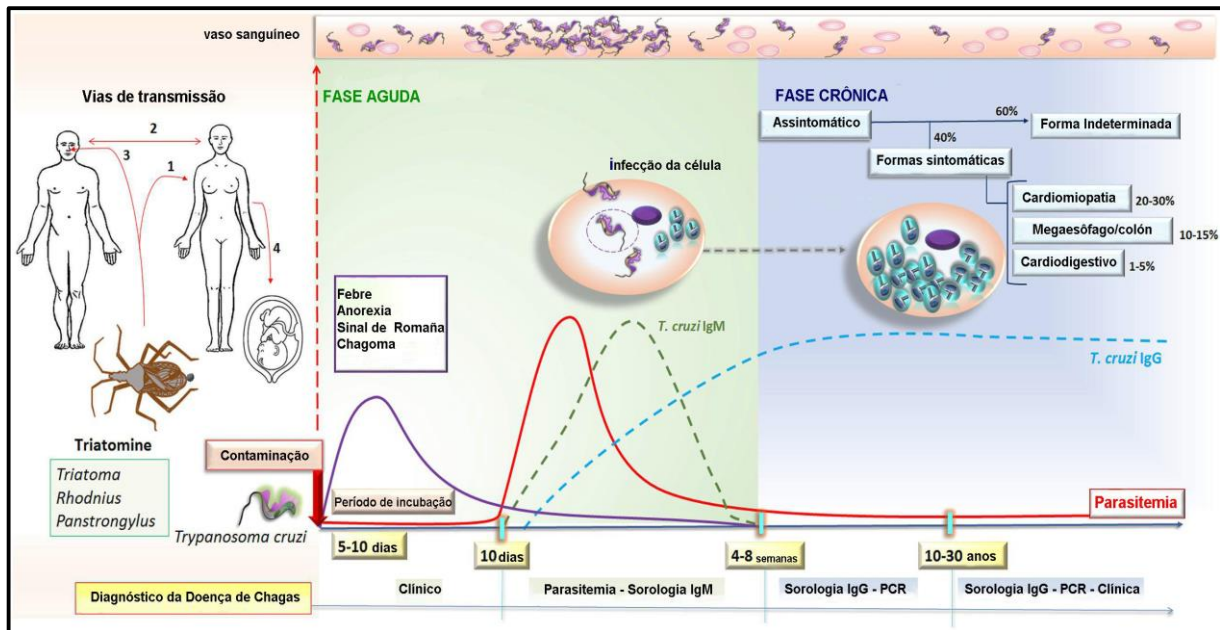
Toledo et al. (2016) mostraram que formas tripomastigotas aumentam o número de inclusões lipídicas no citoplasma, bem como alteram sua composição, em resposta à interação parasito-hospedeiro e ao estímulo com ácido araquidônico exógeno, molécula precursora de mediadores inflamatórios (eicosanóides). O ácido araquidônico é incorporado às inclusões lipídicas do parasito, e estas organelas servem como locais de síntese da PGE<sub>2</sub>, uma potente prostaglandina conhecida por inibir vários mecanismos da resposta imune inata e adquirida. No entanto, o papel da PGE<sub>2</sub> produzida pelo parasito na patogênese da doença de Chagas é uma questão ainda em aberto (TOLEDO et al., 2016).

#### **1.4 Patologia da Doença de Chagas**

A patologia da doença de Chagas é caracterizada por fases clínicas e imunológicas distintas: fase aguda, indeterminada e crônica (Figura 8). Após a infecção, as formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea e no sistema linfático se disseminam no organismo infectando, principalmente, tecidos com altos níveis de suprimento de sangue e oxigênio. Desta forma, os locais que apresentam as maiores taxas de infecção pelo *T. cruzi* são os músculos esqueléticos, liso e cardíaco, células fagocíticas mononucleares e tecido adiposo (BONNEY; ENGMAN, 2015; LEWIS; KELLY, 2016). Este último tem sido apontado como um reservatório no qual o parasito pode persistir em estado latente e evitar os mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro, conseqüentemente o tecido adiposo poderia ser também um sítio de reativação da infecção (MORROT et al., 2016).



**Figura 8-** Evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* e da patologia da doença de Chagas



**Fonte:** Lidani et al. (2017).

**Legenda:** A infecção pode ocorrer pela via vetorial (1), transfusão sanguínea ou transplante de órgão, via oral (3) ou congênita (4). O período de incubação dura de 5 a 10 dias, a qual é seguida pela fase aguda da doença que dura de 4 a 8 semanas. Nesta fase, o hospedeiro apresenta formas tripomastigotas circulantes, as quais podem ser visualizadas em exames de sangue, e anticorpos IgM anti-*T. cruzi* podem ser detectados após 10 dias de infecção. A maioria dos pacientes é assintomática ou apresentam sintomas não específicos, tais como febre e anorexia. Estes indivíduos podem desenvolver também inchaço e inflamação no local de inoculação na pele ou conjuntiva, caracterizando o chagoma de inoculação e sinal de Romaña, respectivamente. A fase crônica começa uma vez que a parasitemia cai abaixo dos níveis detectáveis pela microscopia, entre 4 a 8 semanas após o estabelecimento da infecção. Desta forma, o diagnóstico é feito pela detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e testes moleculares. Na fase crônica, a maioria das pessoas infectadas entra em uma fase assintomática prolongada, denominada de forma indeterminada, e não irão desenvolver a forma clínica da doença de Chagas. No entanto, após 10-30 anos cerca de 30-40% dos indivíduos cronicamente infectados irão apresentar manifestações clínicas incluindo as formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva.

A fase aguda da doença de Chagas dura cerca de 4 a 8 semanas e durante todo esse período o *T. cruzi* pode ser detectado no sangue. A maioria dos indivíduos infectados apresentam sintomas inespecíficos, comuns com outras enfermidades, ou nenhum sintoma, o que dificulta o início precoce do tratamento e aumenta o número de casos de doença de Chagas subnotificados. Os sinais e sintomas mais comuns são anorexia, diarreia, sonolência, linfadenopatia e inchaço próximo ao local onde ocorreu a infecção (sinal de romaña ou chagoma de inoculação). Em apenas 1% dos indivíduos infectados, principalmente crianças, a miocardite é clinicamente aparente e possível de ser detectada. A maioria dos pacientes se recupera das manifestações clínicas desenvolvidas, mas 1-5% dos indivíduos evoluem para a forma grave da doença de Chagas, na qual ocorrem complicações fatais como insuficiência cardíaca



aguda, arritmias fatais e meningoencefalite fulminante (BONNEY; ENGMAN, 2015; BENZIGER; CARMO; RIBEIRO, 2017).

Nesta fase clínica, os danos aos órgãos infectados são resultados da intensa parasitemia e parasitismo tecidual, acompanhado da intensa resposta imune ao parasito (RASSI Jr; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Em análises histopatológicas de tecido cardíaco é possível observar uma intensa resposta inflamatória próxima as células do tecido que foram lisadas pela infecção, tanto no lado direito quanto do lado esquerdo das câmaras cardíacas. Os principais achados histopatológicos no coração são miocardite intensa e difusa, necrose de cardiomiócitos (necrose por coagulação), edema intersticial, vasculite, dilatação de capilares sanguíneos e infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares (RASSI Jr; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Na fase aguda a resposta inflamatória do hospedeiro é intensa, o sistema imune ativa a produção de citocinas Th1 pró-inflamatórias, como TNF e IFN- $\gamma$ , e ativa a produção de anticorpos com objetivo de controlar a parasitemia e o parasitismo tecidual (PÉREZ – MOLINA; MOLINA, 2017).

Indivíduos imunocompetentes que conseguem controlar a infecção evoluem para a fase crônica da doença de Chagas. Cerca de 60-70% dos indivíduos evoluem para a forma clínica indeterminada, que se caracteriza pela ausência de sinais e sintomas, sendo por isso também conhecida como assintomática. Entretanto, estima-se que, em 10-30 anos após a infecção, 30 a 40% das pessoas cronicamente infectadas poderá apresentar alguma manifestação clínica, tais como cardiopatia (20-30%), comprometimento do sistema digestivo (10-15%) ou ambos (1-5%) (LIDANI et al., 2017).

Nos indivíduos que desenvolvem a forma cardíaca da doença de Chagas, a cardiomiopatia é caracterizada por um discreto infiltrado inflamatório, parasitemia muito baixa, baixo parasitismo tecidual e extensas áreas de reparação e fibrose. Técnicas histopatológicas clássicas normalmente não conseguem detectar o parasito, restando apenas técnicas imunohistoquímicas e a reação em cadeia da polímerase (PCR) como métodos para detecção do *T. cruzi* em amostras de biópsia e autopsia de pacientes com a doença de Chagas (RASSI Jr; MARIN-NETO; RASSI, 2017).

A patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica ainda não é completamente compreendida, todavia estudos propõem alguns mecanismos que contribuem para a progressão da doença. Os mecanismos que causam as lesões no

coração incluem a lise de cardiomiócitos pelo parasito, o qual é acompanhado do dano provocado pela resposta imune específica contra o parasito, efeitos da resposta imune não específica sobre as células cardíacas, a microvasculopatia que provoca isquemia e inflamação, e a autoimunidade que pode ser resultante de vários mecanismos patogênicos. Embora muitos mecanismos estejam envolvidos no dano tecidual, a lise de células do hospedeiro pelo *T. cruzi* é o mais importante para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica (BONNEY; ENGMAN, 2015; BENZIGER; CARMO; RIBEIRO, 2017) (Figura 9).

A intensa infiltração de células mononucleares e a liberação de citocinas que danificam o tecido cardíaco também contribuem para o rompimento mecânico do miocárdio. As citocinas tem um papel decisivo no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. A injúria tecidual mediada pela resposta imune é provavelmente disparada pela persistência do *T. cruzi* no tecido. A infecção por *T. cruzi* pode causar dano ao miocárdio via a indução de estresse oxidativo. O parasito tem a capacidade de induzir danos aos complexos respiratórios da mitocôndria de células hospedeiras infectadas, conseqüentemente ocorre a diminuição da geração de ATP mitocondrial e deficiência do mecanismo de defesa antioxidante da célula como, por exemplo, reduzindo os níveis de superóxido desmutase. A deficiência na defesa antioxidante leva ao aumento do nível de biomarcadores de injúria oxidativa, os quais estão correlacionados com a severidade da doença de Chagas crônica (BONNEY; ENGMAN, 2015).

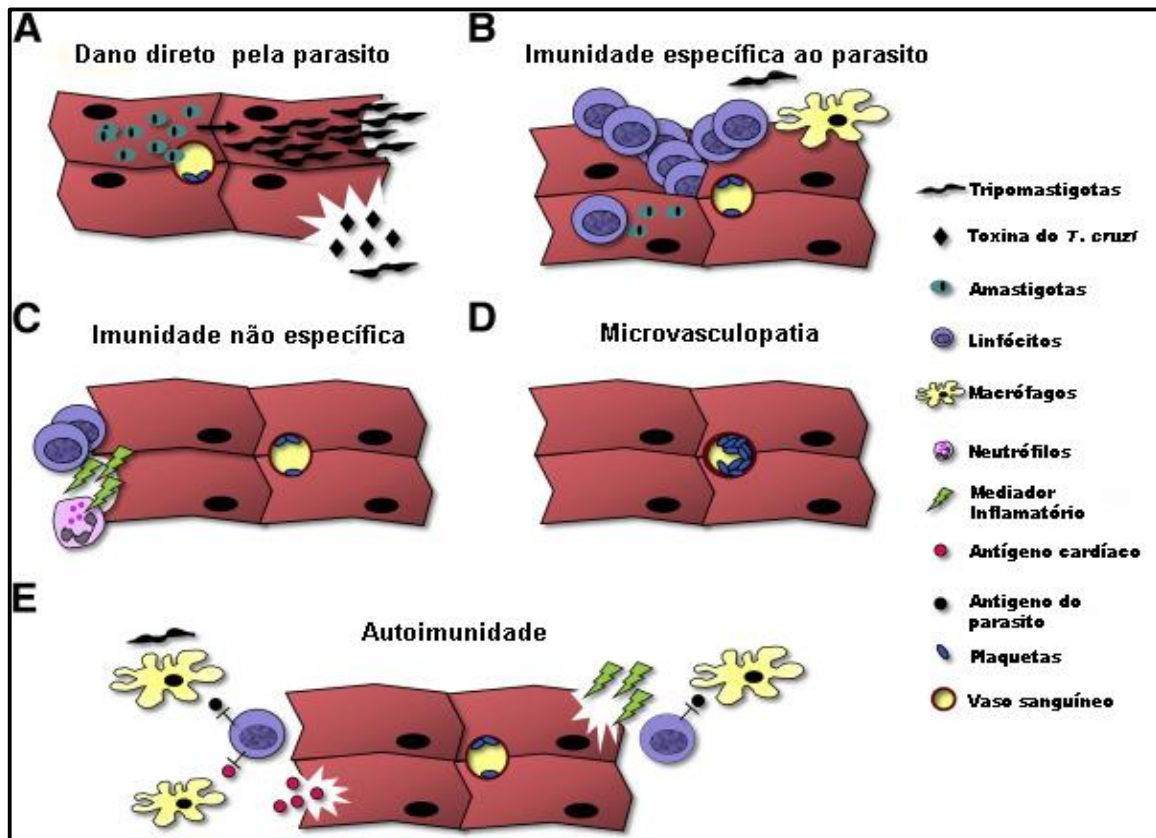
Um estudo realizado por Ferreira et al. (2014) comparou a expressão de microRNAs de tecido miocárdico, envolvidos no controle da hipertrofia do tecido cardíaco e no crescimento de celular de miofibroblastos, de pacientes com cardiopatia chagásica crônica com pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática, e pacientes com coração transplantado. Dos nove microRNAs investigados, os pacientes chagásicos apresentaram cinco microRNAs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, and miR-208b) significativamente alterados, e a expressão de outros três microRNAs estavam significativamente reduzidas. O estudo concluiu que as alterações na expressão dos microRNAs avaliados potencialmente influenciam a patogênese da doença de Chagas (FERREIRA et al., 2014).

O dano em cardiomiócitos por substâncias tóxicas liberadas pelo *T. cruzi* ainda não está totalmente elucidado. Na realidade, nenhuma toxina foi identificada no *T. cruzi*, e as substâncias que o parasito produz pode ter algum efeito tóxico em

células de cultura. Algumas dessas substâncias seriam as hemolisinas TC – Tox e LYT1, no entanto é pouco provável que estas moléculas, ou outras similares, desempenham um papel significativo na patogênese da doença de Chagas (BONNEY; ENGMAN, 2015).

O mecanismo de dano tecidual causado pela resposta autoimune tem sido amplamente discutido e, embora não haja um consenso se a autoimunidade é a principal responsável pelas consequências da doença, muitos pesquisadores acreditam que a autoimunidade contribui ou agrava a patogênese da doença de Chagas. A resposta autoimune envolve a ativação policlonal, mimetismo molecular entre algumas proteínas do parasito e do hospedeiro, ou epítomos compartilhados entre o hospedeiro e o parasito (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017; RASSI Jr; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Estudos demonstraram que a antígeno B13 do *T. cruzi* promove uma resposta cruzada de células T, devido a sequência homóloga de parte desta proteína com o hexapeptídeo pertencente à cadeia pesada da miosina cardíaca humana. Além disso, anticorpos contra a proteína B13 estavam presentes em paciente com cardiomiopatia chagásica severa, mas raramente detectada em pacientes assintomáticos (RODELES et al., 2016).

**Figura 9** - Mecanismos envolvidos na miocardite provocada pela infecção por *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Bonney e Engman (2015).

**Legenda:** Mecanismos pelos quais o *Trypanosoma cruzi* provoca danos cardíacos. **A:** Dano cardíaco causado pela lise de cardiomiócitos por formas tripomastigotas que se diferenciaram de formas amastigotas (**alto do painel**) ou pela liberação de protudos tóxicos (agentes líticos) por formas tripomastigotas (**parte inferior do painel**). **B:** Resposta imune específica ao parasito pode contribuir para patologia cardíaca devido a destruição ou deslocamento de cardiomiócitos, seguido pela infiltração celular e fibrose. **C:** Dano inespecífico causado pela resposta imune inata, ativação de granulócitos, e citotoxicidade mediada por anticorpo podem causar injúria aos cardiomiócitos. **D:** Microvasculopatia levando a isquemia, incluindo obstrução por agregação plaquetária. **E:** Autoimunidade induzida pelo parasito ativada por moléculas miméticas entre o parasito e auto-antígenos (**à esquerda do painel**) ou a ativação de células T autorreativas após a lise celular por *T. cruzi* (**à direita do painel**).

### 1.5 Resposta Imune na doença de Chagas

O processo de internalização celular do *Trypanosoma cruzi* apresenta uma característica heterogênea que depende da cepa do parasito, estágio e o tipo de célula hospedeira infectada. O *T. cruzi* desenvolveu a capacidade de modular negativamente mecanismos de autopreservação da célula hospedeira, como a resposta imune, concebidos para impedir o parasitismo. Além disso, o parasito utiliza também mecanismos próprios de evasão da resposta imune e supressão da apoptose da célula hospedeira através da modulação positiva da expressão de receptores da superfície celular, fatores de secreção e moléculas de sinalização. A

entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira envolve vários estágios: o contato inicial parasito/célula hospedeira, adesão do *T. cruzi* a célula hospedeira, e a indução precoce da resposta imune (BASSO, 2013).

Além da compreensão dos mecanismos de interação celular entre o parasito e o hospedeiro, vários estudos têm evidenciado que a evolução ou resistência a infecção, bem como o desenvolvimento de reações inflamatórias na cardiopatia chagásica são influenciados tanto pelo repertório genético do hospedeiro quanto do parasito, com participação importante da imunidade inata e a imunidade adquirida (PADILLA et al., 2009). Assim, um melhor entendimento da interação entre parasita/hospedeiro e dos mecanismos envolvidos na resposta imune contra *T. cruzi* é essencial para o desenvolvimento de novas terapias e vacinas (KAYAMA; TAKEDA, 2010; JUNQUEIRA et al., 2010).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos e é mediada pelos fagócitos, incluindo os macrófagos e as células dendríticas (*Dendritic cells* – DC). Este sistema tem a capacidade de discriminar entre o próprio e agente patogênico, por meio de receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs), os quais são codificados de uma linhagem germinal. Estes receptores reconhecem o patógeno através de moléculas padrão (*pathogens-associated molecular pattern* - PAMPs) associadas a estes, que são moléculas conservadas e compartilhadas por vários microrganismos, incluindo *T. cruzi*, capazes de ativar a resposta imune. A imunidade adquirida está envolvida na eliminação de agentes patogênicos na fase tardia de infecção, bem como a geração de memória imunológica. Vários estudos têm comprovado que a resposta imune inata regula a ativação da resposta adaptativa para o perfil Th1 ou Th2 (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

A resposta imune ao *T. cruzi* é altamente complexa e envolve componentes efetores e reguladores. A resposta imune adaptativa do hospedeiro contra o *T. cruzi* já é bem caracterizada, com o envolvimento de células Th1 CD4+ e células T CD8+ que reconhecem antígenos específicos do parasito (BASSO, 2013).

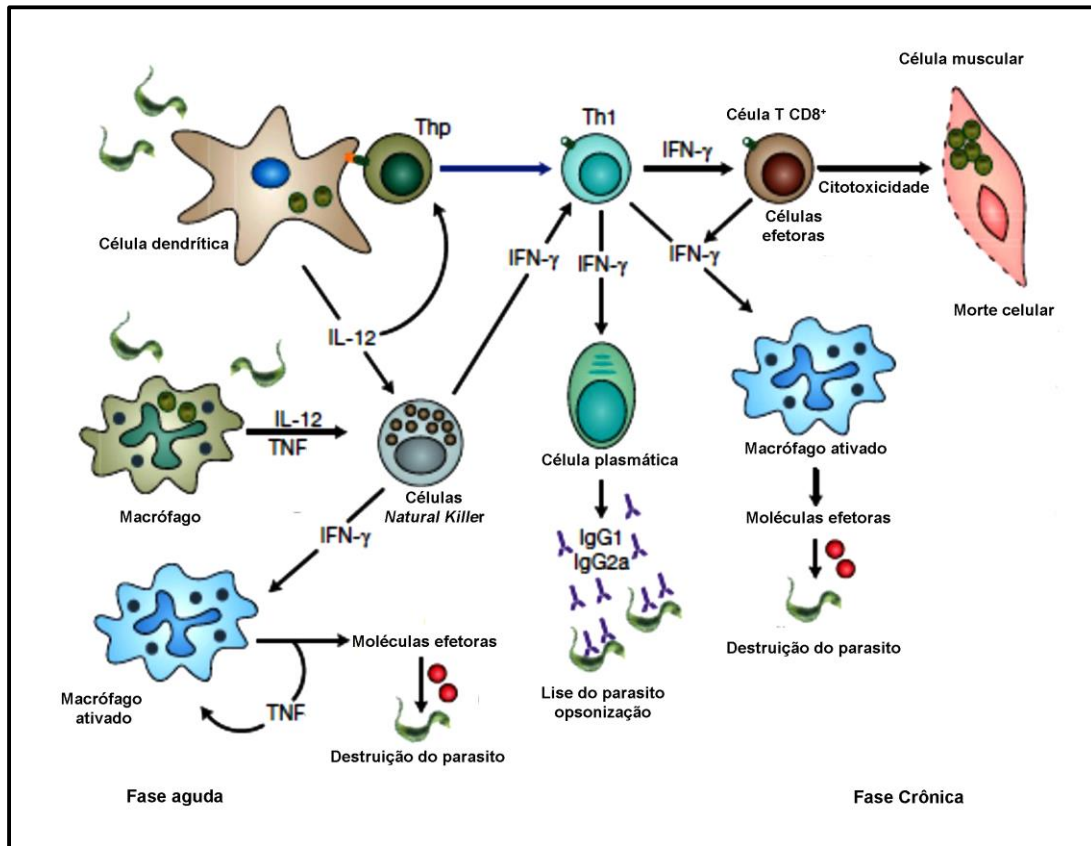
O sistema imune intato tem um papel fundamental em dois importantes aspectos da doença: o controle da replicação do parasito, e conseqüente propagação a outros tecidos do hospedeiro, e iniciar a resposta inflamatória no tecido infectado, sendo está resposta a principal causa de danos teciduais e disfunção de órgãos (JUNQUEIRA et al., 2010). Nos primeiros dias da infecção, o *T.*

*cruzi* induz uma intensa resposta inflamatória, a qual desempenha um papel importante na patogênese da doença. Estudos têm demonstrado que os antígenos do *T. cruzi* induzem a ativação de células *Natural Killer* (NK), as quais produzem e secretam citocinas e quimiocinas, e a expressam maiores níveis de receptores co-estimulatórios, com o objetivo de estimular a endocitose e eliminação do parasito por meio da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27, IFN- $\gamma$  e TNF são essenciais para ativação de outras células inflamatórias, e para o controle e morte do parasito (CUNHA-NETO et al., 2009).

Inicialmente, a IL-12, produzida pelas células NK, age de maneira autócrina induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimula mais produção de IL-12, e TNF e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, contribuindo assim para a eliminação do parasito e ativação da resposta imune adaptativa. Ao mesmo tempo, tanto células NK quanto macrófagos produzem citocinas regulatórias, como IL-10, e anti-inflamatórias, como IL-4, sugerindo que a presença destas citocinas seja necessária para reduzir os danos associados a um estímulo exacerbado da resposta imune. Desta forma, a fim de eliminar o *T. cruzi* do hospedeiro é necessário um equilíbrio entre a resposta imune mediada por Th1 e Th2 (BASSO, 2013; SATHLER-AVELAR et al., 2009).

As células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que as células Th2 tem uma função anti-inflamatória e estão envolvidas na resposta mediada por anticorpos. A principal citocina da resposta Th2 envolvida na resposta contra o *T. cruzi* é IL-4. Esta citocina induz a expansão de células Th2 e de quantidades elevadas de IL-10. Conseqüentemente, a regulação da resposta celular ocorre devido a uma redução na ativação de DC e da atividade microbicida dos macrófagos. Ainda, IL-4 participa da indução do fator transformação do crescimento, TGF- $\beta$ , responsável por regular a atividade de células apresentadoras de antígenos e aumentar a susceptibilidade da infecção por *T. cruzi* (BASSO, 2013) (Figura 10).

