



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA - EFAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II- TCC007



MAÍRA FONSECA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO ANTI-*Trypanosoma cruzi* IN VIVO DA LACTONA
SESQUITERPÊNICA GOIAZENSOLIDA ISOLADA DE
*Lychnophora passerina***

OURO PRETO

Junho/2019

MAÍRA FONSECA GONÇALVES

AVALIAÇÃO ANTI-*Trypanosoma cruzi* *IN VIVO* DA LACTONA
SESQUITERPÊNICA GOIAZENSOLIDA ISOLADA DE
Lychnophora passerina

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Farmácia da Escola de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de
Medeiros Teixeira

Coorientador: Msc Matheus Marques
Milagre.

OURO PRETO

Junho/2019

G635a Gonçalves, Maira Fonseca.
Avaliação anti-Trypanosoma cruzi in vivo da lactona sesquiterpênica
goiazensolida isolada de Lychnophora passerina [manuscrito] / Maira Fonseca
Gonçalves. - 2019.

60f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira.
Coorientador: Prof. MSc. Matheus Marques Milagre.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Lactonas. 4. Quimioterapia.
I. Teixeira, Luiz Fernando de Medeiros. II. Milagre, Matheus Marques. III.
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br

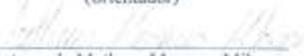


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 432ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 25 do mês de junho de dois mil e dezenove, terça-feira, realizou-se, a partir das 13 horas, na sala 03 da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Maira Fonseca Gonçalves**, matrícula 16.1.5917, intitulada **Avaliação anti-Trypanosoma cruzi in vivo da lactona sesquiterpênica Goiazensolida isolada de Lychnophora passerina**. A Banca Examinadora foi constituída pelo Prof. Thiago Berlamino de Souza, DEFAR-EF-UFOP, pela Profa. Vanja Maria Veloso, DEFAR-EF-UFOP, pelo co-orientador Doutorando Matheus Marques Milagre, CIPHARMA-EF-UFOP e pelo orientador Prof. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, DEACL-EF-UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua aprovada com nota, com a NOTA 9,5. Comunicou-se a candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 26 de junho de 2019.


Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira
(orientador)


Doutorando Matheus Marques Milagre
(co-orientador)


Prof. Dr. Thiago Berlamino de Souza


Profa. Dra. Vanja Maria Veloso


Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e disposição que me permitiram a realização deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Marta de Lana pela orientação imprescindível para realização deste trabalho, pela oportunidade e apoio durante a graduação. Por me ensinar a gostar da pesquisa científica e por ter incentivado minha busca pelo aperfeiçoamento profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira pela orientação, oportunidade e apoio na realização deste trabalho.

Ao Matheus Marques Milagre pela disponibilidade em me auxiliar, pelos ensinamentos transmitidos e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho.

À minha família e amigos pelo apoio, compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

Aos colegas do laboratório de Doenças de Chagas pela contribuição na realização do trabalho, incentivo e apoio.

RESUMO

O benznidazol (BZ) é o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas no Brasil e apresenta, como o Nifurtimox utilizado em outros países da América Latina, limitada eficácia terapêutica, especialmente na fase crônica da doença. Tendo em vista os resultados pré-clínicos obtidos por nosso grupo de pesquisa e o depósito de uma patente (PI11063025 e WO/2013/05989) utilizando outra lactona sesquiterpênica (LS) licnofolida também isolada da mesma família Asteraceae, que apresentou ação bastante eficaz anti-*T. cruzi*, inclusive em cepas 100% resistentes ao tratamento, este projeto propõe o uso de soluções farmacêuticas de uma LS isolada da planta *L. passerina*, tendo como objetivos: Estabelecer as dosagens da LS goiazensolida (GZL) para os testes de eficácia terapêutica em modelo murino a partir de um teste rápido de susceptibilidade ao tratamento, para avaliar a eficácia das formulações em camundongos experimentalmente infectados com a cepa Y de *T. cruzi* em tratamento convencional de 20 dias e avaliar por qPCR o tecido cardíaco dos animais avaliados pelo critério clássico. Esta avaliação foi o passo inicial para se pensar em novas estratégias de tratamento mais eficazes para a doença de chagas. Os estudos da eficácia da GZL foram conduzidos em camundongos infectados com a cepa Y e tratados pelas vias oral (VO) e intravenosa (IV) por 20 dias consecutivos nas doses de 1, 5 e 25 mg/kg/dia, paralelamente a grupos controles BZ 100mg/kg/dia e infectado não tratados (INT). A parasitemia dos animais foi avaliada diariamente até consistente negatificação. A eficácia do tratamento foi avaliada ainda por exames parasitológicos (hemocultura e PCR) e sorológicos (ELISA). Os animais que apresentaram todos os exames parasitológicos negativos foram avaliados pela técnica de qPCR em tecido cardíaco para verificar se houve presença de DNA de *T. cruzi* neste órgão. Na avaliação pós-tratamento em animais infectados pela cepa Y e tratados com GZL foi observada uma diminuição significativa da parasitemia a partir do 5º dia de tratamento com GZL nas doses de 1 mg/kg/dia (IV e VO) e 5 mg/kg/dia, VO e BZ 100 mg/kg/dia, quando comparados ao grupo controle INT. As taxas de sobrevivência dos camundongos tratados com GZL foram de 100% na dose de 5 mg/kg/dia VO, seguidos dos tratados com 1 mg/kg/dia IV e BZ 100 mg/kg/dia VO, que foram de 87,5%, enquanto o grupo controle INT apresentou 25% de sobrevivida. Nenhum dos camundongos foram considerados curados segundo o critério de cura adotado (MS, 2016) para a cepa Y. Estes resultados representam uma boa perspectiva do uso da GZL para o tratamento da DC a ser explorada.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Quimioterapia. Lactona sesquiterpênica. Goiazensolida.

ABSTRACT

Benznidazole (BZ) is the only available drug for the treatment of Chagas' disease in Brazil and has limited therapeutic efficacy, especially in the chronic phase of the disease, such as Nifurtimox used in other Latin American countries. Considering the pre-clinical results obtained by our research group and the filing of a patent (PI11063025 and WO / 2013/05989) using another sesquiterpene lactone (LS) licnofolide also isolated from the same Asteraceae family, *T. cruzi*, including in 100% resistant strains to the treatment, this project proposes the use of pharmaceutical solutions of an isolated LS of the plant *L. passerina*, with the following objectives: To establish the dosages of the LS goiazensolida (GZL) for the tests of therapeutic efficacy in model from a rapid susceptibility test, to evaluate the efficacy of the formulations in mice experimentally infected with the *T. cruzi* Y strain in a conventional 20 day treatment and to evaluate the cardiac tissue of the animals evaluated by the classic criterion by qPCR. This assessment was the initial step to think about new and more effective treatment strategies for Chagas disease. Studies of the efficacy of GZL were conducted in mice infected with the Y strain and treated by oral (VO) and intravenous (IV) routes for 20 consecutive days at doses of 1, 5 and 25 mg / kg / day, in parallel to control groups BZ 100mg / kg / day and infected untreated (INT). The parasitemia of the animals was evaluated daily until consistent negativation. The efficacy of the treatment was also evaluated by parasitological tests (blood culture and CRP) and serological tests (ELISA). The animals that presented all negative parasitological tests were evaluated by the qPCR technique in cardiac tissue to verify if there was presence of *T. cruzi* DNA in this organ. In the post-treatment evaluation in Y-infected and GZL treated animals a significant decrease in parasitaemia was observed from the 5th day of GZL treatment at doses of 1 mg / kg / day (IV and VO) and 5 mg / kg / day, VO and BZ 100 mg / kg / day, when compared to the INT control group. The survival rates of GZL-treated mice were 100% at the dose of 5 mg / kg / day VO, followed by those treated with 1 mg / kg / day IV and BZ 100 mg / kg / day VO, which were 87, 5%, while the control group INT presented 25% of survival. None of the mice were considered cured according to the curing criterion adopted (MS, 2016) for strain Y. These results represent a good perspective of the use of GZL for the treatment of DC to be explored.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, chemotherapy, sesquiterpene lactone, toxicity, goiazensolide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Área sobre a curva
BZ	Benznidazol
CCA-UFOP	Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNT	Controle não tratado
COX	Ciclooxigenase
DC	Doença de Chagas
d.p.t.	Dias pós tratamento
DMSO	Dimetilsilfóxido
DNA	Ácido desorribonucléico
DP	Desvio padrão
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFAR	Escola de Farmácia
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
ESF	Exame de sangue a fresco
FDA	U.S. Food and Drug Administration
G	Gramas
GZL	Goiazensolida
H9C2	American Type Culture Collection, (ATCC: CRL 1446 – Células cardiomiócitos)
HC	Hemocultura
I.V.	Intravenoso
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL-12	Citocinas pró-inflamatória
IL-1 beta	Citocinas pró-inflamatória
IL-2	Citocinas pró-inflamatória
IL-6	Citocinas pró-inflamatória