**Figura 10** – Resposta Imune Inata e Adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Adaptado de Junqueira et al. (2010).

**Legenda:** Na fase inicial de invasão do *T. cruzi*, a imunidade inata atua como primeira barreira. As células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, o TNF e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras, que controlam a replicação do parasito. Ao mesmo tempo, as células imunes, interligam a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e a expansão clonal de células T auxiliares 1 (Th1) CD4+, células T CD8+ e células B. O IFN- $\gamma$  produzido por células T CD4+ Th1 ou T CD8+ ativa os mecanismos efetores em macrófagos para destruir ambas as formas amastigotas e tripomastigotas, enquanto que a atividade citotóxica exibida por células T CD8+ destrói as células que contêm amastigotas intracelulares. Os anticorpos produzidos pelas células B iniciam a ativação do sistema complemento e aumentam a fagocitose da forma tripomastigota extracelular ou facilitam a fagocitose de parasitos opsonizados com IgG. Abreviaturas: IFN - interferon; IL - interleucina; NK - Natural Killer; THP - precursor da célula Th; TNF - fator de necrose tumoral.

O receptor TLR (Toll-like receptor) é uma proteína transmembrana localizada na membrana plasmática e na membrana do retículo endoplasmático (SILVA et al., 2010). Proteínas ancoradas via GPI e Tc52 de *T. cruzi* parecem ativar respostas pró-inflamatórias através do receptor TLR2. Outros receptores TLRs tais como TLR-4 e TLR-9 têm sido implicados no reconhecimento de PAMPs e na ativação da resposta imune inata (CARDILLO et al., 2015).

Outras vias independentes de TLR também têm sido apontadas como igualmente importantes na resposta imune inata contra *T. cruzi* (AOKI et al., 2011). Há cerca de uma década, uma nova família de receptores PRRs intracelulares têm

emergido como uma importante via na resposta imune inata que inclui os receptores NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein*) (SILVA et al., 2010). Estes receptores são expressos em DG e monócitos/macrófagos e desempenham um importante papel na resposta imune inata (CHEN; PEDRA, 2010).

A família NLR inclui as proteínas NODs (*nucleotide-binding oligomerization domain*), NALPs (*NACHT-, LRR- e PYD domain-containing proteins*), IPAF (*ICE-protease activating factor*), e NAIPs (*neuronal apoptosis inhibitor factors*), sendo os receptores NOD-like os primeiros a serem caracterizados (SILVA et al., 2010). Silva et al. (2010) mostraram a susceptibilidade de camundongos NOD-1-/- infecção com *T. cruzi*, enquanto que o mesmo não foi observado em camundongos NOD-2-/. Estes achados indicam que NOD1 é crucial para o reconhecimento de *T. cruzi*. No entanto, componentes celulares de *T. cruzi* que possam se ligar a NOD1 ainda não foram identificados (KAYAMA; TAKEDA, 2010). Além de NOD 1, outros receptores NLR estão envolvidos no reconhecimento e disparo da resposta imune inata frente ao *T. cruzi*. Esta classe de receptores é responsável por formar uma plataforma multiprotéica, denominada inflamassomas, que é capaz de clivar e ativar pró - interleucina 1 $\beta$  em interleucina 1 $\beta$  e controlar a infecção contra o *T. cruzi* (SILVA et al., 2013).

As células T são o principal grupo celular encontrado no infiltrado inflamatório no miocárdio de pacientes portadores da doença de Chagas. Neste sentido, células efetoras T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> apresentam um importante papel na defesa de longa duração. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são responsáveis pela secreção da citocinas que estarão envolvidas na polarização da resposta imune Th1 e Th2. As células T CD8<sup>+</sup> são responsáveis por identificar antígenos do parasito em cardiomiócito parasitado, e conseqüentemente destruir o parasito, controlando e eliminando a carga parasitária tecidual. Deficiências no recrutamento de células CD8<sup>+</sup> ou a inibição de suas funções estão fortemente associados a susceptibilidade ao *T. cruzi* (BASSO, 2013; MACHADO et al., 2012).

A infecção por *T. cruzi* induz uma ativação policlonal dos linfócitos B, resultando em uma hipergamaglobulinemia. Nos estágios iniciais da infecção, os linfócitos B produzem anticorpos não específicos contra o *T. cruzi*, somente produzindo uma resposta específica ao fim da fase aguda da doença. Diferentes imunoglobulinas estão envolvidas na resposta imune contra o *T. cruzi*, e os mecanismos de ação destas moléculas são fixação de sistema complemento,



aglutinação e citotoxicidade. A principal imunoglobulina envolvida na resposta contra *T. cruzi* é a IgG2, sendo que esta IgG é capaz de reconhecer uma quantidade maior de antígenos do parasito, além de formar microagregados que fixam o sistema complemento e aumenta a opsonização e citotoxicidade (BASSO, 2013).

## 1.6 Quimioterapia da Doença de Chagas

A história do desenvolvimento de quimioterápicos contra a doença Chagas inicia-se logo após a descoberta da doença. Em 1909, os primeiros compostos utilizados no tratamento da doença foram arsênico (atoxyl), corante rosanilina (fucsina), antimoniais e cloreto de mercúrio, sendo que nenhuma destas substâncias apresentaram resultados efetivos, eliminação do parasito do organismo e baixo efeito tóxico. Entre os anos de 1950 e 1960 vários compostos contendo o radical nitrofurano foram testados contra o *T. cruzi*, porém os resultados controversos e a significância clínica questionável levou a descontinuação do uso dessas drogas (SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014).

Entre os anos de 1960 e 1970 dois compostos nitro-heterocíclico, Nifurtimox e Benznidazol (Bz), foram desenvolvidos, e são utilizados até hoje no tratamento da doença de Chagas. A resposta ao tratamento com estas drogas é diretamente afetada por determinadas condições, tais como duração do tratamento, idade, localização geográfica do paciente, a cepa circulante do parasito, entre outros. O baixo efeito tripanocida, surgimento de cepas resistentes e os severos efeitos colaterais do Nifurtimox levaram o Ministério da Saúde do Brasil a interromper seu uso, restando apenas o Bz como medida terapêutica (LEPESHEVA, 2013; SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014).

Uma grande porcentagem dos pacientes com a doença de Chagas aguda (80 - 90%) responde bem ao tratamento com o Bz, principalmente as crianças as quais são mais tolerantes à droga. Já a eficácia do Bz na forma crônica da doença ainda é controversa. Ainda assim, especialistas sugerem que o fármaco deve ser administrado em pacientes crônicos, seguindo alguns critérios de exclusão: pacientes com idade acima de 50 ou 55 anos e indivíduos com cardiomiopatia avançada e irreversível. Para os pacientes que não se incluem nestes critérios, o Bz é considerado uma droga segura para ser administrada, uma vez que nenhuma morte foi atribuída ao seu uso. Além disso, estudos tem demonstrado que o Bz é

capaz de retardar a progressão da cardiopatia, bem como reduzir a mortalidade entre pacientes tratados em comparação com pacientes não tratados. Não obstante, os efeitos adversos provenientes do uso do Bz é um ponto desfavorável do fármaco. Os efeitos colaterais são tão desagradáveis, que o monitoramento e intervenções de equipes de saúde são necessários para manter o paciente em tratamento (BERN, 2015; CHATELAIN, 2015).

Os efeitos adversos mais comuns do Bz podem ser separados em três classes: (i) hipersensibilidade, tais como dermatites, edema periorbital (inchaço das pálpebras) ou generalizada, febre, linfadenopatia, dores musculares e nas articulações; (ii) depressão da medula óssea que inclui neutropenia, agranulocitose e trombocitopenia; (iii) neuropatia periferal, o qual apresenta parestesia (sensação de formigamento) e polineurite (SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014).

O mecanismo de ação do Bz se dá pela transformação biológica do fármaco em metabólitos capazes de se ligar principalmente com tióis de baixo peso molecular envolvidos na via da glutatona e tripanotona (KEENAN; CHAPLIN, 2015). Os metabólitos gerados são responsáveis pela toxicidade do Bz, e se tornam um problema ainda maior quando a droga é administrada em altas doses (KEENAN; CHAPLIN, 2015). Como consequência dos efeitos adversos e da eficácia questionável, a descoberta e desenvolvimento de novas drogas, seguras e eficazes, contra a as fases aguda e crônica da doença de Chagas é uma necessidade urgente (CHATELAIN, 2015).

A Organização Pan-americana de Saúde (PAHO/ WHO) propôs requisitos que devem ser considerados na pesquisa por drogas contra a doença de Chagas: (i) A droga deve apresentar cura parasitológica tanto para a forma aguda quanto para a forma crônica da doença; (ii) a droga deve ser efetiva em período curto de tratamento, preferencialmente em dose única ou poucas doses, e sem que a hospitalização para a administração do tratamento seja necessária; (iii) ter baixo custo de produção; (iv) não ter efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) a droga não deve induzir a seleção de cepas resistentes de *T. cruzi*. Infelizmente, até o presente momento, nenhuma das drogas testadas preenche os requerimentos exigidos pela PAHO/WHO (SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos envolve um número diverso de estratégias e a combinação de técnicas tradicionais e modernas, que permitam integrar diferentes especialidades tais como biologia e bioquímica,

medicina e epidemiologia, química e farmacologia, entre outros. Por isso, a prospecção de fármacos requer tempo e investimento financeiro (SILVA-JARDIM; THIEMANN; ANIBAL, 2014). Além disso, algumas questões não respondidas têm dificultado a pesquisa e desenvolvimento de fármacos contra a doença de Chagas, como a compreensão da interação parasito-hospedeiro, métodos de diagnóstico que comprovem a cura parasitologia e se a eliminação do parasito do organismo é suficiente para impedir a progressão do dano nos tecidos (Quadro 1). Enquanto estas questões não são elucidadas, grupos de pesquisas concordam que o passo importante para o tratamento do mal de Chagas é descobrir e desenvolver drogas que eliminem o parasito do organismo do paciente (CHATELAIN, 2017).

**Quadro 1** - Desafios e prioridades na pesquisa e desenvolvimento para a doença de Chagas

ÁREA	DESAFIOS	PRIORIDADES
Epidemiologia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Discordância entre os testes sorológicos;</li> <li>• Informação limitada do genótipo dos parasitos circulantes;</li> <li>• Melhorias na vigilância da doença.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificação de novos antígenos e desenvolvimento de novos testes de diagnóstico;</li> <li>• Desenvolvimento de ferramentas genotípicas mais sensíveis para epidemiologia molecular;</li> </ul>
Cuidados com o paciente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficiência limitada das drogas de escolha;</li> <li>• Dificuldade de acesso a eficiência do tratamento;</li> <li>• Desenvolvimento de vacinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triagem clínica de novas drogas candidatas;</li> <li>• Identificação e validação de biomarcadores para progressão/cura da doença;</li> <li>• Estratégias e políticas para acesso ao tratamento;</li> <li>• Fortalecimento do desenvolvimento de vacinas.</li> </ul>
Patogênese	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conhecimento escasso sobre a dinâmica do parasito no hospedeiro;</li> <li>• Compreensão limitada do papel da diversidade do parasito.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fortalecer a pesquisa básica na dinâmica do parasito;</li> <li>• Estudos em larga – escala de epidemiologia molecular.</li> </ul>

**Fonte:** Dumonteil e Herrera (2017).

Nos últimos 10 anos algumas mudanças ocorreram no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas para a doença de Chagas: (i) novos grupos de pesquisa começaram a pesquisar novos compostos candidatos à fármaco; (ii) o desenvolvimento tecnológico permite testar novas estratégias para a

descoberta e desenvolvimento em doença de Chagas com mais eficácia e rapidez; (iii) a avaliação eficaz de duas novas entidades químicas, Posaconazol e Ravuconazol, para pesquisa de tratamento de indivíduos com doença de Chagas na fase indeterminada, a primeira triagem clínica para a doença em mais de 40 anos (CHATELAIN, 2015).

Programas de pesquisa e desenvolvimento em doença de Chagas têm sido bastante ativos. Projetos como CHAGASZOL, STOPCHAGAS, TRAENA, E1224 e BENEFIT têm provido dados novos e informações valiosas para a compreensão do desenvolvimento da doença. Estes estudos comprovaram a eficácia do Bz em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, mostrando que o composto induziu a cura parasitológica (CHATELAIN, 2017). Entretanto, não foi possível determinar se a eliminação do parasito previne a progressão da cardiopatia chagásica. Todavia, os programas de triagem clínica permitiram desenvolver e padronizar protocolos de modelos murinos da doença de Chagas capazes de prever os efeitos do tratamento com novas drogas e regimes de tratamento, em associação com o Bz ou o Nifurtimox (CHATELAIN, 2017; URBINA, 2014).

O programa BENEFIT de fato trouxe muitas contribuições para a pesquisa da doença de Chagas, entretanto, os resultados obtidos na avaliação do tratamento com Bz em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica foram conflitantes. Embora os pacientes tratados apresentassem diminuição nos níveis de parasitemia, eles não apresentaram nenhuma melhora no quadro clínico cardíaco. Estudos com Posaconazol também apresentaram resultados decepcionantes. Contrariamente aos resultados muito promissores na fase pré-clínica, o Posaconazol não foi capaz de sustentar a redução da parasitemia em pacientes na triagem clínica. Outros triazoles, como o Ravuconazol, também não apresentaram resultados superiores quando comparados com Bz (DUMONTEIL; HERRERA, 2017; MOLINA et al., 2014). Estes estudos reforçam a necessidade de que grupos de pesquisa que trabalham na busca por novas alternativas de drogas continuem os esforços para desenvolver e aperfeiçoar teste *in vitro* e *in vivo* que possam gerar uma reprodução mais próxima dos achados clínicos e auxiliem a compreender a dinâmica da doença de Chagas (MORAES; FRANCO, 2016).

A busca por um tratamento para a doença de Chagas envolve não apenas a descoberta de novas drogas, mas também o reposicionamento de drogas já utilizadas para tratamento de outras enfermidades. Compostos com atividades

antitumorais e antifúngicos, e as combinações de novas drogas com drogas já utilizadas para o tratamento de pacientes chagásicos, também tem sido uma abordagem bastante explorada, como o exemplo da combinação do Bz com Fosravuconazole (E1224), o qual já está na fase de testes clínico II (Quadro 2) (DUMONTEIL; HERRERA, 2017; FIELD et al., 2017; MORAES; FRANCO, 2016).

**Quadro 2** - Principais tendências na descoberta de drogas contra a doença de Chagas

PASSADO	PRESENTE	FUTURO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uma quimioterapia empírica foi introduzida contra a doença de Chagas logo após a sua descoberta em 1909;</li> <li>• Até a década de 60, o tratamento não eficaz se baseava em antimaláricos, formulações de arsênico e compostos à base de metal;</li> <li>• Em 1966 o benznidazol foi introduzido para quimioterapia, seguido pelo nifurtimox em 1970;</li> <li>• Por muitos anos, a descoberta de drogas para a doença de Chagas ficou estagnada, e como padrão de tratamento, apenas casos agudos da doença recebiam tratamento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A reposição de drogas emergiu como uma tendência para a descoberta de novas drogas que poderiam rapidamente avançar para a fase de triagem clínica;</li> <li>• Aumento dos esforços na descoberta de novas drogas com foco no <i>screening</i> fenotípico; milhares de compostos, grande parte sintéticos, foram testados contra o <i>T. cruzi</i>;</li> <li>• Triagens clínicas randômicas mostraram que o benznidazol ainda é a única opção terapêutica disponível para o tratamento etiológico e cura parasitológica, no entanto é associado a altas taxas de efeitos colaterais;</li> <li>• Aperfeiçoamento dos testes <i>in vitro</i> e modelos animais podem reproduzir mais fidedignamente dados observados na triagem humana.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Programas de <i>screening</i> serão mais focados em conjuntos menores de maior diversidade química, como os produtos naturais;</li> <li>• Combinação de terapias está em ascensão como estratégia chave na quimioterapia antiprotozoário, e pode se tornar a solução para a doença de Chagas;</li> <li>• Novos tratamentos não irão apenas eliminar a infecção com o <i>T. cruzi</i>, mas também tratar pacientes com a doença de Chagas crônica, como as manifestações cardíacas;</li> <li>• Aumento do conhecimento sobre o mecanismo de ação de drogas será utilizado para descobrir e validar quimicamente novos alvos, proteínas e vias que são importantes para o <i>T. cruzi</i> e para a persistência da infecção no hospedeiro.</li> </ul>

**Fonte:** Adaptado de Moraes e Franco (2016).

O reposicionamento de drogas consiste em testar drogas já aprovadas para o tratamento de uma doença em outra. A reposição de drogas antitumorais tem apresentado resultados promissores. Os antitumorais testados tem como mecanismo de ação a inibição de proteínas quinases. Os inibidores da quinase dependente de ciclina (CDK), proteína envolvida na proliferação celular, Dinaciclib e Miliclib apresentaram melhores resultados contra formas amastigotas de *T. cruzi*, com valores de LC<sub>50</sub> de 0.01µM e 0.04µM, respectivamente (DICHARA et al., 2017).

Outra abordagem na reposição de drogas contra a doença de Chagas é testar o efeito de antifúngicos contra o *T. cruzi*. Compostos derivados de azoles tem sido utilizados como antifúngicos por quase 40 anos, e o mecanismo de ação destas drogas é através do bloqueio da biossíntese de ergosterol em fungos via inibição da enzima citocromo 450, chamada esterol -14 α desmetilase (CYP51). Assim como

os fungos, o *T. cruzi* também é dependente da esterol-14  $\alpha$  desmetilase (CYP51), componente vital para a membrana plasmática, divisão celular, crescimento e processos de desenvolvimento do protozoário. Desta forma, muitos grupos de pesquisa investiram em testes com os antifúngicos como potenciais agentes quimioterápicos frente ao *T. cruzi* (LEPESHEVA, 2013).

Os antifúngicos Posaconazol, Ravuconazol e Fluconazol apresentaram resultados *in vitro* promissores, no entanto os estudos *in vivo* mostraram que, quando comparados ao Bz, os compostos apresentaram baixo efeito sobre a parasitemia de pacientes infectados com *T. cruzi* e em alguns pacientes ocorreu reativação da infecção (KEENAN; CHAPLIN, 2015; LEPESHEVA, 2013; MORAES; FRANCO, 2016). O composto azólico VT-116, qual está na fase II de triagem clínica como antifúngico, foi testado contra o *T. cruzi*. O composto VT-116 é um potente inibidor de TcCYP51 que foi capaz de suprimir em 99,8% pico de parasitemia em modelo murino de infecção com a cepa Y do *T. cruzi*, o que demonstra o potencial do composto V-116 para tratamento da doença de Chagas (HOEKSTRA et al., 2016).

A enzima CYP51 do *T. cruzi* vem sendo o principal alvo também de grupos de pesquisa que buscam descobrir e desenvolver novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. Além de desempenhar um papel essencial na biossíntese de ergosterol, a enzima CYP51 está validada como alvo em modelos *in vitro* e sua estrutura química já está bem caracterizada. Outros fatores que estimulam a busca por compostos que inibam a CYP51 são a sua drogabilidade e a identificação de uma grande variedade de compostos capazes de se ligar a CYP51 (LEPESHEVA, 2013). Um estudo realizado por Dandapani et al. (2014), utilizando a triagem fenotípica de autotendimento identificou 100,000 moléculas, obtidas a partir da síntese orientada por diversidade estrutural, com atividade tripanocida contra formas amastigotas em concentrações na escala nanomolar.

As proteinases, principalmente a Cruzipaina (Cz) também conhecida como cruzaina e GP57/51, estão associadas à regulação de várias funções biológicas no *T. cruzi*. Portanto, a inibição destas enzimas pode ser uma abordagem muito promissora na descoberta de novos fármacos (DUSCHAK, 2016). O inibidor peptídico irreversível K777, do grupo de inibidores peptídico – vinil/alil sulfonas, foi o composto que apresentou melhores resultados contra o *T. cruzi* e está em fase clínica de testes (DUSCHAK, 2016). Estudos tem demonstrado que compostos à base de nitrila são inibidores reversíveis de cisteína proteinase e tem apresentado

bons resultados *in vitro*, com valores de IC<sub>50</sub> na escala de µM (NDAO et al., 2014). Os compostos Cz007 e Cz008 apresentaram valores de IC<sub>50</sub> (1.1 e 1.8 nM respectivamente) e quando testados em modelo *in vivo* de fase aguda da doença de Chagas, os compostos apresentaram taxas de cura a uma concentração de 3mg/Kg de 90% (Cz007) e 78%(Cz008) contra taxa de cura de 71% do Bz a 50 mg/Kg. As drogas Cz007 e Cz008 também apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%, mesmo após a administração do imunossupressor ciclofosfamida (NDAO et al., 2014).

As tiosemicarbazonas, semicarbazona, hidrazonas e seus derivados químicos são inibidores não peptídicos de cisteínas proteinases. Vários compostos destas classes tem apresentado atividade tripanocida contra formas tripomastigotas e amastigotas na escala de concentração em nM, com baixo efeito citotóxico em células de mamíferos (DUSCHAK, 2016). Complexos metálicos de rutênio, os quais também são inibidores não peptídicos de cisteína proteinase, apresentaram efeito tripanocida melhor que o Bz *in vitro*, como também foram obtidos bons resultados em testes de combinação com Bz (BASTOS et al., 2014). O Complexo 3, composto com melhor atividade tripanocida, foi avaliado em modelo *in vivo* e os resultados comprovaram seu efeito tripanocida, com redução da parasitemia e aumento da taxa de sobrevivência dos animais infectados (BASTOS et al., 2014).

Novos alvos para drogas têm sido identificados no *T. cruzi*, um desses alvos é a enzima tripanotiona redutase (TR) a qual desempenha um importante papel no equilíbrio redox do parasito. A presença da TR no *T.cruzi* confere ao protozoário a capacidade de combater o ambiente oxidado gerado pela resposta imune do hospedeiro. O composto tioridazina (TDZ), uma fenotiazina prescrita para tratamento de depressão e ansiedade, inibe irreversivelmente a TR. Estudos *in vivo* com diferentes cepas de *T. cruzi* mostrou que a droga TDZ reduziu a taxa de mortalidade dos animais infectados, bem como diminuiu os danos cardíacos e as alterações eletrocardiográficas tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. Os autores reforçam a importância do tratamento da fase crônica da doença a fim de diminuir, retardar ou parar a evolução da cardiopatia chagásica (PRESTI et al., 2015).

O princípio ativo de cerca de 60 % dos medicamentos disponíveis, entre eles artemisinina, lovastatina e penicilina, são extraídos de produtos naturais (ANNANG et al., 2015). Os produtos derivados de plantas são uma vasta fonte de compostos

com potencial atividade tripanocida. Plantas do Nordeste Brasileiro, como alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), orégano de monte (*Lippia origanoides*) e alfavaca (*Ocimum gratissimum*), tem sido investigadas quanto ao potencial tripanocida apresentando resultados interessantes, como inibição do crescimento do parasito associado a um baixo efeito citotóxico em células de mamífero. Além do efeito sobre a replicação do parasito, alguns óleos essenciais de plantas da Caatinga, como a Cutia (*Eugenia brejoensis*) e o Ouricuri (*Syagrus coronata*), apresentam efeito imunomodulador estimulando a resposta pró-inflamatória, o qual pode auxiliar na eliminação do parasito da célula hospedeira (BERMUDEZ et al., 2016; BORGES et al., 2012; OLIVEIRA DE SOUZA et al., 2017). Além das plantas, microrganismo como bactérias e fungos também são fontes valiosas de compostos com diversas propriedades biológicas.

Os fungos são utilizados como fonte de alimento ou como medicamento em várias culturas populares. Os compostos derivados de fungos, principalmente proteínas e peptídios, tem apresentado atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e antiparasitária. Alguns produtos derivados de fungos ainda induzem efeito hepatoprotetor, antioxidante, antidiabético e proteção cardiovascular (BERMUDEZ et al., 2016; NG et al., 2016). Embora compostos derivados de fungos tenham uma grande variedade de atividades biológicas, poucos estudos relatam o efeito desses produtos em *T. cruzi*. Inahashi et al. (2014) investigaram a atividade antitripanossoma de cinco macrolídeos, actinoaloídes A–E, obtidos do fungo *Actinoallomurus fulvus*. O actinoaloíde A apresentou efeito tripanocida mais potente ( $IC_{50} = 0.226 \mu\text{g/mL}$ ) em comparação aos demais produtos, bem como apresentou atividade citotóxica muito baixa ( $> 100 \mu\text{g/mL}$ ). Entretanto, o efeito do actinoaloíde A em modelo *in vivo* de infecção não foi investigado.

## 1.7 P-MAPA

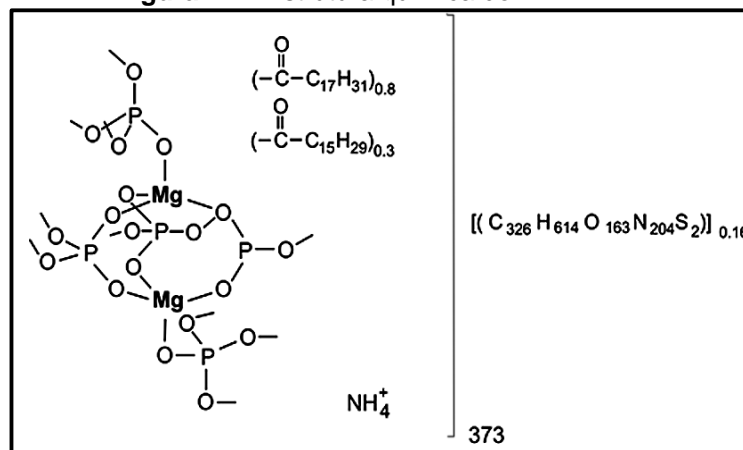
Compostos de origem microbiana, tais como bactérias e fungos, tem se tornado um importante componente na indústria biotecnológica (FÁVARO et al., 2012). Isto se deve aos grandes avanços na produção de metabólitos biologicamente ativos, responsáveis por abrir novas possibilidades para a aplicação mais extensa na indústria de larga escala. Microrganismos, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens de *Bacillus*, cepas de *Streptomyces*,



*Corynebacterium glutamicum*, e *Aspergillus oryzae* são selecionados como “hospedeiros” para fermentações, dependendo de suas vias metabólicas específicas para sintetizar produtos alvo e das condições empregadas em seus cultivos (COSTA et al., 2016; DURÁN et al., 2009). Compostos de origem microbiana apresentam diversos efeitos biológicos tais como, antibacteriano, antitumorais, imunossupressores, imunoestimuladores, antimalárica, antileishmania entre outros (DEMAIN, 2014; KHAN et al., 2014; VIEIRA et al., 2008).

O P-MAPA ou MAPA é um composto isolado e purificado a partir do fungo *Aspergillus oryzae*, denominado agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico. Desenvolvido pela Farmabrilis, uma organização brasileira não governamental que desenvolve medicamentos e tecnologias, o composto é um bipolímero não linear com peso molecular de 320 kDa. Sua composição apresenta aminoácidos - ácido aspártico (7,19%), treonina (3,56%), serina (7,56%), ácido glutâmico (8,53%), prolina (0,5%), glicina (9,69%), alanina (7,476%), valina (1,0%), metionina (4,38%), isoleucina (2,54%), leucina (3,03%), tirosina (0,5%), fenilalanina (1,0%), histidina (2,73%), lisina (3,56%), triptofano (1,3%) e arginina (35,2%); lipídeos - 22,7 ± 5,0% ácido palmitoleico, 42,9 ± 2,0% de ácido linoleico 32,0 ± 3,0% de ácido linoleico oxidado; além de fosfatos, magnésio e amônio (FARMABRASILIS, 2008a) (Figura 11).

**Figura 11** – Estrutura química do P-MAPA

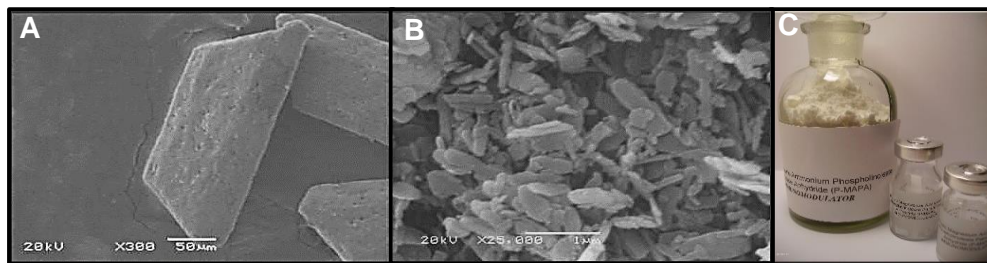


**Fonte:** Durán et al. (2010).

O P-MAPA é obtido por meio da fermentação do fungo *Aspergillus oryzae* em biorreatores. O microrganismo é cultivado em meio contendo palha de aveia e extrato de carne, além de outros nutrientes e sais minerais. Após 120 horas de fermentação sob temperatura de 30 a 35° C, pH 3 a 4, aeração e agitação de 40

rotações por minuto nas primeiras 48 horas, formam-se microcristais (Figura 12) na forma de um agregado polimérico, separados da solução por filtração simples e lavados com etanol (FIORAVANTI, 2010). A princípio o composto P-MAPA foi desenvolvido para o tratamento antitumoral, porém estudos têm comprovado sua atividade imunomoduladora em modelos de estudo com células tumorais, bem com sua ação sobre diferentes patógenos (FARMABRASILIS, 2008b; FARMABRASILIS, 2008c; FÁVARO et al., 2012; MELO et al., 2014; SANTIAGO, 2013; TASIC et al., 2008).

**Figura 12 - Cristais de P-MAPA**



**Fonte:** Durán et al. (2010).

**Legenda:** (A) Cristais de P-MAPA ampliados 300 vezes; (B) Nanocristais homogeneizados sob altapressão ampliados 37 mil e 80 mil vezes, ambas as imagens foram obtidas por microscopia de varredura eletrônica. (C) Cristais de P-MAPA em embalagens fornecidas pela FARMABRASILIS.

O P-MAPA se mostrou eficaz no controle de diferentes tipos de tumores. Justo et al. (2003) mostraram que o P-MAPA aumentou a sobrevivência de camundongos com tumor de Ehrlich, bem como reduziu a massa tumoral. O crescimento do tumor de Ehrlich está associado a uma disfunção na atividade de células NK e células T, e este evento podem estar associados à redução na expressão de IL-2, uma citocina pró - inflamatória. Neste trabalho, os pesquisadores observaram que o P-MAPA estimulou a produção de IL-2, aumentou a atividade das células NK e a proliferação de células T. Ainda, o P-MAPA foi capaz de estimular a produção de IFN- $\gamma$  e reduziu os níveis de IL-10. Desta forma, o grupo concluiu que o P-MAPA atua direta ou indiretamente no controle do crescimento tumoral e sobrevivência dos animais por meio da sua interação com a resposta imune, atuando como um agente imunoestimulador (JUSTO; QUEIROZ; DURÁN, 2003).

O P-MAPA causou uma regressão tumoral de 60% em camundongos com carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), um tumor maligno muito utilizado em estudos sobre o desenvolvimento de metástases e de angiogênese e de avaliação de efeitos de quimioterapia (FARMABRASILIS, 2008b). Quando testado contra Carcinoma

mamário e Plasmacitoma, utilizando Ratos WAB/Not e camundongos Balb/C, respectivamente, o P-MAPA dobrou a sobrevivência dos animais e inibiu significativamente o crescimento tumoral. A inibição do crescimento foi observada mesmo após a interrupção do tratamento com o composto. A partir deste último dado, os pesquisadores do estudo acreditam que o P-MAPA poderia estimular uma resposta imune de longa duração frente ao crescimento tumoral (FARMABRASILIS, 2008d).

Em modelo de câncer de bexiga, FÁVARO et al. (2012) mostraram que o P-MAPA foi mais eficaz contra o tumor do que outros métodos de tratamento. Além disso, aponta que além de estimular a produção dos receptores TLR, responsáveis pela resposta imune, e da proteína p53, envolvida na regulação do ciclo celular e apoptose, o P-MAPA é capaz de atuar como ligante dos TLRs, principalmente TLR2 e TLR4 (FÁVARO et al., 2012).

Além do efeito antitumoral, o P-MAPA também vem sendo testado contra diversos patógenos, e tem se mostrado como um potente agente quimioterápico. Tasic et al. (2008) mostraram a atividade antimalárica do P-MAPA, no qual animais tratados com o polímero apresentaram uma redução de 100% da parasitemia. O P-MAPA apresentou resultados promissores em um estudo *in vivo* com camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*, agente etiológico da Listeriose uma infecção bacteriana grave que atinge principalmente mulheres grávidas. Neste estudo, os pesquisadores observaram um aumento na sobrevivência dos animais infectados, cerca de 30-40% quando os animais foram infectados com uma dose letal da *L. monocytogenes*. O estudo ainda mostra que o P-MAPA induziu mielopoiese de uma maneira dose-dependente, com aumento de células progenitoras de granulócitos-macrófagos (CFU-GM). Adicionalmente, o P-MAPA estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-2 e IFN- $\gamma$ , resultando na amplificação da resposta do hospedeiro frente a infecção (FARMABRASILIS, 2008c). Durán et al. (2009) mostraram que o P-MAPA foi eficaz no controle da infecção pelo vírus Punta-Toro em modelo murino, e que o composto não apresentou efeitos tóxicos sendo capaz de aumentar a sobrevivência dos animais tratados. Estudos sobre o efeito do P-MAPA sobre a infecção por *Leishmania (L.) chagasi* em modelo canino também foram realizados. Melo et al. (2014) observaram que o tratamento com o P-MAPA promoveu uma melhora nos sinais clínicos dos animais sintomáticos, e foi capaz de reduzir os níveis de IL-10 e a carga parasitária,

enquanto os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2, importantes citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela resistência à infecção, e células TCD8<sup>+</sup> estavam aumentados, este último resultado mostrando que o P-MAPA também é capaz de induzir a resposta imune celular. Santiago et al. (2013) demonstraram que, o tratamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e macrófagos de cães infectados ou não com *Leishmania chagasi* com P-MAPA aumentou a expressão de TLR-2 e induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico (NO). Este grupo também demonstrou que o P-MAPA não alterou parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais, comprovando que o composto não apresenta efeitos tóxicos.

A imunoterapia representa uma alternativa para o tratamento de diversas doenças. Desta forma, vacinas, adjuvantes e modificadores biológicos podem ser considerados como candidatos em potencial (FÁVARO, 2012). As atividades biológicas apresentadas pelo P-MAPA, antiviral, antineoplásica, antimicrobiana e antiparasitária, demonstram que o composto é um promissor quimioterápico, seja isolado ou em combinação com terapias já estabelecidas. Contudo, mais estudos são necessários para detalhar os mecanismos de ação do P-MAPA (GONÇALVES, 2014).

Até o presente momento, nenhum estudo relatou o efeito do P-MAPA contra o *T. cruzi*. Assim, no presente trabalho nós avaliamos efeito tripanocida *in vitro* e *in vivo* do P-MAPA. Nossos resultados visaram contribuir para o desenvolvimento de um possível candidato a agente quimioterápico e/ou uma nova abordagem terapêutica contra a doença de Chagas.

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana contribui para a alta carga de prevalência das cardiomiopatias no mundo. Embora tenha se passado mais de cem anos desde sua descoberta, a doença de Chagas ainda é um problema de saúde pública, principalmente na América Latina, e causa grande morbidade e mortalidade nas populações acometidas. A única droga disponível no Brasil para o tratamento desta enfermidade, o Benznidazol não é totalmente eficaz e apresenta uma série de efeitos colaterais graves. Além disso, casos de cepas resistentes a este tratamento têm sido relatados. Neste sentido, a procura por compostos menos tóxicos e mais eficazes contra o *T. cruzi* ainda é uma necessidade. Nenhuma nova droga para a doença de Chagas foi licenciada ou avaliada na fase clínica III desde a introdução do Benznidazol nos anos de 1960-70. Contudo, ainda que novos fármacos se encontrem em fase avançada de teste, é importante seguir com os esforços para que mais compostos sejam descobertos e estudados.

Neste cenário, o composto extracelular purificado e isolado a partir de *Aspergillus oryzae*, denominado agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio protéico (P-MAPA) surge como uma alternativa a quimioterapia contra a doença de Chagas. O P-MAPA apresenta atividade imunomoduladora, como a indução de TLR2 em células HEK, indução da proliferação de células T, aumento na produção de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2, e estimula a liberação de NO por macrófagos. O P-MAPA também apresenta atividade antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária, apresentando resultados bastante promissores. Estudos *in vitro* e *in vivo* toxicológicos mostram que o P-MAPA não apresenta efeitos tóxicos ou teratogênicos. Até o presente momento, nenhum estudo relatou o efeito do P-MAPA contra o *T. cruzi*. Assim, no presente trabalho avaliamos o efeito tripanocida e regulador do sistema imune do P-MAPA nos modelos *in vitro* e *in vivo* da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

### 3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os efeitos biológicos do imunomodulador P-MAPA sobre as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* e sobre a resposta imune durante a infecção experimental?

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar o potencial *in vitro* e *in vivo* do composto P-MAPA isolado de *Aspergillus oryzae* contra o *Trypanosoma cruzi*.

### 4.2 Específicos

- a) Avaliar o potencial citotóxico do P-MAPA sobre células de mamíferos;
- b) Investigar o efeito *in vitro* do P-MAPA sobre as formas tripó- e amastigota de *T. cruzi*;
- c) Investigar os efeitos do P-MAPA como indutor de morte celular em *T. cruzi*;
- d) Analisar o efeito do P-MAPA sobre a resposta imune de células do exsudato peritoneal;
- e) Avaliar o efeito do P-MAPA e do Benznidazol, isolados ou em associação, sobre a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em camundongos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Preparo das soluções de P-MAPA e Benznidazol para experimentos *in vitro*

O agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico, denominado como P-MAPA, foi gentilmente cedido pela Farmabrilis. O P-MAPA liofilizado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração estoque de 22 mg/mL. Esta solução foi diluída em diferentes concentrações em meio de cultura, de modo que a porcentagem de DMSO nas maiores concentrações testadas fosse inferior a 1%, concentração não tóxica para as tanto para as células de mamíferos quanto para o parasito. Alíquotas da solução estoque foram mantidas a temperatura de 4°C e protegidas da luz até o uso. Já o Benznidazol (LAFEPE) também foi diluído em DMSO, porém a uma concentração estoque de 5 mg/mL e armazenado como descrito para o P-MAPA.

Previamente um teste de *screening* com diferentes concentrações do P-MAPA (0.04 – 400 µg/mL), para condição de estudo, foi realizado para determinar os intervalos de concentração que seriam utilizados nas análises biológicas *in vitro* (12.5 – 200 µg/mL). As concentrações de Benznidazol utilizadas foram as recomendadas pelo protocolo de *screening* e desenvolvimento de drogas para a doença de Chagas, com algumas modificações (0.125 - 2 µg/mL) (ROMANHA et al., 2010).

### 5.2 Cultura de parasitos e células de mamíferos

Para obtenção das formas tripomastigotas, 5 ml de cultura de células Vero de 2 dias foram infectadas com 100 µL de suspensão de tripomastigotas (cepa Y) concentradas a 10<sup>6</sup> parasitos/ml. A cultura foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado e 1% de Estreptomicina, em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> até que formas tripomastigotas fossem observadas no sobrenadante.

A cultura primária de células do exsudato peritoneal (CEP) de camundongo Balb/c foi obtida através da inoculação, via intraperitoneal, de 5 mL de meio RPMI, em condições estéreis, e então, após 1 minuto de homogeneização, o meio foi retirado e armazenado em tubo Falcon a uma temperatura de 4 °C até seu uso.



Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da infecção de culturas de células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c com formas tripomastigotas, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, a 37° C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>, e utilizadas nos ensaios de atividade biológica como descritos mais à frente.

### **5.3 Potencial citotóxico do P-MAPA sobre células de mamíferos**

As análises de citotoxicidade foram realizadas segundo o protocolo estabelecido por Mosmann (1983) com algumas alterações. Este teste é baseado na redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) - 2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por enzimas mitocondriais de células viáveis produzindo um cristal púrpuro denominado cristal de formazan. Para realização do teste, células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c, obtidos como descrito previamente, foram cultivadas em placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  célula/ mL, em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB e incubados *overnight* a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, as células foram submetidas a presença de diferentes concentrações do P-MAPA (12.5 – 200 µg/mL) ou Benznidazol (0.125 – 2 µg/mL) por 24 horas. Após este período, o meio RPMI contendo a droga foi substituído por RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB, adicionando-se então 10µL de MTT (5 mg/mL). As culturas foram incubadas por 3h em estufa de 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> na ausência de luz. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet solubilizado com 100 µL de DMSO. O precipitado derivado da redução de MTT foi quantificado espectofotometricamente a 540 nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Células na presença apenas de meio foram utilizadas como controle. Poços contendo apenas MTT e DMSO foram utilizados como branco. Os resultados foram expressos como porcentagem de citotoxicidade determinada através da equação:

**Figura 13** – Equação para cálculo da atividade citotóxica do P-MAPA e Benznidazol

$$\text{Atividade Citotóxica (\%)} = 100 - \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do branco})}{(\text{Abs. do controle} - \text{Abs. do branco})} \times 100$$

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Abs. – Absorbância.

A concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células (CC<sub>50</sub>) foi estimada através de análise de regressão linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. A partir da CC<sub>50</sub> foi determinado o Índice de Seletividade (ISe), o qual informa o quanto um composto é tóxico para o parasito em relação as células do hospedeiro, calculando-se a razão entre a CC<sub>50</sub> e a LC<sub>50</sub> de tripomastigota ou a IC<sub>50</sub> de amastigota.

Alternativamente, foi avaliada a citotoxicidade do P – MAPA sobre hemácias do tipo O+. O sangue de indivíduos saudáveis foi coletado em tubo de coleta à vácuo contendo EDTA. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM) a 2% e incubadas em placas de 96 poços fundo “U” com diferentes concentrações do composto (12.5 – 200 µg/mL para o P-MAPA e 0.125 – 2 µg/mL para Bnz). Após um período de 3 horas de incubação, a 37° C sob agitação constante, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 4 minutos a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm para estimar o percentual de hemólise. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% foi utilizado como controle positivo de lise celular e as células em salina como controle negativo. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação:

**Figura 14** – Equação para cálculo da atividade hemolítica do P-MAPA e Benznidazol

$$\text{Atividade Hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do controle negativo})}{(\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do negativo})} \times 100$$

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Abs. – Absorbância; Controle positivo: hemácias tratadas com solução de Triton X-100 a 1%; Controle negativo: hemácias tratadas com solução salina a 2%.

#### **5.4 Efeito do P-MAPA sobre as formas tripomastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi***

Formas tripomastigotas ( $1 \times 10^6$  parasitas/mL), mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) foram incubadas por 24 horas em placas de 96 poços na ausência ou presença de P-MAPA (6.25 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou Benznidazol (0.625 – 1  $\mu\text{g/mL}$ ). A morfologia e a quantidade de células foram avaliadas através de contagem em câmara de Neubauer, e a  $\text{LC}_{50}$  (concentração que causa 50% de perda de viabilidade dos parasitas) determinada por análise de regressão linear. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Células do exsudato peritoneal (CEP) de camundongos Balb/c ( $1 \times 10^6$  células/mL), obtidos como descrito anteriormente, foram cultivadas em placa de 24 poços, contendo lamínula de vidro 13 mm, e mantidos em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB, e incubados *overnight* em estufa de 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, a cultura foi lavada e infectada com formas tripomastigotas na proporção de 5:1 parasito/célula. Após 3 horas de interação, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem com meio RPMI e incubados em meio fresco na presença ou ausência de diferentes concentrações do P-MAPA (25 – 200  $\mu\text{g/mL}$ ) ou Benznidazol (0.25 – 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24 horas de tratamento, o meio foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida as células aderidas nas lamínulas foram fixadas por 5 minutos em metanol e coradas por 20 minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Após este procedimento, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada, deixadas a secar e montadas em lâminas com Etellan (Merk KGaA, Darmstadt, ALE). A concentração capaz de reduzir em 50% o número de formas amastigotas internalizadas nas CEPs ( $\text{IC}_{50}$ ) foi determinada a partir da observação direta das células infectadas e das amastigotas intracelulares através de microscopia óptica de campo claro. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando-se o número de amastigotas pelo número de células infectadas. Células infectadas e não tratadas foram utilizadas como controle. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. O sobrenadante destas culturas foi armazenado para posterior avaliação da produção de óxido nítrico e perfil de citocinas

## 5.5 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Em cultura de células, o NO liberado é rapidamente convertido em derivados de nitrogênio, dentre estes o nitrito é o mais estável e pode ser mensurado (PINHO et al., 2011). A fim de avaliarmos o efeito do P-MAPA sobre a produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal, utilizamos o teste de quantificação de nitrito através do reagente de Griess. Para tal, 100 µl do reagente Griess (1% sulfanilamida/ 0.1% *N*-(1-naphthyl) - ethylenediamina dihydrochloreto/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) foi adicionada 100 µl do sobrenadante das culturas de células do exsudato peritoneal infectadas com *Trypanosoma cruzi* e tratadas ou não com diferentes concentrações do P-MAPA, e deixado para reagir em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida a 540nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. As células não infectadas e não tratadas e células infectadas não tratadas foram utilizadas como controle. Grupo de células não infectadas e desafiadas com LSP também foi utilizado como controle. Foram realizados três experimentos em duplicata.

## 5.6 Produção de Citocinas

As citocinas foram quantificadas em sobrenadante da cultura de células do exsudato peritoneal infectadas com *Trypanosoma cruzi*, não tratada ou tratada com diferentes concentrações do P-MAPA, células não infectadas e não tratadas e células desafiadas com LPS. Para a quantificação foi utilizado o CBA flex para TNF, IL-10 e IL-1β (BD Bioscience), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados foram adquiridos por citometro de fluxo FACS Calibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) e analisados através do software BD FCAP software v 3.0 (Becton & Dickinson, San José, EUA). Foram realizados três experimentos em duplicata.

### **5.7 Avaliação dos efeitos do P-MAPA sobre a morfologia e ultraestrutura do *Trypanosoma cruzi***

Formas tripomastigotas tratados ou não com 1x e 2x a LC<sub>50</sub> do P-MAPA, foram lavadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5% e paraformolaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50% -100%), infiltrados e incluídos em resina epóxi (Fluka Analytical, Polysciences). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica Microsystem, Wetzlar, ALE) foram coletados em grades de cobre de malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e os cortes observados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit Biotwin G2 (FEI, Oregon, EUA) à 80 kV. Alternativamente, parasitos controles ou tratados com 1x e 2x a LC<sub>50</sub> do P-MAPA foram processados como descrito para a microscopia eletrônica de transmissão até a etapa de pós-fixação. Após a pós-fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e aderidas em lamínulas de 13 mm contendo poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas em PBS para retirada das células não aderidas. Subsequentemente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30 % a 100%) por 10 minutos e secas pelo método do ponto crítico (HCP-2 critical point dryer, Hitachi). Após este processo, as células foram metalizadas com 20 nm ouro-paládio (Fine Coat Íon Sputter JFC-1100, JEOL) e observadas ao microscópio eletrônico JEOL.

### **5.8 Avaliação dos efeitos do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS mitocondrial do *Trypanosoma cruzi***

Para análise do possível efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial foram utilizados os marcadores Rodamina 123 (Rh123) e MitoSox Red®, respectivamente. Formas tripomastigotas foram incubadas na ausência ou presença do P-MAPA nas concentrações correspondentes a 1x e 2x a LC<sub>50</sub>, por 24 horas.