Inos	Sintase de óxido nítrico induzida
INT	Controle infectado não tratado
IP	Intraperitoneal
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LAPLAMED	Laboratório de Plantas Medicinais
LC50	Concentração da substância ativa que reduz a viabilidade celular em 50%
LC95	Concentração da substância ativa que reduz a viabilidade celular em 95%
LC100	Concentração da substância ativa que reduz a viabilidade celular em 100%
LIC	Licnofolida
LIT	"Liver infusion tryptose"
LS	Lactona sesquiterpênica
MS	Ministério da Saúde
NC	Nanocápsulas
NF	Nifurtimox
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização mundial da saúde
PAR	Parasitemia
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PM	Peso Molecular
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Período patente
PPP	Período pré-patente
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROs	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral murino-específico
TS	Tripomastigotas sanguíneos
TTm	Tratamento
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
V.O.	Via oral
WHO	"World Health Organization"

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
2.2 TRATAMENTO atual DA DOENÇA ATUAL E BUSCA POR NOVAS ALTERNATIVAS	18
2.3 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DO GÊNERO <i>Lychmophora</i> : ÊNFASE GOIAZENSOLIDA	20
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVO	24
4.1 OBJETIVO GERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. METODOLOGIA	25
5.1 COLETA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA GOIAZENSOLIDA	25
5.2 ESTUDOS DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i>	25
5.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE Goiazensolida LIVRE	25
5.4 TRATAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA EM ANIMAIS INFECTADOS PELA CEPA Y DE <i>T. cruzi</i>	25
5.5 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	26
5.6 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO	27
5.7 AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO	28
5.7.1 Hemocultura (Hc).....	28
5.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
5.7.3 Avaliação sorológica: Sorologia convencional pela ELISA (ELISA)	29
5.7.4 qPCR no tecido cardíaco	29
5.8 CRITÉRIO DE CURA	31
6. RESULTADOS	32

6.1 TESTE RÁPIDO DE SUSCEPTIBILIDADE AO TRATAMENTO DE ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA Y DE <i>T. cruzi</i> TRATADOS COM A LS POR VIA ORAL DURANTE A FASE AGUDA.	32
6.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DOS TRATAMENTOS COM GOIAZENSOLIDA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA Y DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
6.2.1 Curva de parasitemia de animais infectados pela cepa Y, tratados com goiazensolida, pela via oral e intravenosa, durante 20 dias consecutivos na fase aguda. .	33
6.2.2 Parâmetros derivados da curva de parasitemia	35
6.2.3 Hemocultura (HC).....	37
6.2.4 PCR	37
6.2.5 ELISA.....	39
6.2.6 qPCR Coração.....	40
6.2.7 Sobrevida dos camundongos.....	42
6.2.8 Eficácia do tratamento dos animais infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	42
6.3 AVALIAÇÃO GERAL DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA Y DE <i>T. cruzi</i>	43
7. DISCUSSÃO.....	44
8. CONCLUSÃO.....	48
9. REFERÊNCIAS	49
ANEXO I.....	59
ANEXO II	60
ANEXO III - PREMIAÇÃO	61
ANEXO IV-	62