Alíquotas de 3 mL das culturas foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, lavadas 3 vezes e ressuspensas em 0,1mL de PBS. Para a marcação com Rodamina 123, as células tratadas e controles foram coradas com 10 µg/mL de Rodamina por 15 minutos, à 37°C na ausência de luz. Após incubação, as células foram centrifugadas à 3000 rpm por 5 minutos, e ressuspensas em 100 µL de tampão PBS. Células tratadas e controles foram incubadas com MitoSox Red® (5µM) por 30 minutos à 37°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes e em seguida ressuspensas em 100µL de PBS. As células marcadas foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA) equipado com o software Cell Quest Pro. Um total de 10,000 eventos foi obtido.

### **5.9 Manutenção dos animais para experimentos *in vivo***

Camundongos BALB/c fêmea, com idade de 30 dias e pesando entre 18 – 24 gramas, foram obtidos do Biotério de Criação e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto Aggeu Magalhães. Até nove camundongos foram mantidos por caixa, em um ambiente com temperatura de 22°C e sob ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuro, e alimentação e água *ad libitum*. Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa do COBEA (Colégio Brasileiro de experimentação). Todos os procedimentos utilizados foram adaptados a partir dos protocolos sugeridos por Romanha et al. (2010) (regime de tratamento e dose de Bz) e Araújo-Jorge e Castro (2000) (Exame de sangue e Histologia).

### **5.10 Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* e divisão dos grupos**

Os camundongos BALB/c foram infectados, pela via intraperitoneal, com  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, cedidas gentilmente pela Serviço de Referência na Doença de Chagas, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ. As formas tripomastigotas previamente obtidos por punção do plexo venoso retro-orbital de camundongos infectados, no dia do pico de parasitemia, o que ocorre entre o 5 e 7º dia pós-infecção (dpi). Para conseguir um maior quantitativo de parasitos, as formas tripomastigotas sanguíneas foram submetidas a

passagem em cultura de célula Vero. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- 1) Grupo controle sem infecção e sem tratamento (n=14)
- 2) Grupo controle com infecção e sem tratamento (n=18)
- 3) Grupo tratado com Benznidazol (100mg/Kg) (n=14)
- 4) Grupo tratado com Benznidazol (50mg/Kg) (n=14)
- 5) Grupo tratado com P-MAPA (5mg/Kg) + Benznidazol 100mg/Kg) (n=14)
- 6) Grupo Tratado com P-MAPA (5mg/Kg) + Benznidazol (50mg/Kg) (n=14)
- 7) Grupo tratado com P-MAPA (5mg/Kg) (n=14)

O tratamento experimental foi administrado pela via orogástrica, através de gavagem (Benznidazol) e via intraperitoneal (P-MAPA), com um volume aproximado de 0,1mL, em uma dose única diária por 15 dias consecutivos.

A dose de 5 mg/mL do P-MAPA já utilizada pela por outros estudo e tem apresentado bons resultados sobre diferentes modelos de estudo biológico, como antitumoral e antiviral (DURÁN et al., 2009; FÁVARO et al., 2012). Além disso, estudos de toxicidade aguda e crônica, em modelo murinho, mostraram que esta dose não causa efeitos tóxicos, nem altera padrões bioquímicos ou hematológicos (FARMABRASILIS, 2008e). Com relação ao Benznidazol, as doses administradas (50 e 100 mg/Kg) são amplamente empregadas nas pesquisas de desenvolvimento de fármaco para a doença de Chagas, bem como são recomendadas pelo protocolo de *screening* e desenvolvimento de drogas para a doença de Chagas (ROMANHA et al., 2010).

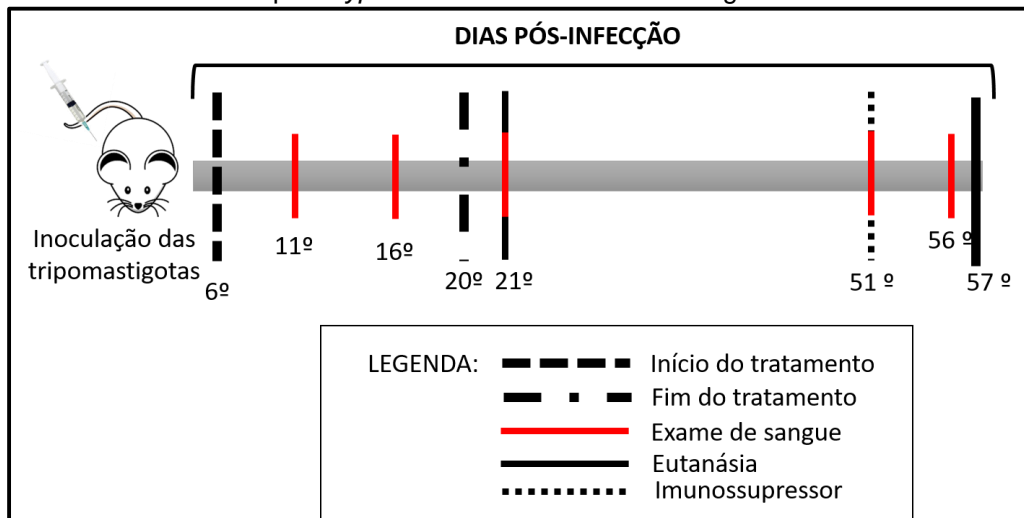
### **5.11 Cronograma de tratamento**

Os animais obtidos do Biotério de Criação foram transferidos para o Biotério Experimental e ficaram por 10 dias para adaptação antes dos experimentos. Os animais foram infectados e a partir do 3º dia pós-infecção (dpi) a parasitemia foi acompanhada através de exames de sangue fresco. Após confirmação da parasitemia, o tratamento foi iniciado no 6º dia pós-infecção.

Após 15 dias de tratamento (20ºdpi), 6 animais de cada grupo foram eutanasiados e materiais biológicos foram coletados para análises bioquímica (sangue) e histopatológicas (coração). Os animais restantes foram acompanhados

por 30 pós-tratamento e, após esse período, submetidos a administração com o imunossupressor Ciclofosfamida (200mg/Kg) pela via intraperitoneal, dose única diária por 4 dias consecutivos. A administração de imunossupressores nos modelos experimentais de infecção aguda com *T. cruzi* é necessária. No 57º dpi cinco animais de cada grupo foram eutanasiados e amostras do coração foram coletadas para avaliar a cura parasitológica (Figura 15).

**Figura 15** - Cronograma dos procedimentos para avaliação do efeito do P – MAPA sobre a infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos Balb/c



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Cronograma do seguimento do tratamento e eutanásia dos animais controles (infectados ou não infectados) sem tratamento e dos animais tratados com o P-MAPA ou Bz, isolado ou em associação. A partir do 3º dia após a inoculação das formas tripomastigotas, os animais foram acompanhados até o aparecimento da parasitemia, o qual ocorreu no 5º dpi. Após confirmação da parasitemia, o regime de tratamento foi iniciado (6ºdpi). Nos 11º e 16º dpi foram realizados exames de sangue para averiguar a parasitemia. No 21º dpi (24 horas após o fim do tratamento) seis animais de cada grupo foram eutanasiados e amostras de sangue e o coração foram coletados. Os animais restantes seguiram em acompanhamento por mais 30 dias pós-tratamento e, após exame de sangue para avaliar a parasitemia (50ºdpi), os animais receberam doses de Ciclofosfamida (200mg/Kg), por quatro dias consecutivos (51º - 54ºdpi). Após administração do imunossupressor, uma nova análise do sangue foi realizada, e após confirmação da reativação da parasitemia ou a ausência dela (56ºdpi), os animais foram eutanasiados (57º dpi) para coleta de amostras de sangue e do coração.

A mortalidade dos animais foi monitorada a partir do primeiro dia de tratamento até o 3º dia após o tratamento com imunossupressor. A partir do início do tratamento, a parasitemia foi acompanhada a cada 5 dias, durante os 15 dias de tratamento e após a administração do imunossupressor, através de exame de sangue a fresco.



### **5.12 Avaliação de parâmetros parasitológicos e de mortalidade**

A parasitemia foi avaliada a cada 5 dias e o número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer, utilizando em 5 µL de sangue periférico coletados da cauda do animal. A taxa de mortalidade foi relatada diariamente.

### **5.13 Quantificação de marcadores bioquímicos**

Os níveis séricos dos biomarcadores AST, ALT e ureia foram quantificados em aproximadamente 150 µL de soro dos animais eutanasiados no 21° dpi, utilizando os kits QuimiAST, QuimiALT e QuimiURE (EBRAM Produtos Laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil), segundo as recomendações do fabricante.

### **5.14 Análise Histológica**

O coração foi coletado no 21° dpi e cortado longitudinalmente, lavado em PBS e fixado em Formol 10%. O tecido foi desidratado em etanol 70%, e embebido em parafina para seguir o processo de fixação, desidratação e inclusão em parafina. Cortes de 5µM foram obtidos e corados por hematoxilina-eosina de rotina (HE) e analisados por microscopia de luz. Foram obtidos dois corte não consecutivos para amostra.

### **5.15 Análise Estatística**

Dados homogêneos foram analisados por meio da análise de variância one-way ANOVA, e as diferenças entre os grupos analisadas usando o pós - teste de Tukey. Dados heterogêneos foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Todos os testes estatísticos foram realizados a um nível de significância de valor de  $p \leq 0,05$ .

### 5.16 Considerações Éticas

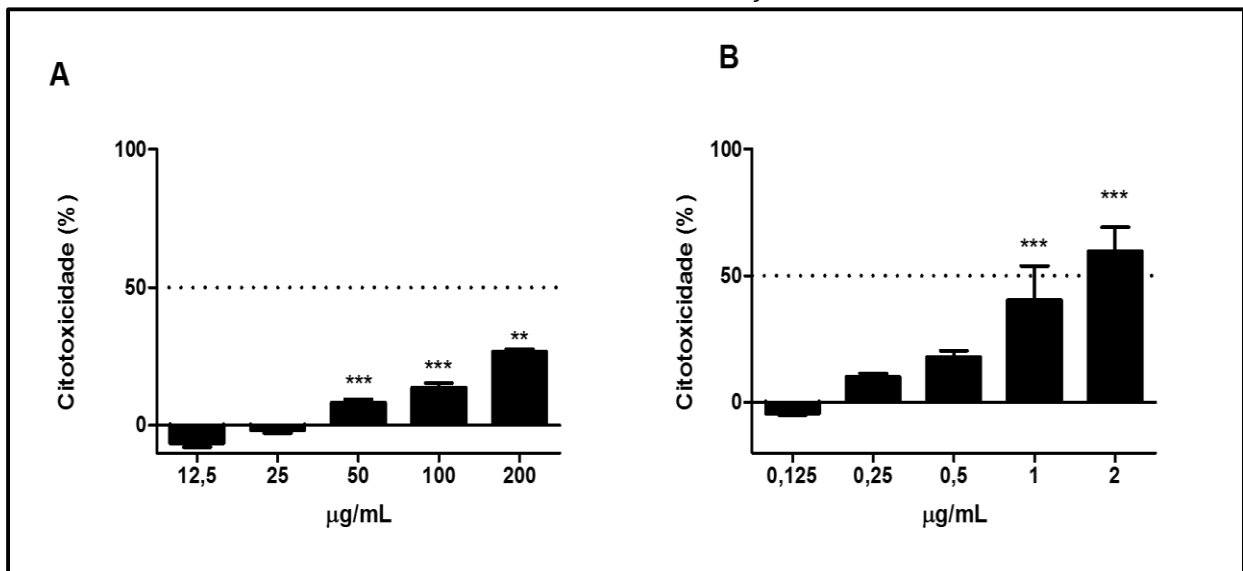
Camundongos Balb/c foram adquiridos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – FIOCRUZ e usados para obtenção de células do exsudato peritoneal e estudos *in vivo*. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos adotados da Fundação Oswaldo Cruz, segundo regimento do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA) sob o número de protocolo nº 59/2014 (Anexo A).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade citotóxica do P-MAPA

O potencial citotóxico do P-MAPA foi avaliado pela técnica do MTT utilizando células do exsudato peritoneal (CEP) de camundongos Balb/c. O P-MAPA apresentou um efeito dose-dependente significativo sobre a viabilidade celular a partir da concentração de 50 µg/mL. No entanto, em nenhuma das concentrações testadas o P-MAPA alcançou 50% de perda da viabilidade celular nas CEPs (Figura 16 A). A análise por regressão linear estimou o valor de  $CC_{50}$  (concentração que causa 50% de morte da população celular) em  $267 \pm 14,5$  µg/mL. Os ensaios com o Benznidazol (Bz) mostraram que nas concentrações testadas houve também uma redução da viabilidade celular nas concentrações de 1 e 2 µg/mL (Figura 16 B), sendo  $CC_{50}$  do Bz estimada em  $1,69 \pm 0,3$  µg/mL. Ao se comparar os valores de  $CC_{50}$  do P-MAPA com os resultados obtidos com Bz, podemos observar que esta última alcança 50 % de perda da viabilidade nas CEPs em uma concentração aproximadamente 158 vezes menor que a do P-MAPA.

**Figura 16** - Viabilidade de células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de P-MAPA e Bz



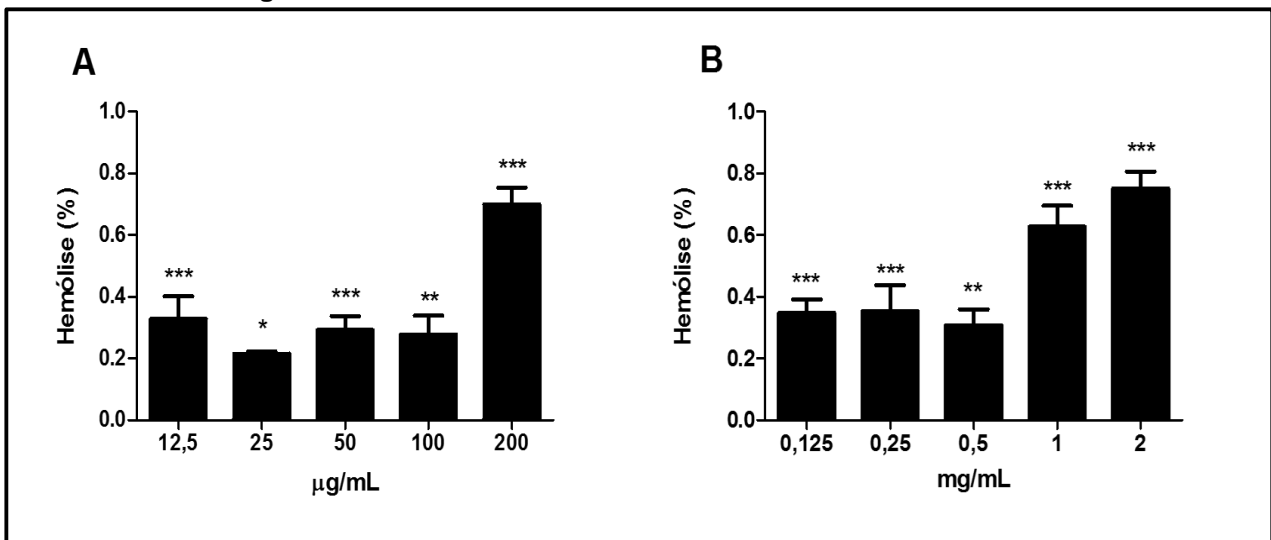
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Atividade citotóxica do P-MAPA (A) e do Benznidazol (B) sobre Células do Exsudato Peritoneal. Cada barra corresponde à média de três experimentos independentes em triplicata. Os (\*) são significâncias obtidas pelo teste ANOVA em relação ao controle sem tratamento (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; \*\*  $0.0001 < p > 0.001$ ; \*  $0.001 < p > 0.005$ ).

## 6.2 Atividade hemolítica do P-MAPA

A avaliação da atividade hemolítica é um método utilizado para avaliar o potencial de um composto em induzir a lise da membrana plasmática e também serve como um indicador indireto da citotoxicidade celular. Nossos dados mostram que todas as concentrações do P-MAPA causaram hemólise de maneira significativa em relação ao controle tratado com solução salina. Contudo, esta hemólise não ultrapassou o valor 0.8% na maior concentração testada (200  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 17 A). Quando comparamos este resultado com Bz, observamos que este também possui uma atividade hemolítica em todas as concentrações testadas. Nas maiores concentrações testadas de Bz (2  $\mu\text{g/mL}$ ) a taxa de hemólise foi semelhante ao encontrado na maior concentração de P-MAPA (200  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 17 B). A concentração de P-MAPA necessária para causar 50% de lise nos eritrócitos foi estimada em  $1226 \pm 31 \mu\text{g/mL}$ , enquanto que a concentração de Bnz que causou 50% de lise foi  $12 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 1).

Figura 17 – Atividade hemolítica do P-MAPA sobre hemácias de humanos



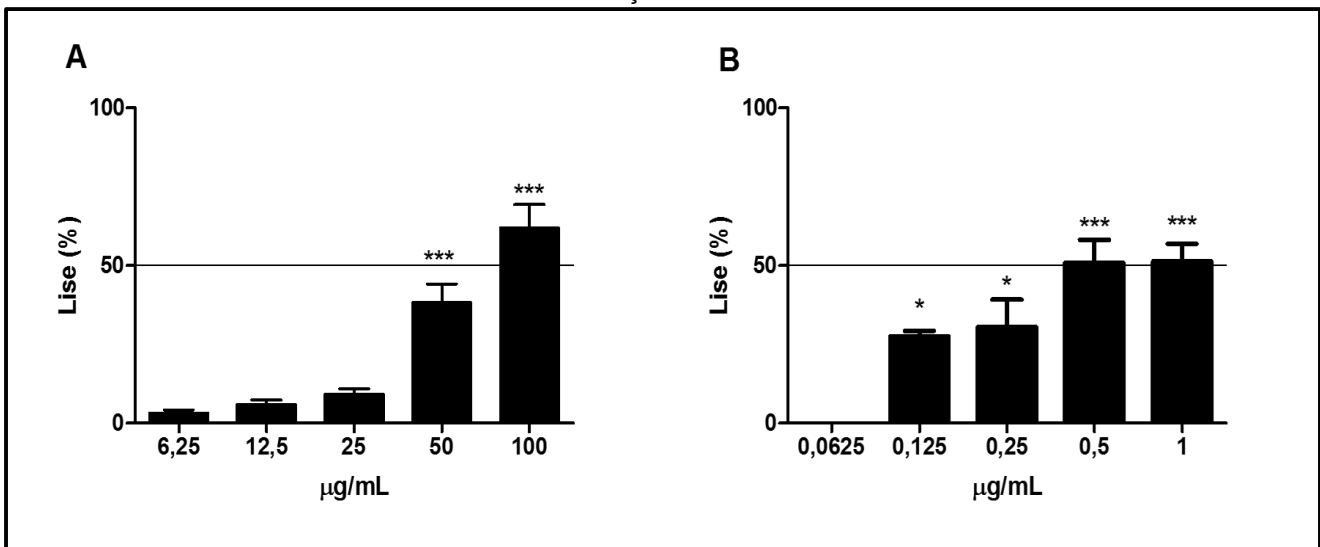
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Legenda: Atividade hemolítica do P-MAPA (A) e do Benznidazol (B) sobre hemácias. Cada barra corresponde à média de dois experimentos independentes em quadruplicata. Os (\*) são significâncias obtidas pelo teste ANOVA em relação ao controle tratado com solução salina (\*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*\*  $0.0001 < p < 0.001$ ; \*  $0.001 < p < 0.005$ ).

### 6.3 Atividade tripanocida do P-MAPA

Dada a importância das formas tripomastigotas na transmissão da doença Chagas, pois constituem as formas infectivas do parasito no homem, avaliamos o efeito do P-MAPA sobre a viabilidade dessa forma evolutiva. O P-MAPA apresentou um efeito dose dependente sobre a viabilidade das formas tripomastigotas. No entanto, nas maiores concentrações testadas (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) houve redução significativa da viabilidade do parasito em relação ao grupo controle sem tratamento. No entanto, as concentrações testadas não foram capazes de induzir 100% de perda da viabilidade dos parasitos (Figura 18 A). A partir da análise de regressão linear a concentração de  $\text{LC}_{50}$  do P-MAPA foi de  $78,5 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$ . O Bnz apresentou um efeito tripanocida maior do que o P-MAPA (Figura 18 B) com um valor da  $\text{LC}_{50}$  de,  $0,8 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 1).

**Figura 18** - Viabilidade de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com diferentes concentrações de P-MAPA e Bz



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

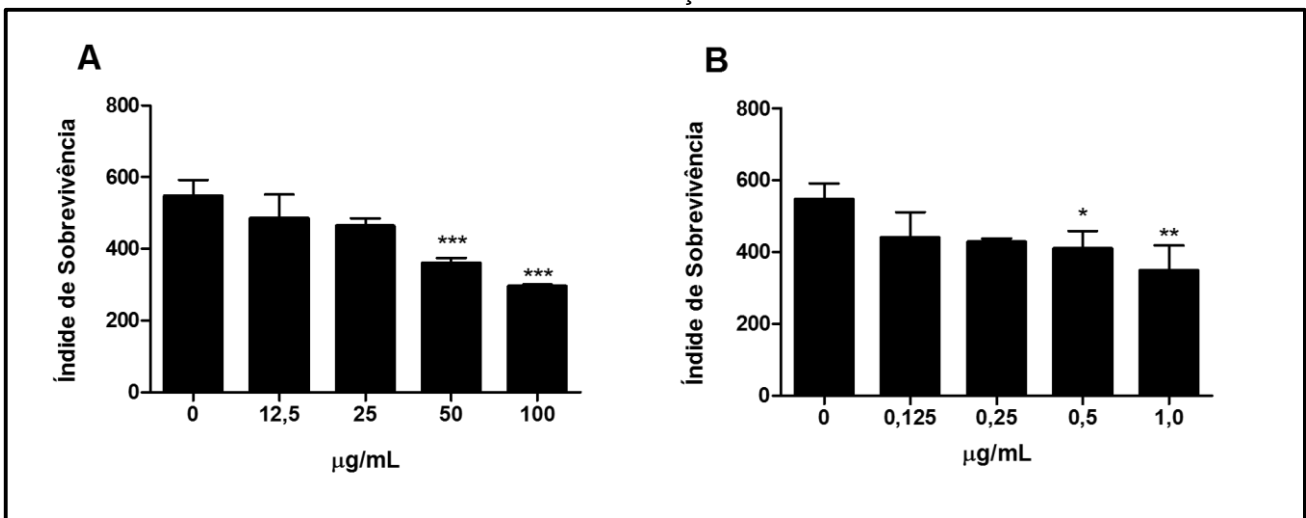
**Legenda:** Atividade tripanocida do P-MAPA (A) e do Benznidazol (B) sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Cada barra corresponde à média de três experimentos independentes em triplicata. Os (\*) são as significâncias obtidas pelo teste ANOVA em relação ao controle sem tratamento (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; \*\*  $0.0001 < p < 0.001$ ; \*  $0.001 < p < 0.005$ ).

Tendo em vista que as formas amastigotas tem um importante papel na patogênese da doença de Chagas, por serem as formas intracelulares replicativas do parasito nas células do hospedeiro, nós investigamos o efeito tripanocida do P-MAPA sobre estas formas. Para tal, avaliamos o índice de sobrevivência de

amastigotas em macrófagos infectados em comparação com células infectadas e não tratadas.

De forma semelhante às formas tripomastigotas, o P-MAPA também apresentou efeito dose-dependente sobre a sobrevivência de formas amastigotas intracelulares. No entanto, apenas nas concentrações 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  este composto foi capaz de reduzir significativamente a sobrevivências das formas amastigotas em relação ao controle sem tratamento (Figura 19 A). Essas formas se mostraram mais resistente ao tratamento quando comparados com as formas tripomastigotas, com a concentração estimada do P-MAPA capaz de reduzir em 50% o número de formas amastigotas intracelulares ( $\text{IC}_{50}$ ) em relação ao controle sem tratamento de  $110,72 \pm 11,6 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 1). O tratamento das células infectadas com Bnz, como era de se esperar, reduziu significativamente a sobrevivência das formas amastigotas em relação ao controle apenas nas concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19 B). A  $\text{IC}_{50}$  do Bz foi estimada em  $1,36 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ . (Tabela 1).