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), descoberta por Carlos Chagas em 1909, é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A DC é de curso crônico e permanece, ainda hoje, negligenciada, inclusive em relação ao seu tratamento, apesar de atingir cerca de 8 milhões de pessoas e causar cerca de 12.000 óbitos por ano (OMS, 2018), constituindo atualmente um desafio global devido à sua expansão para diversos países não endêmicos de outros continentes, resultante da migração de indivíduos infectados (SCHMUNIS e YADON, 2010; COURA, 2013).

O benznidazol (BZ) é o único fármaco disponível para o tratamento da DC no Brasil e apresenta, como o Nifurtimox (NF), utilizado em outros países da América Latina, limitada eficácia terapêutica, especialmente na fase crônica da doença (COURA e CASTRO, 2002; URBINA, 2010). Estas informações ilustram as limitações do tratamento disponível atualmente e evidenciam a necessidade da avaliação de novos fármacos e/ou novos regimes de tratamento que apresentem mais efetiva atividade anti-*T. cruzi*.

Uma das novas possibilidades de tratamento da DC é a pesquisa de novas substâncias e produtos naturais que possuam atividade anti-*T. cruzi*. Produtos derivados de plantas representam uma imensa fonte de compostos que poderiam ser potencialmente ativos contra protozoários (CROFT et al, 2005; SALEM e WERBOVETZ, 2006), e apesar de terem sido extensivamente estudados, ainda existem muitos compostos a serem descobertos. O gênero *Lychnophora*, pertencente à família Asteraceae é distribuído amplamente no Brasil (BOHLMANN e JAKUPOVIC, 1990) e possui as lactonas sesquiterpênicas (LS) como marcador químico desta família de plantas. As LS contêm grupos funcionais alquilantes responsáveis por suas principais ações biológicas, bem como por seus efeitos tóxicos, sendo elas a α , β -ciclopentenona insaturada (UCHIYMA, 2009) e a α -metileno- γ -lactona (RODRIGUEZ et al, 1976; PICMAN, 1986; SCHMIDT, 2009) que atuam alquilando nucleófilos biológicos, tais como L-cisteína ou enzimas contendo sulfidrilas por adição do tipo Michael (SCHMIDT, 1997). O seu mecanismo de ação está provavelmente associado à inibição de enzimas lisossomais que conduzem, por sua vez, a inibição da síntese do DNA e, portanto a multiplicação de microrganismos unicelulares, tais como os protozoários da família Tripanosomatidae.

Estudos com produtos naturais de nosso grupo foram realizados por BRANQUINHO et al, (2014 B) utilizando a lactona sesquiterpênica (LS) licnofolida