**Figura 19** - Análise da sobrevivência de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* submetidas a diferentes concentrações de P-MAPA e Bz



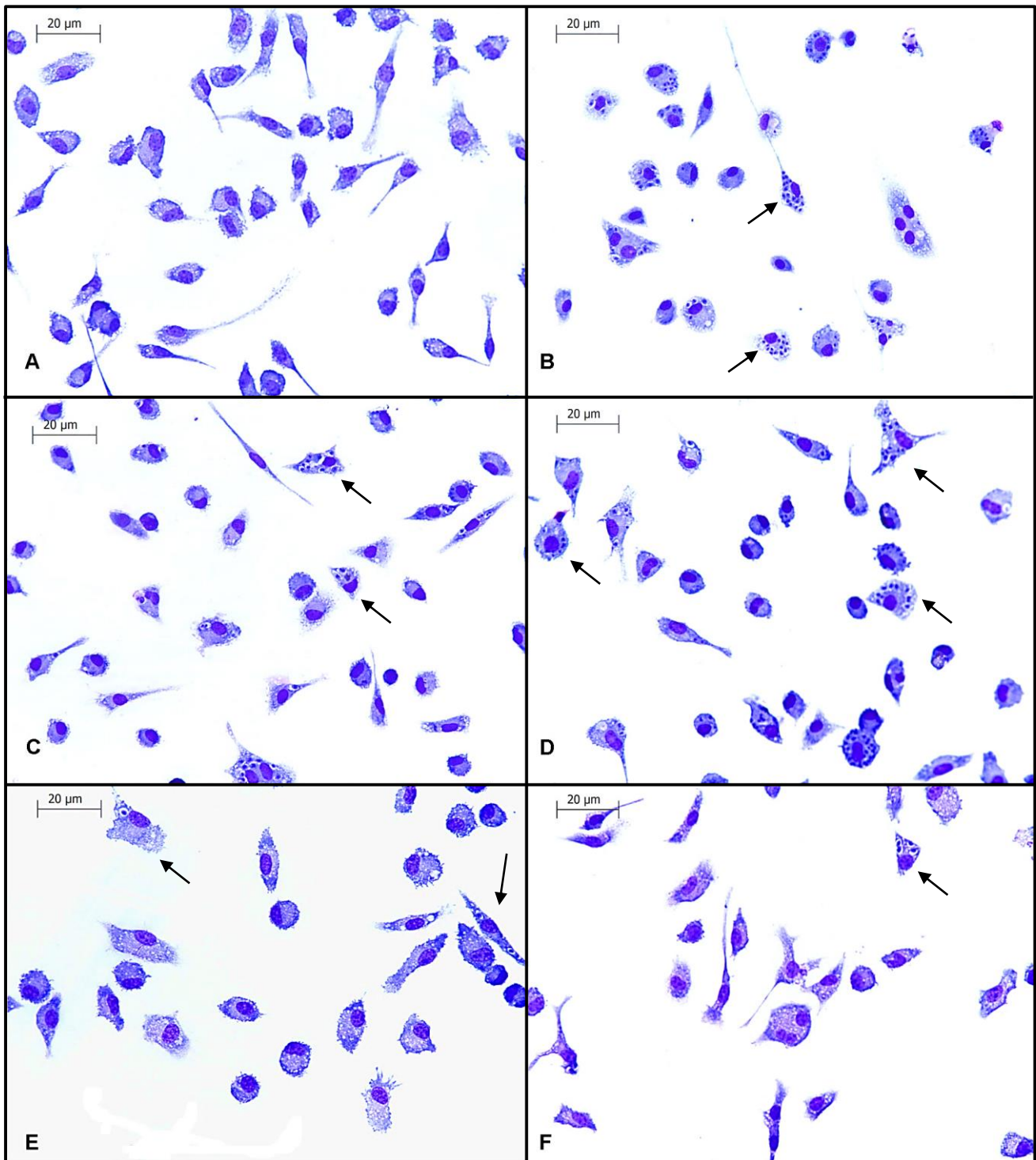
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Efeito do P-MAPA (A) e do Benznidazol (B) sobre formas amastigotas intracelulares. Cada barra corresponde à média de três experimentos independentes em duplicata. Os (\*) são significâncias obtidas pelo teste ANOVA em relação ao controle sem tratamento (\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*  $0.0001 < p < 0.001$ ; \*  $0.001 < p < 0.005$ ).

O efeito do P-MAPA sobre as formas amastigotas pode também ser visualizado em macrófagos infectados e submetidos a coloração com Giemsa

(Figura 20). CEP não infectadas possuem morfologia "espraiada" e aspecto fusiforme, com núcleo evidente (Figura 20 A). Células infectadas e não tratadas apresentavam várias amastigotas intracelulares no citoplasma em praticamente todas as células (Figura 20 B). O número de células infectadas e de amastigota por células infectadas cai drasticamente, em culturas tratadas com a maior concentração testada da droga (100 µg/mL), conforme demonstrado na Figura 20 C.

**Figura 20** – Efeito do P-MAPA sobre a infecção de células do exsudato peritoneal de camundongos infectado com *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** (A) Células sem infecção e sem tratamento; (B) Células infectadas e sem tratamento; (C) Células infectadas tratadas com 12,5 µg/mL de P-MAPA; (D) Células infectadas tratadas com 25 µg/mL de P-MAPA; (E) Células infectadas tratadas com 50 µg/mL de P-MAPA; (F) Células infectadas tratadas com 100 µg/mL de P-MAPA. Setas mostrando macrófagos contendo formas amastigotas.



Uma vez determinado os valores de LC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foi possível estimar o Índice de Seletividade (ISe) do P-MAPA, o qual se refere ao quanto um composto é mais tóxico para o parasito em relação as células do hospedeiro. Nossos resultados mostraram que tanto o P-MAPA quanto o Bz foram mais tóxicos para o parasito do que para célula do hospedeiro. O P-MAPA foi aproximadamente 3,4 e 2,4 vezes mais tóxico para as formas tripomastigotas e amastigotas, respectivamente, do que para célula do hospedeiro. O ISe encontrado para estas formas foi mais baixo, em relação ao P-MAPA, quando as células foram tratadas com a droga de referência, a qual apresentou valores de 2,1 e 1,2 para formas tripo- e amastigotas, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1** – Atividade *in vitro* do P-MAPA sobre as formas tripo- e amastigota de *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade em células de mamífero

Droga	µg/mL				ISe (tripo)	ISe (ama)
	Tripo (LC <sub>50</sub> )	Ama (IC <sub>50</sub> )	CEP (CC <sub>50</sub> )	Atividade Hemolítica (CC <sub>50</sub> )		
<b>P-MAPA</b>	78,5 ± 2,4	110,7 ± 11,6	267,0 ± 14,5	1226,8 ± 30,8	3,4	2,4
<b>BnZ</b>	0,8 ± 0,18	1,36 ± 0,4	1,69 ± 0,3	12 ± 1,0	2,1	1,2

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** LC<sub>50</sub> – Concentração que causa 50% da perda de viabilidade de formas tripomastigotas; IC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50% o número de formas amastigotas intracelulares; CC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50% a viabilidade das células de mamífero; ISe – Índice de Seletividade. CEP, células do exsudato peritoneal de camudongos.

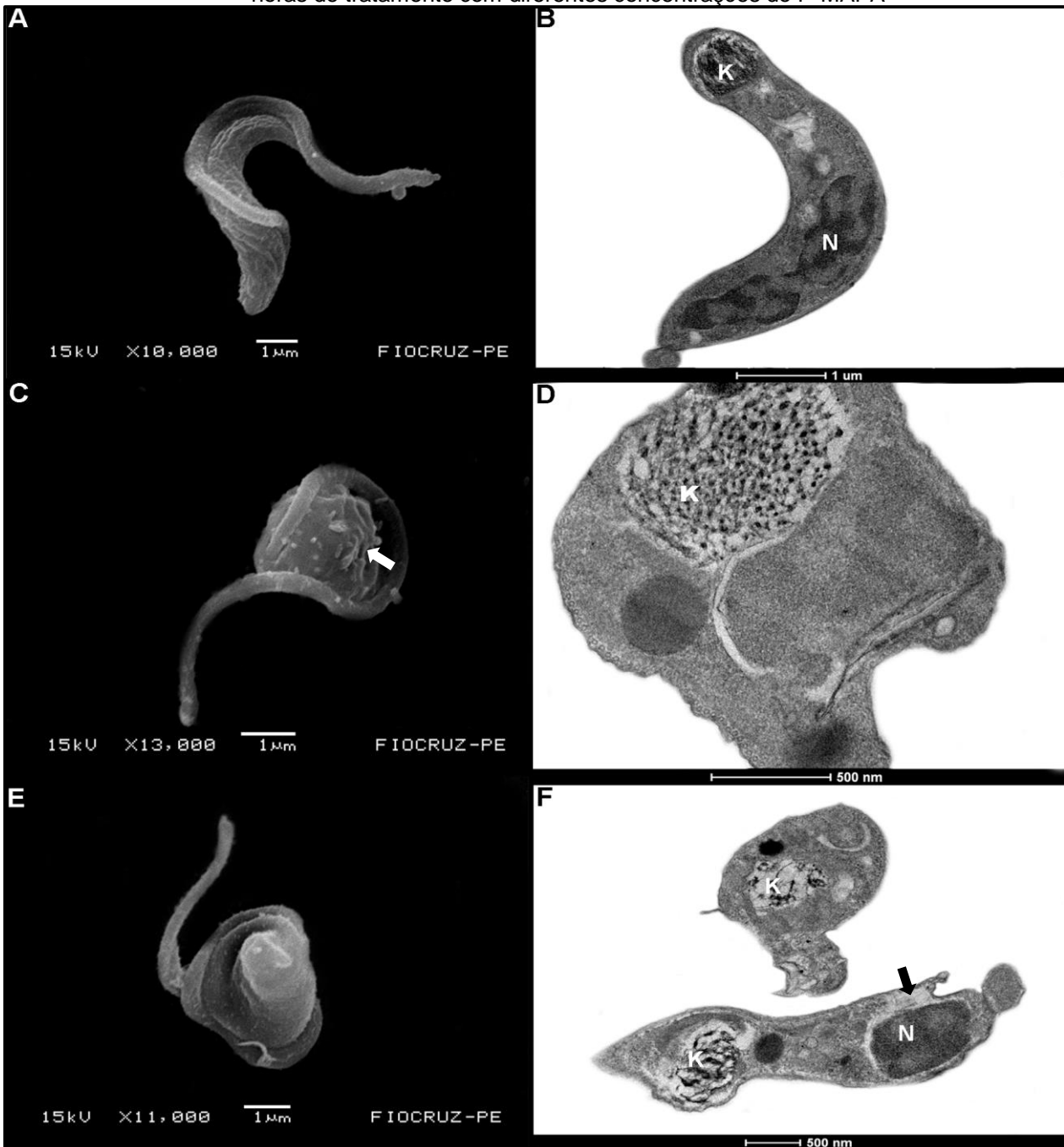
#### 6.4 Efeito do P-MAPA sobre a ultraestrutura e morfologia de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de avaliar o efeito do P-MAPA sobre a ultraestrutura e identificar possíveis alvos de ação da droga, formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com as concentrações correspondentes a 1x LC<sub>50</sub> (78,5 µg/mL) e 2x LC<sub>50</sub> (157 µg/mL) do composto e processadas como de rotina pra microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 21, coluna esquerda) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 21, coluna direita). Células sem tratamento (controles) possuem forma alongada, e a membrana apresenta aspecto liso e corpo levemente retorcido, devido a camada de microtúbulos subpeliculares como observado pela

MEV (Figura 21 A). Quando observadas por MET podemos observar a presença de núcleo alongado e centralizado, e a presença do cinetoplasto arredondado em forma de cesta contendo o DNA mitocondrial (Figura 21 B).

A MEV de células tratadas com  $1x LC_{50}$ , demonstrou um arredondamento do corpo e enrugamento substancial da superfície celular (Figura 21 C) Através da MET foi possível observar um inchaço da célula e desorganização das fibras do DNA mitocondrial (Figura 21 D e 21 F) na maioria das células observadas. Estes efeitos foram mais drásticos nas células tratadas com  $2xLC_{50}$  em relação ao observado em células tratadas com  $LC_{50}$  (Figuras 21 E- 21 F). Nestas células foi possível observar uma maior torção do corpo celular (Figura 21 E) e retração nuclear (Figura 21 F, seta).

**Figura 21** - Ultraestrutura e morfologia de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações do P-MAPA



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

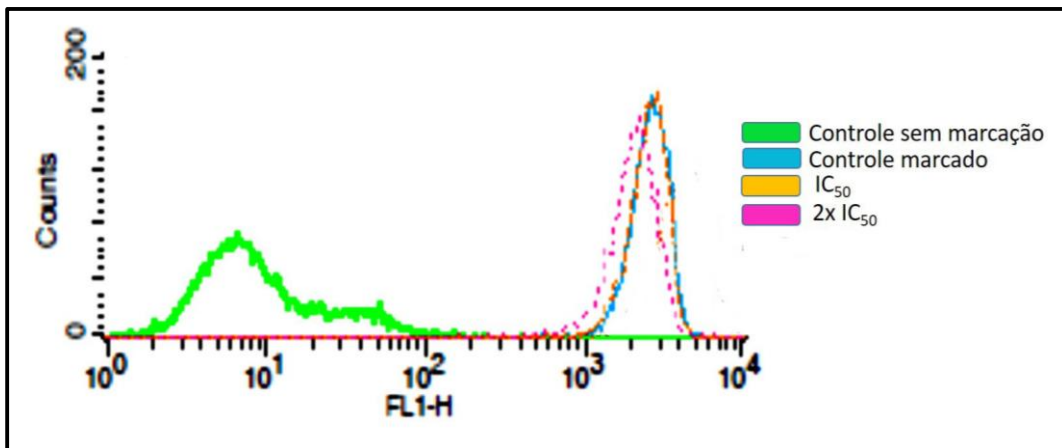
**Legenda:** (A-B) Células controles não tratadas apresentando morfologia característica de formas tripomastigota, observadas por MEV (A) e MET (B) (C-D) Formas tripomastigotas tratadas com a 1x  $LC_{50}$  do P-MAPA. Note em (C) a torção do corpo celular e enrugamento da superfície celular (seta). Em (D) podemos observar inchaço do corpo e desorganização do cinetoplasto. (E-F) Formas tripomastigotas tratadas com 2x  $LC_{50}$  de P-MAPA, mostrando o detalhe de uma forma tripomastigota apresentando corpo celular completamente torcido, aumento do volume celular (E), desorganização e rompimento das fibras do k-DNA e retração do núcleo (seta) (N) Núcleo; (K) Cinetoplasto.

## 6.5 Efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial e produção de ROS

Tendo em vista os efeitos observados sobre o k-DNA, nós também analisamos marcadores fluorescentes com objetivo de elucidar o efeito do P-MAPA sobre a fisiologia mitocondrial de formas tripomastigotas.

Inicialmente realizamos a marcação das formas tripomastigotas, controle e tratadas, com a sonda Rodamina 123. A Rodamina é um marcador que se acumula especificamente na mitocôndria de células viáveis. A análise por citometria revelou uma intensa marcação com Rodamina 123 em células controles. Células tratadas com 1x e 2x LC<sub>50</sub> do P-MAPA apresentaram um comportamento próximo do controle sem tratamento. Um discreto deslocamento para esquerda foi observado em células tratadas com 2x LC<sub>50</sub> (Figura 22) Para melhor visualizar esse dado, o índice de variação da intensidade de fluorescência da Rodamina foi calculado. Este índice informa o quanto a intensidade de fluorescência é aumentada ou diminuída quando comparamos células tratadas com células controle.

**Figura 22** – Histograma da análise por citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Histograma representativo da intensidade de fluorescência da Rodamina 123 de formas tripomastigotas tratadas com os valores de IC<sub>50</sub> (78 µg/mL) e 2 x IC<sub>50</sub> (157 µg/mL). Células não tratadas e não marcadas e células não tratadas e marcadas foram utilizadas para compensação do equipamento. As células não tratadas e marcadas foram também utilizadas como controle. FL1-H – canal de fluorescência do citometro de fluxo que analisa emissões na faixa verde (emissão/excitação: 488/525).

Os valores do índice de variação das células tratadas com 1x e 2x LC<sub>50</sub>, - 0,13 e -0,17, respectivamente, mostram uma discreta perda do potencial da membrana

mitocondrial nas células tratadas com P-MAPA em relação às células controles. No entanto os valores das medianas de fluorescência de células controles e tratadas (tanto 1x quanto 2x LC<sub>50</sub>) foram semelhantes ao das células controles não tratadas, indicando que o P-MAPA não foi capaz de alterar substancialmente o  $\Delta\Psi_m$  de formas tripomastigota de *T. cruzi* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Análise através da citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

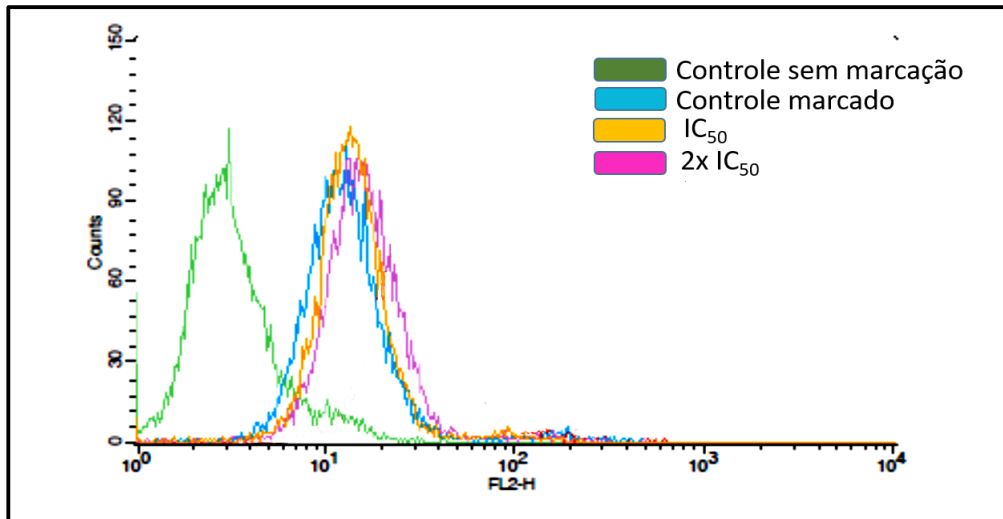
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	M	I.V
0	2347 $\pm$ 270	0
78,5 (1x LC <sub>50</sub> )	2130,8 $\pm$ 313	-0,13
157 (2x LC <sub>50</sub> )	1940,6 $\pm$ 66,7	-0,17

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** M- mediana da intensidade de fluorescência; IV- Índice de variação calculado pela fórmula  $\text{MT-MC/MC}$ , onde MT é a mediana de fluorescência das células tratadas e MC é mediana da fluorescência das células controles.

Para verificar se as alterações observadas foram induzida por estresse oxidativo foi utilizado o marcador MitoSox. Esta sonda é um fluoróculo altamente seletivo para detecção de superóxido em mitocôndria de células viáveis, sendo rapidamente oxidado pelos radicais  $\text{O}_2^-$  presentes na organela. As análises por citometria de fluxo mostraram um deslocamento para direita tanto do controle sem tratamento quanto as das células tratadas com P-MAPA. Entretanto, as alterações nas medianas da intensidade de fluorescência, do controle sem tratamento e das células tratadas não variaram muito em relação as células não marcadas. (Figura 23).

**Figura 23** – Histograma da análise por citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre a produção de ROS pelas mitocôndrias de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Histograma representativo da intensidade de fluorescência do MitoSox de formas tripomastigotas tratadas com os valores de  $IC_{50}$  (78  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $2x IC_{50}$  (157  $\mu\text{g/mL}$ ). Células não tratadas e não marcadas e células não tratadas e marcadas foram utilizadas para compensação do equipamento e como controles. FL2-H – canal de fluorescência do citômetro de fluxo que analisa emissões na faixa vermelho-alaranjado (emissão/excitação: 510/580).

Os valores da mediana de fluorescência demonstraram haver um aumento de 1.15 e 1.25 x na produção de ROS nas células tratadas com 1x e 2x  $LC_{50}$ , respectivamente, em relação ao controle, indicando um discreto aumento na intensidade de fluorescência das células tratadas em relação ao controle (Tabela 3).

**Tabela 3** – Análise através da citometria de fluxo do efeito do P-MAPA sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Condição experimental	M	I.V
Controle não tratado sem marcação	2,8 $\pm$ 0,3	0,00
Controle não tratado	11,6 $\pm$ 0,2	0,00
78,5 $\mu\text{g/mL}$ (1x $LC_{50}$ )	13,4 $\pm$ 1,9	0,20 $\pm$ 0,09
157 $\mu\text{g/mL}$ (2x $LC_{50}$ )	14,6 $\pm$ 1,4	0,32 $\pm$ 0,08

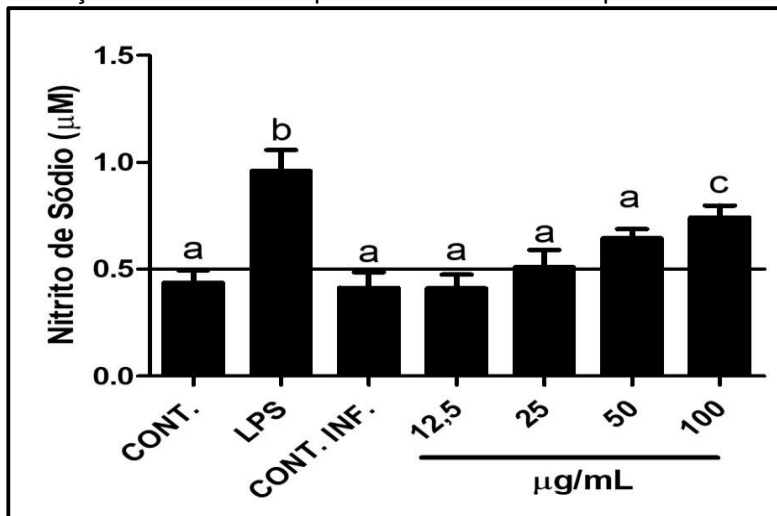
**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** M- mediana da intensidade de fluorescência.

## 6.6 Efeito do P-MAPA sobre a produção de NO

Tendo em vista que o óxido nítrico (NO - *nitric oxide*) tem um papel importante na resposta imune contra *T. cruzi*, e com base em estudos que relatam o efeito do P-MAPA sobre a produção de NO em outros modelos de infecção com patógenos, foi avaliado se o efeito sobre as amastigotas seria por ação direta da droga, ou por mecanismos que levam a produção de NO nas células. Nossos resultados mostraram que o tratamento com P-MAPA foi capaz de aumentar a produção de NO nas células infectadas com *T. cruzi* de maneira dose-dependente. Entretanto, apenas na concentração de 100 µg/mL este aumento foi considerado estatisticamente significativo em comparação tanto ao controle sem infecção quanto ao controle infectado (Figura 24). Como esperado, um aumento significativo foi observado nas células tratadas com LPS (*lipopolysaccharide from gram-negative bacteria*), o qual foi usado como estimulador da produção de NO em macrófagos.

Figura 24 – Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c



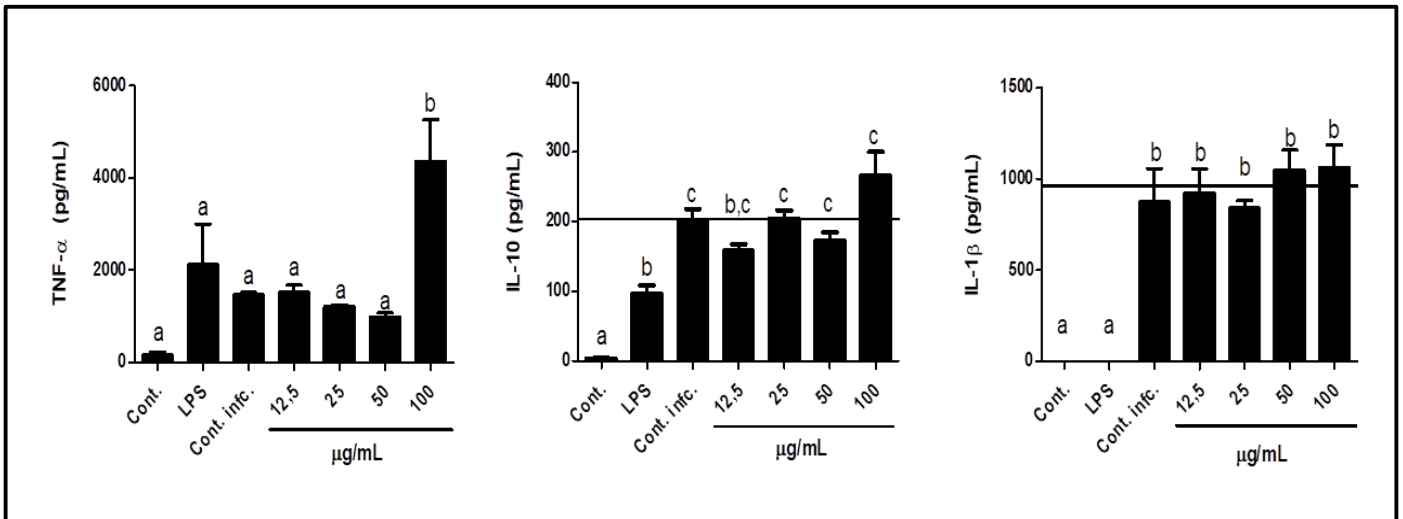
Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Quantificação de óxido nítrico em CEPs não infectadas e não tratadas, CEPs não infectadas e desafiadas com LPS, CEPs infectadas com *T. cruzi* e não tratadas, e CEPs infectadas e tratadas com diferentes concentrações do P-MAPA. Cada barra corresponde à média e desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0.05$ ), e grupos com letras iguais não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).

## 6.7 Efeito do P-MAPA sobre a produção de citocinas

Com o intuito de verificar se o P-MAPA seria capaz de alterar o perfil de citocinas em CEPs, células infectadas com *T. cruzi* e tratadas com diferentes concentrações de P-MAPA foram avaliadas quanto à citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ , e para citocina regulatória IL-10. A concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  do P-MAPA foi a única capaz de aumentar significativamente a produção de TNF, tanto em relação ao controle não tratado sem infecção quanto ao controle não tratado infectado. Embora nossos resultados demonstrem que O P-MAPA não apresentou efeito significativo na produção de IL-1 $\beta$  e de IL-10 quando comparado ao controle sem tratamento e sem infecção, o controle infectado e não tratado e LPS (Figura 25) foi possível observar uma oscilação na produção de IL-10 nas faixas de concentração de 12,5 - 50  $\mu\text{g/mL}$  com um aumento na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Já para IL-1 $\beta$  um discreto aumento em relação ao controle infectado e não tratado foi observado a partir da concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 25).

**Figura 25** – Produção de citocinas em células do exsudato peritoneal de camundongos Balb/c tratadas com diferentes concentrações de P-MAPA



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Efeito do P-MAPA sobre o perfil de citocinas em CEPs não infectada e não tratadas, CEPs infectadas com *Trypanosoma cruzi*, não tratadas ou tratadas com diferentes concentrações do P-MAPA, e CEPs desafiadas com LPS. Cada barra corresponde à média de três experimentos independentes em duplicata. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0.05$ ), e grupos que tem letras iguais não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).



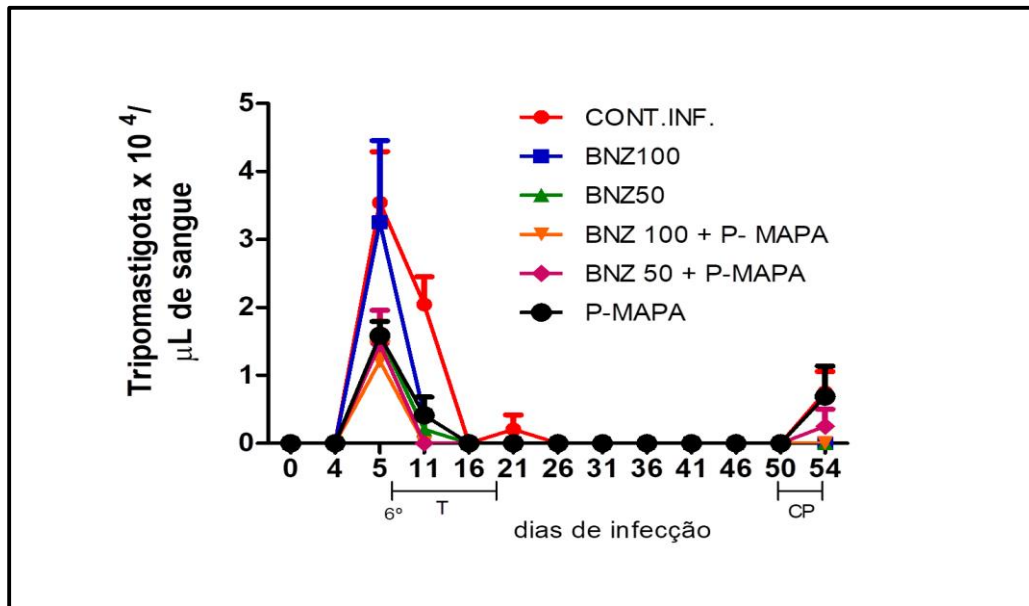
### **6.8 Parasitemia de camundongos Balb/c infectados com *Trypanosoma cruzi*, tratados com P-MAPA, Benznidazol ou associação**

A análise da parasitemia dos animais infectados mostrou o aparecimento de formas tripomastigotas no sangue a partir do 4º dia pós-infecção (dpi), sendo o pico da parasitemia no 5º dpi para todos os grupos analisados. No entanto, houve uma grande variação no número de parasitas no sangue dos camundongos antes do início do tratamento (Figura 26).

Após o início do tratamento no 6º dpi houve uma redução da parasitemia em todos os grupos tratados em relação ao grupo não tratado. Esta redução se torna mais evidente no 11º dpi sendo possível observar uma redução acentuada da parasitemia em todos os grupos de animais que receberam tratamento tanto com a droga de referência e P-MAPA isoladamente, quanto nos animais tratados com associação das duas drogas. Não foram observadas diferenças na parasitemia em animais controles sem tratamento. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na parasitemia entre os tratamentos com Bz, P-MAPA ou as associações dos dois compostos. Ao contrário do observado no controle não tratado e infectado, não foi possível identificar a presença de formas tripomastigotas nos animais tratados com o P-MAPA, Bz e suas associações, no sangue dos animais no 21º dpi (final do tratamento) (Figura 25).

Para comprovar a eficácia do P-MAPA, do Bz e das associações na eliminação do parasita, após um período de acompanhamento de 30 dias pós-tratamento os animais foram submetidos ao tratamento com imunossupressor, Ciclofosfamida (200 mg/Kg). No segundo dia após administração do imunossupressor (4º dose diária), o parasito foi detectado no exame de sangue a fresco em animais dos grupos controle sem tratamento, grupo tratado com Bz (50mg/Kg) + P-MAPA (5mg/Kg) e no grupo tratado com P-MAPA (5mg/Kg). Devido a isso, e a mortalidade observada em alguns grupos, o experimento foi finalizado logo após o primeiro ciclo de tratamento com o imunossupressor.

**Figura 26** - Parasitemia de animais infectados com *Trypanosoma cruzi* tratados com P-MAPA e/ou Benznidazol



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Legenda: CP – Ciclofosfamida; T – Tratamento.

## 6.9 Quantificação de Marcadores Bioquímicos ALT, AST e Ureia

Na busca por candidatos à fármacos contra doenças negligenciadas, deve se considerar não apenas o efeito antiparasitário, mas também os efeitos tóxicos que as drogas podem causar aos órgãos. Desta forma, os níveis séricos das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) marcadoras de hepatotoxicidade, e os níveis séricos de ureia, para identificar possíveis danos renais, foram avaliados em camundongos tratados ou não com P-MAPA e Bnz.

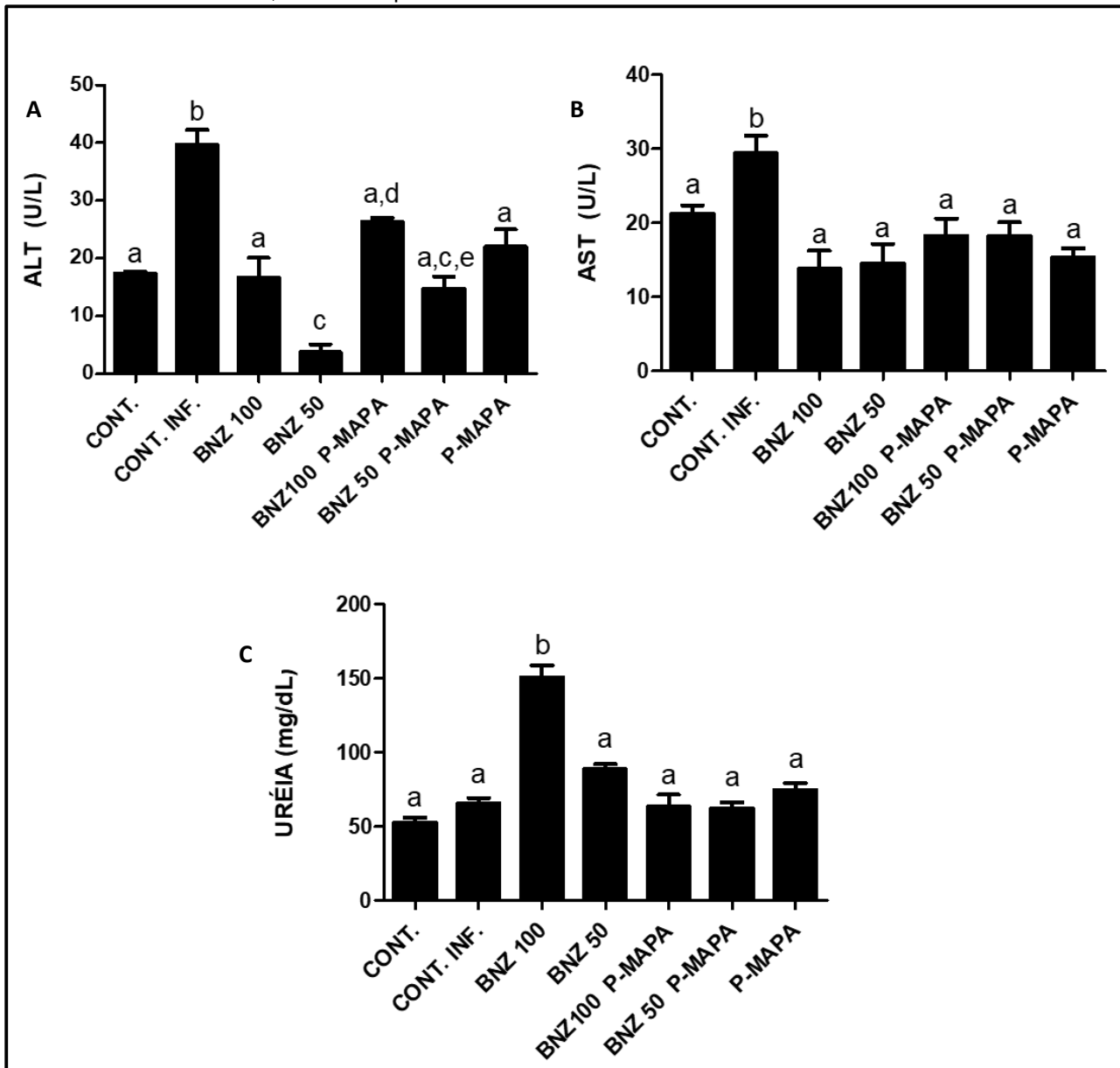
Os níveis séricos de ALT no grupo de animais infectados e não tratados apresentaram-se significativamente mais elevados quando comparado ao controle não infectado sem tratamento. Nota-se que os grupos tratados com Bz100, Bz100 + P-MAPA, Bz50 + P-MAPA e P-MAPA apresentaram nível de ALT comparáveis aos animais do grupo não infectado e não tratado. Por outro lado, o grupo infectado tratado com Bnz50 mostrou uma redução significativa da enzima em relação ao controle não infectado e não tratado. Adicionalmente, todos os grupos que receberam tratamento (Bz100, Bz50, Bz100 + P-MAPA, Bz50 + P-MAPA e P-MAPA) apresentaram níveis de ALT significativamente menor que o grupo infectado e sem tratamento (Figura 27 A).

Os níveis séricos de AST também se apresentaram aumentados, significativamente, nos animais do grupo infectados e sem tratamento quando

comparados com o controle não infectados e não tratados. O tratamento dos animais com Bz, P-MAPA e a associação das duas drogas, diminuiu significativamente em relação ao grupo infectado e não tratado, mas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo de animais não infectados e não tratados (Figura 27 B).

Os níveis de ureia também foram avaliados para identificar possíveis efeitos nefrotóxicos dos compostos. Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis séricos de ureia apenas no de animais tratados com Bz100. Tanto o grupo infectado não tratado, quanto os demais que receberam tratamento como Bz 50 e as associações deste composto com o P-MAPA não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle não infectado não tratado (Figura 27 C).

**Figura 27** - Níveis séricos de AST, ALT e Ureia em camundongos Balb/c, infectados ou não com *T. cruzi*, 24 horas após o fim do tratamento com P-MAPA e/ou Benznidazol



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Legenda: Efeito do P-MAPA isolado ou em associação com Bz sobre os níveis séricos de ALT, AST e ureia em animais controles, animais controles infectados e tratados, 24 horas após o fim do tratamento. Cada barra corresponde à média de seis animais. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significantes entre os grupos ( $p < 0.05$ ), e grupos com letras iguais não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).

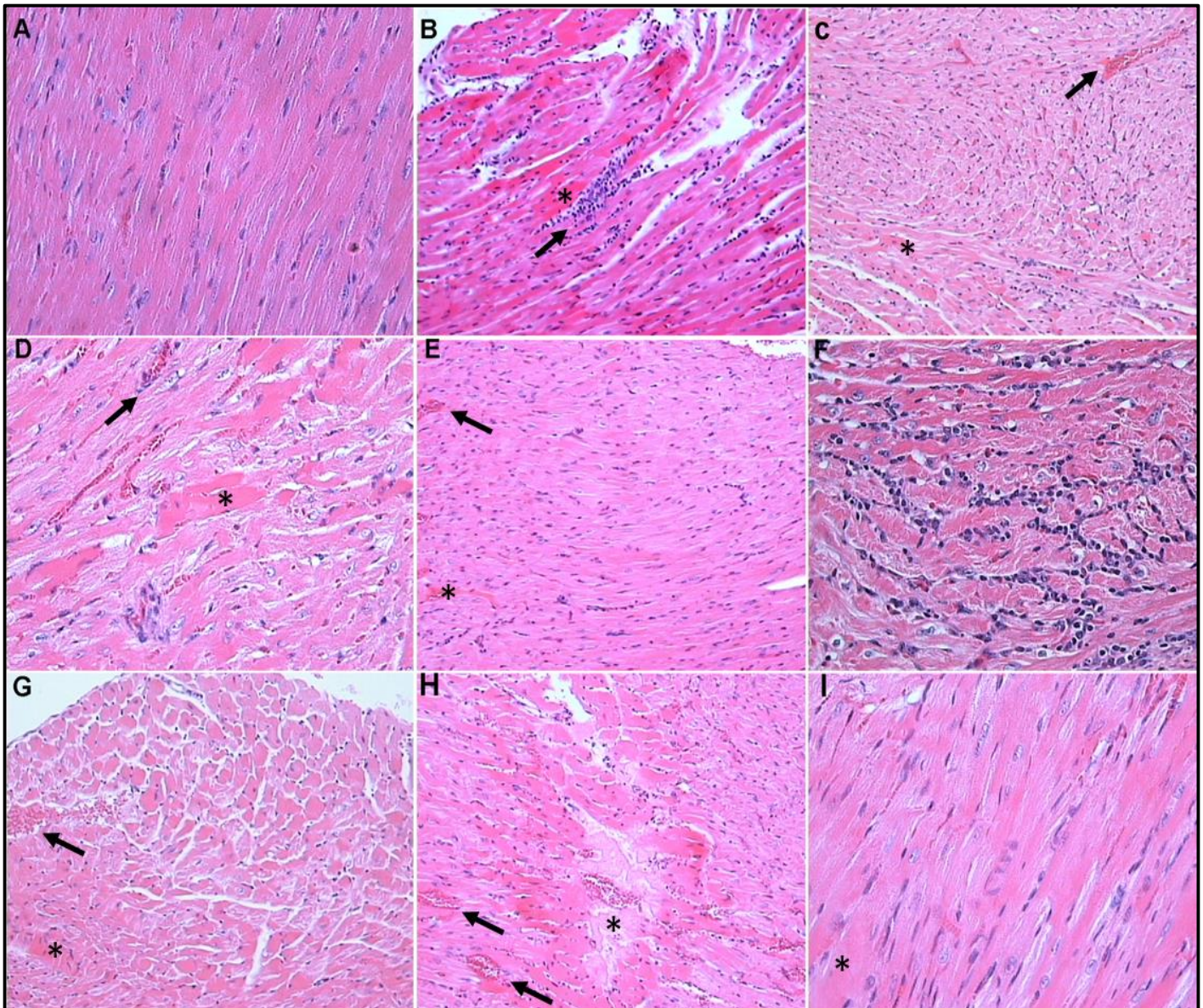
## 6.10 Avaliação Histopatológica do Tecido Cardíaco de Camundongos Balb/c

Análises histopatológicas foram realizadas com o objetivo de verificar se o tratamento com o P-MAPA interfere na progressão da patogênese da doença de Chagas, avaliando o dano tecidual e a intensidade de infiltrado inflamatório 24 horas após o término do tratamento (fase aguda da doença). O tecido cardíaco de animais sem infecção e sem tratamento apresentou as fibras cardíacas da região do miocárdio bem preservadas, com células alongadas e ramificadas, nas quais foi possível observar as estriações transversais das células. Além disso, houve discreta presença de células do sistema imune (Figura 28 A e 29 A). Por outro lado, o coração de animais infectados e não tratados apresentou intensa desorganização e degeneração das fibras miocárdicas, áreas com necrose de coagulação e perda das estriações transversais. Neste grupo, a miocardite foi significativamente mais intensa do que o grupo sem infecção e sem tratamento (Figura 29 A).

O tecido cardíaco de animais que receberam tratamento com o Bnz100 apresentou, de uma maneira geral, intensidade de infiltrado inflamatório variando de discreto a moderado e necrose de coagulação difusa e de grau moderado (Figura 29 A e B). Em adição, foram observadas áreas do tecido cardíaco com intensa degeneração de fibras miocárdicas e vacuolização difusa e de grau moderado (Figura 28 D e 29 C). Os animais tratados com Bz (50 mg/Kg) apresentaram infiltrado inflamatório discreto e difuso (Figura 29 A), necrose de coagulação das fibras em grau moderado e congestão de vasos e do miocárdio (Figura 28 E e 29 B). O grupo tratado com o P-MAPA apresentou intenso infiltrado inflamatório significativamente maior que o grupo controle sem infecção e sem tratamento (Figura 29 A). O tecido cardíaco também apresentou degeneração intensa das fibras miocárdicas, e necrose de coagulação e vacuolização das células em grau moderado (Figura 28 F e 29 B e C). Os animais que receberam como tratamento a associação do Bz 100 + P-MAPA tiveram infiltrado inflamatório discreto (Figura 29 A), necrose de coagulação de grau moderado (Figura 29 B) e presença de congestão no miocárdio (Figura 28 G e H). O miocárdio de animais tratados com Bz 50 + P-MAPA apresentou infiltrado inflamatório de grau moderado (Figura 29 A), necrose de coagulação moderada (Figura 29 B) e degeneração vacuolar das fibras miocárdicas multifocais e de grau moderado (Figura 28 I e 29 C).



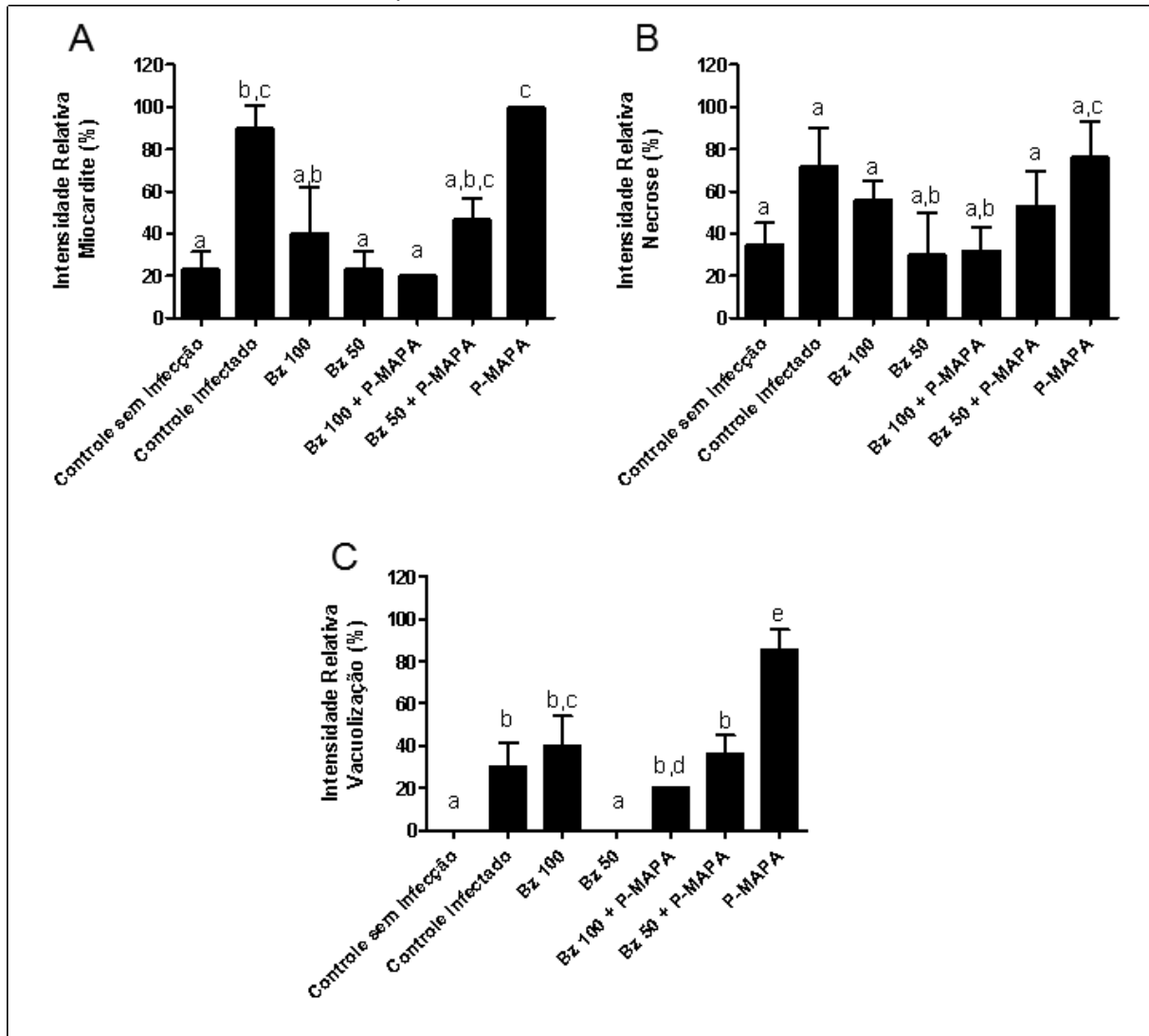
**Figura 28** - Análise histológica de tecido cardíaco de camundongo Balb/c 24 horas após o fim do tratamento com P-MAPA e/ou Benznidazol



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Análise histológica de tecido cardíaco de camundongos 24 horas após o fim do tratamento. (A) Grupo não infectado e não tratado (aumento de 400x); (B-C) Grupo infectado e sem tratamento mostrando intenso infiltrado inflamatório (seta) e áreas de necrose de coagulação intensa e difusa (\*) em (B) (aumento de 200x), já em (C) observa-se áreas com necrose de coagulação (\*) e vaso congesto (seta) (aumento de 200x); (D) Grupo infectado e tratado com Bz100 com áreas de necrose de coagulação (seta) e intenso processo de degeneração de fibra cardíaca (\*) (aumento de 400x); (E) Grupo infectado tratado com Bz50 apresentando infiltrado inflamatório discreto e difuso, necrose de coagulação (\*) e vaso congesto (seta) (aumento de 200x); (F) Grupo tratado com P-MAPA (5 mg/mL) mostrando infiltrado inflamatório mononuclear intenso (aumento de 400x); (G-H) Grupo tratado com a associação de Bz100 com P-MAPA (5 mg/mL) mostrando processo hemorrágico (seta) e necrose de coagulação em (G) (aumento de 200x) e congestão de vasos sanguíneos (setas) e deposição de fibrina em (H) (aumento de 200x); (I) Grupo tratado com a associação Bz 50 com P-MAPA (5 mg/mL) apresentando áreas com necrose de coagulação (\*) (aumento de 400x).

**Figura 29** - Intensidade dos danos cardíacos em camundongos Balb/c, infectados ou não com *T. cruzi*, 24 horas após fim do tratamento com P-MAPA e/ou Benznidazol



**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Análise relativa da intensidade dos principais danos cardíacos: miocardite (A), necrose de coagulação (B) e vacuolização (C). As percentagens foram atribuídas aos diferentes graus de intensidade (0% - ausência de dano; 20% - discreto; 40% - discreto a moderado; 60% - moderado; 80% - moderado a grave; 100% - grave), a partir da análise de dois cortes histológicos, não consecutivos. Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0.05$ ), e grupos com letras iguais não diferem significativamente ( $p > 0.05$ ).

### 6.11 Sobrevivência e avaliação da parasitemia após acompanhamento de 30 dias pós-tratamento

Para verificar a eficácia do P-MAPA, Bz e suas associações sobre a infecção experimental por *T. cruzi*, a taxa de sobrevivência dos animais foi monitorada diariamente. Nossos resultados revelaram que o grupo controle sem infecção apresentou uma sobrevida de 85,7% e 71,4%, antes e pós – tratamento com ciclofosfamida, respectivamente. Já o tratamento com Bz50, Bnz50+P-MAPA aumentou a sobrevida dos animais, com taxa de 100%. No entanto a associação do Bz 100 + P-MAPA reduziu a sobrevida do grupo, com uma taxa de sobrevivência de 28,6% (61,3% dos animais morreram) (Tabela 4).

A avaliação da parasitemia pós-acompanhamento de 30 dias foi realizada 3 dias do fim do tratamento com imunossupressor. Nossos dados mostraram que no grupo de animais infectados e sem tratamento um maior número de animais foi positivo para *T. cruzi* no exame de sangue. Contrariamente, os animais tratados com Bz100, Bz50 e Bz100 + P-MAPA a parasitemia não foi detectada. No grupo tratado com Bz50 + P-MAPA apenas 1 animal foi positivo no exame de sangue. Já no grupo tratado com P-MAPA dois animais foram positivos no exame de sangue.

**Tabela 4** – Avaliação da sobrevivência e parasitemia pós-acompanhamento de 30 dias dos camungondos infectados com *T. cruzi* e tratados com P-MAPA e/ou Bz

Grupo	Nº de positivos (exame de sangue)	Sobrevivência	
		Pré – Cy 21º dpi	Pós – Cy 57ºdp
Controle infectado não tratado	3/5	6/7 (85,7%)	5/7 (71,4%)
Bz 100	0/5	7/7 (100%)	6/7 (85,7%)
Bz50	0/5	7/7 (100%)	7/7 (100%)
P-MAPA 5	2/5	7/7 (100%)	7/7 (100%)
Bz100 + P-MAPA 5	0/5	7/7 (100%)	2/7 (28,6%)
Bz 50 + P-MAPA 5	1/5	7/7 (100%)	7/7 (100%)

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2017.

**Legenda:** Cy – Ciclofosfamida; Bz – Benznidazol; dpi – dias pós-infecção.



## 7 DISCUSSÃO

A doença de Chagas contribui para carga global das doenças cardíacas, sendo a principal causa de cardiomiopatia parasitária no mundo (BRANQUINHO et al., 2014; CHATELAIN, 2017; GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017). O tratamento da doença é limitado a duas drogas, Benznidazol e Nifurtimox, os quais são eficazes na fase aguda da doença, porém a eficácia na fase crônica é questionável. De fato, o estudo BENEFIT mostrou que o Bz reduz muito a parasitemia nos indivíduos tratados, porém não houve melhora clínica na cardiomiopatia (HOEKSTRA et al., 2016; RASSI Jr.; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Além disso, estudos realizados com o Posaconazol e Ravuconazol mostraram que ambas as drogas apresentaram resultados promissores na fase pré-clínica de testes, mas na fase clínica falharam em manter a parasitemia baixa durante o período de acompanhamento (10 meses) pós-tratamento. Apesar dos resultados obtidos por ambos os estudos, estes trabalhos contribuíram para uma melhor compreensão da patogênese da doença de Chagas, bem como padronizaram protocolos para avaliar o potencial quimioterápico de novas drogas, e reforçam a necessidade de continuar a busca por compostos contra a doença de Chagas (HOEKSTRA et al., 2016; KEENAN; CHAPLIN, 2015).

Nesse sentido, o isolamento de compostos a partir de fontes naturais é uma alternativa bastante interessante. Compostos de origem microbiana tem se tornado um importante componente na indústria biotecnológica, e os compostos derivados de fungos apresentam uma variedade de atividades biológicas já relatadas na literatura (FÁVARO et al., 2012; NG et al., 2016). Apesar deste potencial, os estudos sobre o efeito de compostos extraídos de fungos sobre tripanossomatídeos são escassos. No presente trabalho avaliamos o efeito do composto P-MAPA isolado de *Aspergillus oryzae* sobre *Trypanosoma cruzi* em modelo *in vitro* e *in vivo*.

Realizamos os testes de toxicidade do P-MAPA sobre células de mamífero utilizando dois ensaios distintos, avaliação da citotoxicidade pela técnica do MTT e a atividade hemolítica. Nossos resultados mostraram que o P-MAPA tem baixo efeito citotóxico sobre as células do exsudato peritoneal de camundongos (CEP) e hemácias de humanos, mesmo na maior concentração testada (200 µg/mL). Análises realizadas em células de fibroblasto de hamster chinês, a linhagem V-79, também mostrou que o P-MAPA não foi tóxico para essas células, mesmo na maior

concentração testada (120 µg/mL) (FARMABRASILIS, 2008e). Quando comparamos os resultados de citotoxicidade entre o P-MAPA e Bz, nosso estudo mostrou que a concentração de P-MAPA necessária para causar 50% de morte das CEPs foi 158 vezes maior do que a concentração de Bnz, enquanto que para causar a lise de 50% das hemácias foi necessária uma concentração 102 vezes maior de P-MAPA em relação ao Bz. Estes achados mostram que o P-MAPA é bem tolerado por células de mamíferos, além de ser menos tóxico do que o Bnz.

O efeito tripanocida do P-MAPA foi investigado sobre as formas tripo- e amastigotas, as quais são importantes para a patogênese da doença de Chagas. O P-MAPA apresentou uma  $LC_{50}$  de  $78,5 \pm 2,4$  µg/mL e uma  $IC_{50}$  de  $110,7 \pm 11,6$  µg/mL, para as formas tripomastigota e amastigota, respectivamente, indicando uma maior susceptibilidade da primeira forma a droga. Diferenças de susceptibilidade, às vezes significativas, entre as diferentes formas evolutivas dos tripanosomatídeos têm sido relatado na literatura, e provavelmente são devidas às diferenças no perfil metabólico e expressão de proteínas. Adicionalmente, diferenças metodológicas que são intrínsecas aos testes empregados também podem, mesmo que parcialmente, interferir nos resultados obtidos (MORAES; FRANCO, 2016).

O P-MAPA reduziu significativamente a viabilidade das formas tripomastigotas e a infecção em células CEP por formas amastigotas, mas não induziu 100% de perda da viabilidade ou eliminou totalmente a infecção, porém esta última foi drasticamente reduzida. Em comparação com o Bz, o composto apresentou baixa atividade tripanocida, no entanto a droga de escolha também não induziu 100% de morte ou debelou a infecção.

O Índice de Seletividade (ISe), o qual determina quantas vezes um composto é mais tóxico para o parasito em relação a célula de mamífero, foi calculado para avaliar se o P-MAPA tem potencial como candidato a quimioterápico contra a doenças de Chagas. Nossos resultados mostraram que o P-MAPA é 3,4 vezes mais tóxico para o tripomastigota e 2,4 vezes mais tóxico para a amastigota em relação à célula de mamífero. Segundo Romanha et al. (2010), o ISe ideal para uma droga contra a doença de Chagas dever ser maior ou igual a 50. No entanto, muitos compostos candidatos não alcançam esse índice, inclusive o Bz, único fármaco disponível para o tratamento da doença, apresenta um ISe muito a baixo do estipulado pelo grupo de Romanha. Desta forma, não existe um consenso sobre qual o valor de Ise ideal, e alguns pesquisadores utilizam os resultados de ISe do Bz

como parâmetro para determinar se um composto tem potencial como quimioterápico contra a doença de Chagas (BORGES et al., 2012; CHATELAIN; KONAR, 2015; SIMÕES-SILVA et al., 2016). Seguindo este raciocínio, o ISe do Bz também foi estimado no nosso estudo (2,1 para tripomastigota e 1,2 para amastigota), e estes índices foram aproximadamente 2 vezes menores do que os estimados para o P-MAPA, para ambas as formas evolutivas do parasito, o que sugere que o P-MAPA tenha uma atividade mais seletiva sobre o *T. cruzi*. Conseqüentemente, nossos dados mostraram que o P-MAPA é um potencial candidato à fármaco contra a doença de Chagas.

Tendo em vista que o P-MAPA reduziu a viabilidade das formas tripomastigotas, nós realizamos estudos para identificar potenciais alvos intracelulares da ação do composto. As análises morfológicas e ultraestruturais mostraram que o P-MAPA causou arredondamento e torção do corpo celular, projeções da membrana plasmática e enrugamento da superfície celular nas tripomastigotas. Além disso, o efeito do P-MAPA levou a retração do núcleo e desorganização da fibras do kDNA, sendo este último o achado mais predominante. Em conjunto, as alterações observadas nas células tratadas são indicativas da perda de viabilidade celular. A única mitocôndria presente em tripanosomatídeos parasitas possui uma série de características peculiares não encontradas em células de mamíferos, tais como a presença de diferentes enzimas antioxidantes e vias energéticas, o arranjo específico do seu DNA mitocondrial e sua plasticidade durante os diferentes estágios evolutivos destes protozoários. O DNA mitocondrial, mais especificamente os maxicírculos, são responsáveis por codificar diversos genes dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, tais como citocromo oxidase, NADH desidrogenase, e as subunidades da ATP sintase (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Desta forma, o efeito do P-MAPA sobre o k-DNA observado neste estudo pode levar a um comprometimento da transcrição de genes essenciais para o bom funcionamento da mitocôndria do parasito.

As alterações na mitocôndria identificadas nas análises de microscopia eletrônica de transmissão são geralmente associadas a perda do potencial de membrana mitocondrial. Adicionalmente, a despolarização da membrana mitocondrial está diretamente associada, entre outros mecanismos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2017; PIACENZA et al., 2013). Embora nossos resultados tenham mostrado uma discreta

despolarização do potencial de membrana e na produção de ROS nas células tratadas, podemos inferir que as mudanças morfológicas na estrutura do k-DNA observadas em nosso estudo precedem as alterações fisiológicas, as quais mesmo sendo discretas podem causar danos na célula. Por outro lado tem sido relatado que dependendo da concentração, ROS pode também agir como moléculas sinalizadoras envolvidas na ativação das defesas antioxidantes do parasita (peroxiredoxinas mitocondriais e citosólicas e tripanotiona sintetase) (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2017). Estes achados indicam que o estresse oxidativo pode funcionar como uma espada de dois gumes, por um lado estimulando a manutenção do ciclo celular, pelo menos em *T. cruzi*, por outro exercendo um efeito deletério a esta organela induzindo a morte celular (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014;). Futuros estudo são necessários para determinação do limite da produção de ROS capaz de levar o parasita a morte celular induzida por P-MAPA.

O potencial imunoterapêutico do P-MAPA vem sendo comprovado por vários trabalhos (DURÁN et al., 2009; JUSTO; DÚRAN; QUEIROZ, 2000; MELO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2013). Neste sentido, avaliamos a produção de óxido nítrico e a produção de citocinas em CEPs infectadas com *T. cruzi* e tratadas com P-MAPA para elucidar o efeito do composto sobre o controle da infecção.

A atividade tripanocida dos macrófagos é dependente da produção de óxido nítrico (NO), o qual pode ser induzido pelas citocinas TNF e IFN- $\gamma$  (DOS SANTOS et al., 2016; KOO et al., 2016). No presente estudo os resultados da quantificação indireta do NO mostraram que o P-MAPA na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , a maior concentração testada, aumenta significativamente a produção de NO em células CEPs infectadas com *T. cruzi*. Interessantemente, a concentração capaz de reduzir em 50% o número de amastigotas dentro das CEPs é  $110,7 \pm 11,6 \mu\text{g/mL}$ . Estes achados sugerem que o efeito tripanocida do P-MAPA sobre as formas amastigotas está associado ao aumento na produção de NO. Nossos dados corroboram com o estudo de Melo et al. (2014) no qual foi demonstrado que, ao estimular macrófagos obtidos de cães não infectados com *Leishmania chagasi* com P-MAPA nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ , o sobrenadante da cultura dessas células apresentavam níveis de NO aumentados significativamente em comparação com sobrenadante de macrófagos não estimulados pelo composto. Além disso, o trabalho mostrou que macrófagos de cães infectados com *Leishmania chagasi* e

estimulados com o P-MAPA a produção de NO foi significativa apenas na concentração de 200 µg/mL.

Em nosso estudo observamos que em células infectadas com *T. cruzi* e tratadas com a concentração de 100 µg/mL do P-MAPA, a produção de TNF aumentou significativamente em relação as células não infectadas e não tratadas, bem como em relação as células infectadas e sem tratamento. A indução da produção de TNF pelo P-MAPA pode estar associada a ativação do receptor TLR-2. De fato, estudos tem relatado o efeito do P-MAPA sobre este receptor em diferentes modelos experimentais. Fávares et al. (2012) avaliaram o efeito do P-MAPA sobre células HEK-293 e observaram que o composto estimulou a ativação de TLR-2 via ativação de NF-κB. Este estudo também avaliou o efeito do P-MAPA em camundongos com câncer de bexiga. Nos animais tratados também foi observado os níveis de TLR-2 estavam aumentados em comparação com grupo não tratado (FÁVARO et al., 2012). Melo et al. (2014) investigaram o efeito do P-MAPA sobre macrófagos isolados de cães saudáveis e cães infectados com *Leishmania chagasi*. Neste estudo, o grupo observou que as células, tanto de animais saudáveis quanto de animais infectados, quando estimuladas com P-MAPA apresentavam aumento na expressão de TLR-2 em comparação com macrófagos de animais não infectados e não tratados e de animais infectados e não tratados. Além disso, os autores sugerem que a via de sinalização pela qual, provavelmente, o P-MAPA estimula o receptor TLR-2 a ativar a produção de citocinas e NO é dependente de IKK e p38 MAPK, uma vez que foi observada a fosforilação destas proteínas quinase (FÁVARO et al., 2012; MELO et al., 2014). Ainda que estudos futuros sejam necessários para determinar o papel do TLR-2 na imunomodulação do P-MAPA frente a células infectadas com *T. cruzi*, nossos dados sugerem que a alta produção de TNF nas células infectadas e tratadas com P-MAPA tenha resultado de um efeito conjunto do parasito e do composto sobre o receptor TLR-2.

Contrariamente ao estudo de Santiago et al. (2013) que mostrou que o P-MAPA reduziu a produção de IL -10 em células PBMC de cães, nosso estudo mostrou que o P-MAPA não apresenta efeito significativo sobre a produção de IL-10. A citocina IL-10 tem a função de regular a resposta imune pró-inflamatória, evitando uma resposta muito intensa (DUTRA et al., 2014). Nossos dados sugerem que o aumento na produção de IL-10, ainda que não significante, foi resultado da alta produção de TNF.

Os inflamassomos são um complexo multiproteico ativado por sinais exógenos e endógenos de perigo. Quando formado, este complexo leva a ativação de caspase-1 e processa a pró-citocina IL-1 $\beta$  inativa em citocina ativa (SOUZA et al., 2017). A formação de inflamassomos no coração induz uma intensa resposta inflamatória, a qual pode levar a danos e comprometimento do remodelamento cardíaco (TOLDO et al., 2014). Na cardiopatia chagásica, a citocina IL-1 $\beta$  atua regulando a proliferação do *T. cruzi*, todavia tem sido apontado como a principal citocina envolvida na hipertrofia cardíaca em indivíduos infectados (MALVEZI et al., 2014). Nossos resultados mostraram que o P-MAPA não induziu o aumento na produção de IL-1 $\beta$ , sugerindo que o composto não ativa o complexo inflamassomo.

O P-MAPA foi inicialmente desenvolvido para o tratamento de tumores, porém o seu efeito imunomodulador, que inclui produção de citocinas pró-inflamatórias, indução da produção de NO por macrófagos, ativação de células *NK*, indução de TLR-2 e estimulação da mielopoiese, demonstram o potencial do P-MAPA para diversas aplicações terapêuticas, atuando contra uma variedade de infecções causadas por patógenos (FÁVARO et al., 2012; JUSTO et al., 2000; MELO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2013). Nosso estudo corrobora com outros autores (FARMABRASILIS, 2008e; FÁVARO et al., 2012; GARCIA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2013), comprovando que o P-MAPA não tem efeito tóxico em modelo *in vitro*. Estudos *in vivo* de toxicidade aguda e crônica, em camundongos Swiss, ratos Wistar e em primatas (*Cebus apela*), comprovaram que o composto não apresenta efeitos tóxicos (FARMABRASILIS, 2008a). Além disso, estudos de triagem de fase I mostraram que o P-MAPA não causou nenhum efeito adverso (FÁVARO et al., 2012; GARCIA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2013). A avaliação do efeito do P-MAPA sobre a infecção por *Leishmania* ssp. em cães apresentou resultados interessantes, visto que melhoram o quadro clínico dos animais acometidos e reestabeleceu a resposta imune dos animais contra o parasito (MELO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2013). Em adição, nosso estudo reforça o potencial imunomodulador do P-MAPA como indutor da produção de NO e da liberação de TNF, em modelo de infecção *in vitro* com *T. cruzi*.

Segundo Fávares et al. (2012) o P-MAPA, por apresentar um efeito imunomodulador, pode ser utilizado em associação com terapias existentes. Tendo em vista os efeitos adversos do Bz, e surgimento de cepas resistentes ao tratamento e a dificuldade de se encontrar candidatas ideias para o desenvolvimento de

fármacos, a combinação de drogas pode ser um caminho valioso para melhorar a eficácia terapêutica, já que reduz a toxicidade, além de dificultar o aparecimento de cepas resistentes (DINIZ et al., 2013). Desta forma, a combinação do P-MAPA com o Bz também foi avaliada.

A avaliação de marcadores bioquímicos, como os de função hepática e renal, tem sido empregado na avaliação da toxicidade de drogas ao organismo. Nosso estudo avaliou os níveis séricos dos marcadores ALT, AST e ureia 24 horas pós-tratamento. As enzimas ALT e AST são marcadores de função e integridade cardíaca e hepática. Níveis séricos elevados destas enzimas indicam dano celular, necrose tecidual, bem como aumento do risco de doenças cardiovasculares e infarto do miocárdio, principalmente níveis elevados de ALT (ADEYEMI et al., 2015; NOVAES et al., 2016). Nossos resultados mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* aumenta os níveis séricos de ALT e AST em comparação com o grupo não infectado. No entanto, o tratamento com P-MAPA e Bz, isolados ou em associação, foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos destas enzimas à concentrações compatíveis com o controle não infectado. Estes dados sugerem que o P-MAPA, isolado ou em associação com Bz provavelmente reduzem os danos causados pela infecção por *Trypanosoma cruzi* por meio do controle sobre a replicação do parasito.

O comprometimento da função renal é uma manifestação rara da doença de Chagas, e poucos estudos relatam as alterações funcionais e estruturais que a presença do *T. cruzi* causa aos rins. Todavia, existem evidências de que esse comprometimento está associado à diminuição do fluxo de sangue renal, devido ao dano às células dos túbulos proximais ou à presença de infiltrado inflamatório no interstício renal durante a fase aguda da doença. Já na fase crônica o indivíduo pode desenvolver glomerulopatia acompanhada de comprometimento da função renal (SILVA et al., 2017). Nossos dados mostraram que a infecção por *T. cruzi* não alterou os níveis séricos de ureia em relação ao grupo sem infecção. Interessantemente, houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis séricos de ureia apenas no grupo de animais tratados com Bz100. O comprometimento da função renal não é um efeito adverso do benznidazol e nenhum estudo, até o momento, relatou efeito nefrotóxico da droga em modelo *in vivo*. Na realidade, a nefrotoxicidade pelo uso do Bz é extremamente rara. Carrilero et al. (2011) identificaram apenas 1 caso de comprometimento renal em uma coorte de 373 pacientes com doença de Chagas crônica. Mais recentemente, Gonzáles-

Ramos et al. (2016) relataram o caso de duas pacientes que apresentaram graves efeitos adversos ao Bz, entres eles o comprometimento dos rins.

O tratamento com Bz, isolado ou em associação com o P-MAPA reduziu o infiltrado inflamatório, a necrose por coagulação e a vacuolização em comparação com o controle infectado não tratado. Estudos apontam que o Bz tem atividade anti-inflamatória em macrófagos de camundongos via inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, conseqüentemente reduzindo a produção de TNF e IL-6 (SANTOS et al., 2015). Em pacientes com a doença de Chagas na fase crônica indeterminada, o tratamento com Bz também reduz significativamente a resposta imune inflamatória, e este feito resulta em aumento da sobrevida do paciente (VALLEJO et al., 2016). O tratamento com o P-MAPA, por outro lado, aumentou o grau de intensidade de todos os achados observados.

Estudos tem demonstrado que o P-MAPA tem efeito tanto na proliferação quanto na ativação de células do sistema imune, principalmente de células T CD 8<sup>+</sup> (JUSTO et al., 2000; SANTIAGO et al., 2013). No entanto, os mecanismos pelos quais ocorrem estes efeitos ainda não foram elucidados. Além de atuar sobre a resposta imune celular, o P-MAPA tem sido apontado como indutor de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e INF- $\gamma$  (JUSTO et al., 2000; SANTIAGO et al., 2013). Sabe-se que a resposta pró-inflamatória está diretamente associada a danos cardíacos na doença de Chagas (DUTRA et al., 2014). Desta forma, é provável que a imunomodulação do P-MAPA possa ter agravado os danos observados nos animais tratados com este composto. Interessantemente, o tratamento Bnz50 + P-MAPA apresentou grau de infiltrado celular e necrose por coagulação semelhantes a dose de 100mg/Kg do Bz, porém sem apresentar congestão do miocárdio e presença de coágulos, danos associados à insuficiência cardíaca.

A administração do imunossupressor é imprescindível para comprovar a cura parasitológica, expandir uma parasitemia muito baixa para que possa vir a ser detectada (GUEDES-DA-SILVA et al., 2015). Nossos dados mostraram que apenas nos grupos tratados com Bz100, Bz 50 e Bz100 + P-MAPA os testes para detecção do *T. cruzi* foram negativos. Enquanto que nos grupos tratados com Bz50 + P-MAPA ou P-MAPA não foi obtido 100% de indivíduos negativos, todavia, houve redução no número de exames positivos.

O grande desafio no tratamento da doença de Chagas não é apenas eliminar o parasito do organismo do paciente, mas também diminuir ou evitar a progressão



do dano cardíaco, por possuir mecanismos que modulem negativamente a resposta inflamatória induzida pela infecção chagásica. Um estudo realizado por Santos et al. (2015) mostrou que não havia diferença na carga parasitária entre pacientes com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva. Assim, a eliminação do parasito do organismo não reflete em um melhor prognóstico para a doença de Chagas (VILAR-PEREIRA et al., 2016).

Além de investigar os efeitos dos diferentes tratamentos testados sobre o dano tecidual e eliminação do *T. cruzi* do organismo dos animais, avaliamos também o efeito dos compostos, isolados ou em associação, sobre a sobrevida dos animais. Nossos resultados mostraram que antes da administração da ciclofosfamida, apenas no grupo controle infectado e sem tratamento a sobrevida diminuiu, e após a administração com a o imunossupressor a sobrevida deste grupo reduziu novamente. Adicionalmente, a sobrevida dos grupos tratados com Bz100 e Bz100 + P-MAPA também reduziu após a administração da ciclofosfamida, entretanto o segundo grupo foi o que apresentou maior mortalidade dos animais.

De uma maneira geral, nossos dados sugerem que a associação Bz50 + P-MAPA foi a abordagem terapêutica que apresentou melhores resultados contra a infecção com o *Trypanosoma cruzi* em modelo *in vivo*, uma vez que reduziu os danos cardíacos a um grau comparável ao tratamento com o Bz100, a qual é a dose de escolha para o tratamento da doença de Chagas (ROMANHA et al., 2010). Além disso, a combinação Bz50 + P-MAPA, embora não tenha levado a cura parasitológica, reduziu o número de animais com exames positivos. Todavia, estudos futuros, utilizando protocolos mais robustos e avaliando outros regimes de tratamento, são necessários para comprovar a eficácia da associação Bz50 + P-MAPA. Em adição, nossos dados sugerem que o P-MAPA pode ser utilizados como adjuvante no tratamento da doença de Chagas.

## 8 CONCLUSÃO

- a) O P-MAPA tem atividade tripanocida sobre as forma tripo- e amastigota, sendo um candidato promissor contra a doença de Chagas por apresentar baixa toxicidade em células de mamífero e um índice de seletividade maior que o benznidazol;
- b) Formas tripomastigotas tratadas com P-MAPA apresentaram alterações morfológicas e ultraestruturais com perda de viabilidade celular;
- c) Nossos dados ultraestruturais apontam a estrutura k-DNA como alvo principal da ação da droga;
- d) Apesar do potencial da membrana mitocondrial e geração de ROS não terem sido substancialmente afetados pelo tratamento com P-MAPA é possível que esta discreta variação encontrada para estes parâmetros sejam suficientes para causar danos a fisiologia da mitocôndria em *T. cruzi*;
- e) O P-MAPA aumentou a produção de TNF e NO, principais moléculas envolvidas no controle da infecção por *Trypanosoma cruzi*, em células do exsudato peritoneal de camundongos, sugerindo que o efeito do composto sobre as formas amastigotas intracelulares é decorrente de sua ação imunomoduladora;
- f) O P-MAPA pode ser utilizado como uma droga adjuvante contra a doença de Chagas, já que sua associação com uma menor dose do benznidazol reduziu os danos cardíacos causados pela infecção a um grau comparável com o a dose de cura do fármaco isolado. E embora não tenha atingido a cura parasitológica, a combinação Bnz50 + P-MAPA aumentou a sobrevivência dos animais;
- g) Apesar de estudos futuros ainda sejam necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação do P-MAPA sobre o parasito e a infecção experimental

por *Trypanosoma cruzi*, nossos dados apontam o potencial adjuvante do P-MAPA contra a doença de Chagas.

## 9 PERSPECTIVAS

- a) Analisar o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas pelo tratamento com P-MAPA em modelo *in vivo* de infecção por *Trypanosoma cruzi*;
- b) Determinar o mecanismo de ação do P-MAPA em modelo *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, O.T. et al. Alkaline Phosphatase (ALP), Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) Activities in Selected Tissues of Rats Fed on Processed Atlantic Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Irvine, v. 6, p. 139-145, 2015.
- ANDRADE D. V.; GOLLOB K. J.; DUTRA W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, n. 7, e3010, 2014.
- ANNANG, F. et al. High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. **Journal of Biomolecular Screening**, Larchmont, v. 20, n. 1, p. 82-91, 2015.
- ARAUJO-JORGE, Tania C.; CASTRO, Solange Lisboa de. **Doença de Chagas: manual de experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p.
- BARRIAS E. S.; CARVALHO T. M. U.; DE SOUZA W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 4, p. 1-10, 2013.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, Hong Kong, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2013.
- BASTOS, T. M. et al. Nitro/nitrosyl-ruthenium complexes are potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* agents causing autophagy and necrotic parasite death. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 10, p. 6044-6055, 2014.
- BENZIGER, C. P.; CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas cardiomyopathy clinical presentation and management in the Americas. **Cardiology clinics**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 31-47, 2017.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 156, p. 1-16, 2016.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 19, p. 456-466, 2015.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 185, n. 6, 2015.
- BORGES, A. R. et al. Tripanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicine plants of Northeast Brazil. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 132, n. 2, p. 123-128, 2012.

BRANQUINHO, R. T. et al. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2067-2075, 2014.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 18, n. 6, p. 1-15, 2016.

CARRILERO, B. et al. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. **Revista Española de Quimioterapia**, Barcelona, v. 24, n. 3, p. 123-126, 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p. 159-218, 1909.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, Thousand Oaks, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug design, development and therapy**, Auckland, v. 19, n. 9, p. 4807-4823, 2015.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Amsterdam, v. 14, n. 15, p. 98-103, 2017.

CHEN, G.; PEDRA, J. H. F. The inflamassome in host defense. **Sensor**, Basel, v.10, p. 97-111, 2010.

COSTA T. M.; TAVARES L. B.; DE OLIVEIRA D. Fungi as a source of natural coumarins production. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 15, p. 6571 – 6584, ago. 2016.

COURA, J. R.; VIÑAS P. A.; JUNQUEIRA A. C. V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 856 – 862, nov. 2014.

CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, s. I, p. 252-258, 2009.

DANDAPANI, S. et al. Diversity-oriented synthesis yields a new drug lead for treatment of Chagas disease. **American Chemical Society medicinal chemistry letters**, Washington, v. 5, n. 2, p.149–153, 2014.

DEMAIN, A.L. Valuable secondary metabolites from fungi. In: Martin, J. F. et al. (Ed.) **Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites**. New York: Springer. 2014, p. 1–16.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA W.; CARVALHO T. M. U.; BARRIAS E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, New York, v. 10, p. 1 – 18, 2010.

DICHIARA, M. et al. Repurposing of Human Kinase Inhibitors in Neglected Protozoan Diseases. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 22, n. 12, p. 1235-1253, 2017.

DINIZ, L. F. et al., Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **Plos Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v.7, n. 8, e2367, 2013.

DOCAMPO, R. The origin and evolution of the acidocalcisome and its interactions with other organelles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 1-2, n. 3-9, p.1-19, 2016.

DOS-SANTOS, A. L. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 167, p. 67-75, 2016.

DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **Plos Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 20, n. 11, e0005422, 2017.

DURAN, M. et al. Structure and Antimalarial Activity of Immunomodulator P-MAPA. In: WORLD CONFERENCE ON MAGIC BULLETS (Ehrlich II), 2., 2008, Nürnberg. **Abstract**. [S.I.]: DPhG: ISAP: Infektliga.de, 2008.

DURÁN, N. et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 143-147, 2009.

DURÁN, N. et al. Tecnologia de nanocristais em fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 151-158, 2010.

DUSCHAK, V. G. Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease in the Last 15 Years-Period. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 74-173, 2016.

DUTRA, W. O. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 377-387, p. 2014.

FARMABRASILIS (São Paulo). **P-MAPA**: Monografia de produto. Campinas, 2008a. Disponível em:

<[http://www.farmabrasilis.org.br/interna\\_periodicos\\_publicacoes.php?id=120](http://www.farmabrasilis.org.br/interna_periodicos_publicacoes.php?id=120)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FARMABRASILIS (São Paulo). **Modelos animais para estudo de câncer:** Carcinoma pulmonar de Lewis. Campinas, 2008b. Disponível em: <[http://www.farmabrasilis.org.br/interna\\_periodicos\\_publicacoes.php?id=120](http://www.farmabrasilis.org.br/interna_periodicos_publicacoes.php?id=120)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FARMABRASILIS (São Paulo). **Propriedades biológicas:** modelos animais para estudo de doenças infecciosas - Listeriose. Campinas, 2008c. Disponível em: <[http://www.farmabrasilis.org.br/todos\\_conteudos\\_interna.php?idioma=br&id=159](http://www.farmabrasilis.org.br/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=159)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FARMABRASILIS (São Paulo). **Propriedades biológicas:** Estudo de efeito antitumoral e duração da resposta biológica induzida em Carcinoma Mamário e Plasmacitoma. Campinas, 2008d. Disponível em: <[http://www.farmabrasilis.org/todos\\_conteudos\\_interna.php?idioma=br&id=164](http://www.farmabrasilis.org/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=164)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FARMABRASILIS (São Paulo). **Propriedades biológicas:** Estudos de toxicidade e segurança – Toxicidade *in vitro*. Campinas, 2008e. Disponível em: <[http://www.farmabrasilis.org/todos\\_conteudos\\_interna.php?idioma=br&id=169](http://www.farmabrasilis.org/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=169)>. Acesso em: 20 jun. 2016.

FÁVARO, W. J. et al. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. **Infectious agents and cancer**, London, v. 18, n. 1, p. 7 – 14, jun. 2012.

FIGUEIREDO, R.C. et al. Reserosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology**, London, v. 129, n. 4, p. 431-438, 2000.

FIORAVANTI, C. H. **Fungos, instituições, máquinas e pessoas em negociação:** o percurso do P-MAPA. 2010. 259f. Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnologia) – Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

FERREIRA, L. R. P. et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 175, n. 3, p.409-417, 2014.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, London, p. 1-15, 2017.



FONSECA-BERZAL, C. et al., Biological approaches to characterize the mode of action of two 5-nitroindazolinone prototypes on *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigotes. **Parasitology**, London, v. 143, p. 1469-1478, 2016.

GARCIA, P. V. et al. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, Madison, v. 8, n. 5, p. 4427-4443, 2015.

GIRARD, R. M.B. et al. An aromatic diamidine that targets the kDNA, impairs the cell cycle in *Trypanosoma cruzi* and diminishes trypomastigote release from infected mammalian host cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 10, p. 5867-5877, 2016.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function on epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 43, n. 6, p. 651-661, 2011.

GONÇALVES, M, T. **Ação do imunomodulador P-MAPA sobre os Sistema complement e receptors do tipo Toll em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeos**. 2014. 107f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GONZÁLEZ-RAMOS, J. et al. Two cases of overlap severe cutaneous adverse reactions to benznidazole treatment for asymptomatic Chagas disease in a nonendemic country. **The British journal of dermatology**, Oxford, v. 175, n. 3, p. 604-607, 2016.

GROOM, Z. C.; PROTOPAPAS A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **International journal of general medicine**, Auckland, v. 10, p. 101-111, 2017.

GUEDES-DA-SILVA, F. H. et al. Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 12, p. 7564-7570, 2015.

HOEKSTRA, W. J. et al. Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic effect in vitro, activity in a murine model of Chagas disease, and structural characterization in complex with the target enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 2, p. 1058-1066, 2016.

INAHASHI, Y. et al. Actinoallolides A-E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. **Organic letters**, Washington, v. 17, n. 4, p. 864-867, 2015.

JIMENEZ V. Dealing with environmental challenges: Mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. **Research in Microbiology**, Amsterdam, n. 165, p. 155 – 165, 2014.

JUNQUEIRA, C. et al., The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, n. 29, p. 1-23, dez. 2010.

JUSTO, G. Z.; DURAN, N.; QUEIROZ, M. L. S. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 388, p. 219-226, 2000.

JUSTO, G.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M. L. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, London, v. 25, n. 3, p. 305-319, 2003.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, n. 7, p. 511-517, jul, 2010.

KHAN A. A. et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, Haikou, v. 4, p. 859 – 870, 2014.

KOO, S. J. Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 84, n. 12, p. 3527-3541, 2016.

KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H. A new era for Chagas disease drug discovery? **Progress in Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 54, p. 185-230, 2015.

LECHUGA, G. C. et al. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology, Drugs and Drugs Resistance**, Amstedam, v. 6, n. 3, p. 154-164, 2016.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **Expert Opinion on Drug Discovery**, London, v. 8, n. 12, p. 1479-1489, 2013.

LEPESHEVA, G. I. et al. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Disease**, Oxford, v.212, n. 9, p. 1439-1448, 2015.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting infection dynamics at the heart of Chagas disease. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 899-911, 2016.

LIDANI, K. C. F. et al. The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 607, p. 1-14, 2017.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 837 – 843, dez. 2010.

MACHADO F. S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in Bioscience**, Irvine, v. 4, p. 1743–1758, 2012.

MALVEZI, A. D. et al. Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry into cardiac cells and promotes differential modulation of the inflammatory response. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 10, p. 6157-6164, 2014.

MELO, L. M. et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, 2 MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 373-378, 2014.

MENDES DA SILVA, L. D. et al. Participation of TLR2 and TLR4 in cytokines production by patients with symptomatic and asymptomatic Chronic Chagas disease. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 85, n. 1, p. 58-65, 2017.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. The double-edged sword in the pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1- 14, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. Clear shot at primary aim: susceptibility of *Trypanosoma cruzi* organelles, structures and molecular targets to drug treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 17, p. 1212-1234, 2017.

MOLINA I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 370, n. 20, p. 1899-18908, 2014.

MORAES, C. B.; FRANCO C. H. Novel drug discovery for Chagas disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 447-455, 2016.

MORROT, A. et al. Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: two sides of the same coin in Chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 704, p. 1-10, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, 55-63, 1983.

MUCCI, J. et al. The *Trypanosoma cruzi* surface, a nanoscale patchwork quilt. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 102-112, 2017.

MUÑOZ-SARAIVA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Review**, Norwell, v. 17, n. 1, p. 45-64, jan. 2010.

NARDY, A. F. et al. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the escape from the host immune surveillance. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n. 348, p. 1-9, 2016.

NDAO, M. et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 2, p. 1167-1178, 2014.

NEPOMUCENO-MEJÍA, T. et al. Nucleogenesis in *Trypanosoma cruzi*. **Microscopy and Microanalysis**, Cambridge, v. 22, p. 621-629, 2016.

NG, T. B. et al., Fungal proteinaceous compounds with multiple biological activities. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 15, p. 6601-6617, 2016.

NOGUEIRA, N. P. et al., Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 2, e0116712, 2015.

NIYOGI, S. et al. Rab32 is essential for maintaining functional acidocalcisomes, and for growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 128, n. 12, p. 2363-2373, 2015.

NOVAES, R. D. Curcumin Enhances the Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Benzimidazole-Based Chemotherapy in Acute Experimental Chagas Disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 6, p. 3355-3364, 2016.

OLIVEIRA DE SOUZA, L. I. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 96, p. 1055-1064, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Genebra, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/#>> Acesso em: 18/03/2016

PADILLA A. M.; BUSTAMANTE J. M.; TARLETON R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 21, p. 385-390, 2009.

PAES L. S. et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.

PECH-CANUL, A. C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R. L. A brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, New York, v. 2017, p. 1-13, 2017.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2017.

PIACENZA, L. et al. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidants & redox signaling**, Larchmont, v. 19, n. 7, p. 723-734, 2013.

PRESTI, M. S. et al. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 145, p. 79-87, 2015.

RASSI, A. Jr. et al. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 735, n. 9723, p. 1388-1402, abr. 2010.

RASSI, A. JR.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, London, v. 9, p. 576-589, 2012.

RODELES, L. M. et al. Combined analysis of cross-reacting antibodies anti- $\beta$ 1AR and anti-B13 in advanced stage of Chagas heart disease. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 1545-1551, 2016

RODRIGUEZ, J. B.; FALCONE, B. N.; SZAJNMAN, S. H. Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi*: a patent review (2011-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, London, v. 26, n. 9, p. 993-1015, 2016.

ROMANHA, A.J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 6, p. 823-828, set. 2002.

SANTIAGO, M. E. B. et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Tropica**, Basel, v. 127, p. 174-180, 2013.

SATHLER-AVELAR R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, s. 1, p. 246-251, 2009.

SANTOS, E. C. et al. Concomitant Benznidazole and Suramin Chemotherapy in Mice Infected with a Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 59, n. 10, p. 5999-6006, 2015.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, Basel, v.115, n. 1-2, p. 14-21, jul-ago. 2010.

SILVA, G. K. et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. **The journal of immunology**, Baltimore, v. 184, p. 1148-1152, dez. 2010.

SILVA, G.K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 $\beta$  response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 191, n.6, p. 3373-83, 2013.

SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. H.; ANIBAL, F. F. Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: a critical review. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.25, n. 10, p. 1-14, 2014

SILVA, G. B. et al. Chagas disease-associated kidney injury – A review. **Nefrología Latinoamericana**, Caracas, v. 14, n. 1, p. 22-26, 2017.

SIMÕES-SILVA, M. R. et al. Phenotypic screening in vitro of novel aromatic amidines against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 8, p. 4701-4707, 2016.

SOUZA, C. O. et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF $\kappa$ B, independently of PPARs. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, Oxford, v. 44, n. 5, p. 566-575, 2017.

TEXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **Plos Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 6, n. 8, e1749, 2012.

TOLDO, S. et al. Formation of the inflammasome in acute myocarditis. **International journal of cardiology**, Amsterdam, v. 171, n. 3, p. 119-121, 2014.

TOLEDO, D. A. M. et al. Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. **Plos One**, San Francisco v. 11, n. 8, p. 1-22, 2016.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 62, n. 1, p. 149-156, 2015.

VALLEJO, A. et al. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 164, p. 117-124, 2016.

VILAR-PEREIRA, G. et al. Combination Chemotherapy with Suboptimal Doses of Benznidazole and Pentoxifylline Sustains Partial Reversion of Experimental Chagas' Heart Disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 60, n. 7, p. 4297-4309, 2016.

ZUMA, A. A. et al. Effect of topoisomerase inhibitors and DNA-binding drugs on the cell proliferation and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 37, p. 449-456, 2011.

ZUMA, A. A. et al. Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on *Trypanosoma cruzi*: implications for kDNA ultrastructure and replication. **Parasitology Research**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 419-430, 2015.

## Anexo A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Análise da resposta imune inata na doença de Chagas: Estudo *in vitro* e *in vivo* do papel dos inflamassomas na infecção por *Trypanosoma cruzi***, protocolado sob nº 59/2014 pelo (a) pesquisador (a) Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 03/12/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 03 de dezembro de 2017.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos <i>Mus musculus</i> BALB/c macho	912

We certify that project entitled **Análise da resposta imune inata na doença de Chagas: Estudo *in vitro* e *in vivo* do papel dos inflamassomas na infecção por *Trypanosoma cruzi***. Protocol nº 59/2014, coordinated by Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on December, 03, 2014. In present version this project is licensed and valid until December, 03, 2017.

Recife (PE, Brazil) December 03, 2014.

  
 DRA. LAURA GIL  
 Coordenadora da Comissão de  
 Ética no Uso de Animais - CEUA  
 (FIOCRUZ/CPqAM)  
 Dra. Laura Helena Vega-Gonzalez  
 Coordenadora CEUA/CPqAM



## Anexo B – Produção Científica: Artigo 1

*Molecules* **2014**, *19*, 14052–14065; doi:10.3390/molecules190914052

OPEN ACCESS

**molecules**

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

## The *in Vitro* Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*

Amanda Silva dos Santos Aliança <sup>1</sup>, Keicyanne Fernanda Lessa dos Anjos <sup>1</sup>, Thiago Nogueira de Vasconcelos Reis <sup>2</sup>, Taciana Mirely Maciel Higino <sup>1</sup>, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro <sup>3</sup>, Everton Miguel Bianco <sup>4</sup> and Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Campus da UFPE, Recife 50670-420, Brazil; E-Mails: Amanda\_alianca@yahoo.com.br (A.S.S.A.); keicyannel@yahoo.com.br (K.F.L.A.); taciana@cpqam.fiocruz.br (T.M.M.H.)

<sup>2</sup> Departamento de Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife 50740-550, Brazil; E-Mail: reistuv@gmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Imunologia Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ), Av. Moraes Rego s/n Cidade Universitária, Campus da UFPE, Recife 50670-420, Brazil; E-Mail: carolina.brelaz@gmail.com

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Química, Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Campus 1, Rua Antonio da Veiga, 140, Blumenau 89012-900, Brazil; E-Mail: ebianco@chemist.com

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: bressan@cpqam.fiocruz.br; Tel.: +55-81-2101-2556; Fax: +55-81-2101-2647.

Received: 11 July 2014; in revised form: 30 August 2014 / Accepted: 30 August 2014 /

Published: 9 September 2014

**Abstract:** Seaweeds present a wide variety of interesting bioactive molecules. In the present work we evaluated the biological activity of the dichloromethane/methanol (2:1) extract (DME) from the brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis* and its cytotoxic potential on mammalian cells. The extract showed significant inhibitory effect on the growth of promastigote forms ( $IC_{50} = 71.60 \mu\text{g/mL}$ ) and low toxicity against mammalian cells ( $CC_{50} = 233.10 \mu\text{g/mL}$ ). The DME was also efficient in inhibiting the infection in macrophages, with  $CC_{50}$  of  $81.4 \mu\text{g/mL}$  and significantly decreased the survival of amastigote forms within these cells. The selectivity index showed that DME was more toxic to both promastigote ( $SI = 3.25$ ) and amastigote ( $SI = 2.86$ ) forms than to macrophages. Increased NO production was observed in treated macrophages suggesting

## Anexo C – Produção Científica: Artigo 2

Hindawi Publishing Corporation  
 Oxidative Medicine and Cellular Longevity  
 Volume 2015, Article ID 520872, 9 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/520872>

## Research Article

# pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide

**Luis Cláudio Nascimento da Silva,<sup>1,2</sup> Neyla Maria Peretra Alves,<sup>3</sup>  
 Maria Carolina Acctoly Brelaz de Castro,<sup>4,5</sup> Taciana Mirely Maciel Higino,<sup>3</sup>  
 Cássia Regina Albuquerque da Cunha,<sup>1</sup> Valéria Rêgo Alves Peretra,<sup>4</sup>  
 Nathalia Varejão Nogueira da Paz,<sup>6</sup> Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,<sup>1</sup>  
 Maria Tereza dos Santos Correia,<sup>1</sup> and Regina Celia Bressan Quetroz de Figueiredo<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Functional Genomics, Department of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagen, Ole Maaløe Vej 5, 2200 Copenhagen, Denmark

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, s/n, Bofa Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

<sup>6</sup>Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21.941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Luis Cláudio Nascimento da Silva; [luisclaudioasilva@yahoo.com.br](mailto:luisclaudioasilva@yahoo.com.br)

Received 26 August 2014; Accepted 2 March 2015

Academic Editor: Felipe Simon

Copyright © 2015 Luis Cláudio Nascimento da Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Oxidative stress plays an important role in the induction of cell death and is associated with various pathologic disorders; therefore, the search for natural products that attenuate the effects produced by oxidant agents is greatly increased. Here, the protective effects of native lectin from *Crotalaria mollis* seeds (pCramoll) and recombinant Cramoll I (rCramoll) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in Vero cells were evaluated. Both lectins significantly attenuated the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in a concentration-dependent way. The maximum protective effects were 96.85 ± 15.59% (rCramoll) and 59.48 ± 23.44% (pCramoll). The Live/Dead analysis showed a reduction in the percentage of dead cells from 65.04 ± 3.29% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to 39.77 ± 2.93% (pCramoll) and 13.90 ± 9.01% (rCramoll). The deleterious effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell proliferation were reduced to 10.83% (pCramoll) and 24.17% (rCramoll). Lectins treatment attenuated the excessive superoxide production, the collapse of the mitochondrial membrane potential, and the lysosomal and DNA damage in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. In conclusion, our results suggest that pCramoll and rCramoll blocked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity through decreasing reactive oxygen species, restoring the mitochondrial potential, preventing the lysosomal damage and DNA fragmentation, and thus promoting cell survival and proliferation.

## 1. Introduction

Oxidative stress is characterized by an imbalance in the redox status of the cell and has been implicated in a range of

age-associated and neurodegenerative diseases, such as aging, cancer, diabetes, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [1]. The reactive oxygen species (ROS) are oxygen-containing molecules that are constitutively produced in cells as a result