(LIC) nanoencapsulada no tratamento de camundongos Swiss infectados experimentalmente com as cepas CL e Y de *T. cruzi* (sensível e parcialmente resistente, respectivamente) aos tratamentos com BZ e NF. Os animais infectados e tratados com LIC nanoencapsulada em dose mais elevada em formulações poliméricas foram capazes de promover 100% de cura parasitológica em camundongos infectados com ambas as cepas quando tratados na fase aguda da infecção. Estimulados com estes resultados, este estudo propõe o uso de soluções farmacêuticas de uma outra LS, a goiazensolida, isolada da planta *Lychnophora passerina*, cujos estudos iniciais *in vitro* se apresentou ainda mais ativa em *T. cruzi* (CHIARI et al.,1991; CHIARI et al., 1996) tendo como objetivos avaliar sua eficácia em modelo murino experimentalmente infectado com *T. cruzi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DC), descoberta por Carlos Chagas em 1909, é uma doença parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Ela é endêmica nas Américas Central e do Sul. Entretanto, na atualidade, a DC representa um novo desafio mundial devido a sua expansão para países não endêmicos, como os Estados Unidos, Canadá, Japão, França, Espanha, Austrália e países asiáticos, como resultado da migração de indivíduos infectados (SCHMUNIS e YADON, 2010; COURA, 2013), onde o parasito continua sendo transmitido por mecanismos independentes do inseto vetor, tais como transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplantes e uso compartilhado de seringas. Atualmente, cada vez se tornam mais presentes os relatos de contaminação oral, além de outros mecanismos de transmissão de menor importância epidemiológica (PEREIRA et al, 2010). Transmitida nas Américas por insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, a DC permanece extremamente negligenciada, com estimativa de 8 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no mundo e cerca de 12.000 mortes anuais (WHO, 2018).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado apresenta várias formas evolutivas: tripomastigotas, amastigotas, epimastigotas e esferomastigotas (NEVES et al, 2013). As formas tripomastigotas, com comprimento aproximadamente de 20 µm, são fusiformes e alongadas. Esta forma ocorre na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados e é denominada tripomastigota sanguínea, e na porção distal do tubo digestivo do inseto vetor é denominada tripomastigota metacíclico infectante, não dispondo ambas de capacidade de multiplicação. São estas as formas infectantes para os hospedeiros invertebrados e vertebrados (CIMERMAN, 2008; MARKELL et al, 2003). As formas amastigotas são esféricas com o cinetoplasto visível, podendo ser encontradas no interior das células dos hospedeiros infectados e reproduzidas em cultivo celular. Estas formas se multiplicam por fissão binária e não possuem flagelo livre (LOZANO, 2011; NASCENTE, 2010), sendo também infectantes para o hospedeiro vertebrado quando ingeridas ou inoculadas. As formas epimastigotas e esferomastigotas ocorrem no hospedeiro invertebrado. As epimastigotas possuem formas alongadas e seu flagelo surge na porção anterior ao cinetoplasto, apresentam mobilidade muito intensa e se multiplicam por divisão binária simples no intestino do vetor ou em meio

de cultura acelular (NEVES et al, 2013), e não são infectantes para os hospedeiros vertebrados. As esferomastigotas por sua vez, apresentam-se sob uma forma esférica circundada por flagelo, não possuem capacidade de multiplicação e se transformam em epimastigotas, sendo encontradas no estômago do vetor (CIMERMAN, 2008).

A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre quando as fezes e urina do inseto vetor, contendo os tripomastigotas metacíclicos infectantes que se acumulam na ampola retal destes insetos, contaminam mucosas, conjuntivas e/ou superfícies corporais lesionadas tais como o orifício da picada por onde penetram e atingem as células hospedeiras dos hospedeiros vertebrados. Estas formas evolutivas, ao penetrarem invadem os fagócitos mononucleares sendo capazes de escapar de seus mecanismos de destruição e se transformarem em amastigotas no citoplasma destas células, aproximadamente 35 horas pós-infecção. Posteriormente, estes se transformam em tripomastigotas sanguíneos quando são liberados por ruptura celular e alcançam o sistema circulatório sendo potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada (GARCIA e AZAMBUJA, 1991; LANA e MACHADO, 2010) ou para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo, completando assim o ciclo evolutivo do parasito.

A infecção pelo *T. cruzi* determina no homem quadros clínicos com características muito variadas (PRATA, 2001; RASSI et al, 2010). Após a infecção e um subsequente período de incubação, tem-se o início da fase aguda da DC (PRATA, 2001). Essa fase da doença se apresenta, na grande maioria dos casos, na forma oligossintomática. Quando sintomática pode apresentar manifestações clínicas variadas, tais como: febre, edema, mialgia, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca e sintomas neurológicos em casos de maior gravidade (RASSI, 2010). Na fase aguda podem ocorrer ainda os fenômenos de porta de entrada inicial do parasito, tais como o edema palpebral (sinal de Romana) e subcutâneo (chagoma de inoculação), que auxiliam muito na suspeita clínica da DC (PRATA, 2001). Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, as manifestações clínicas da fase aguda regridem e instala-se gradativamente a fase crônica na qual a parasitemia é escassa, mas persistente por toda a vida do indivíduo. A fase crônica pode ser subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista (PRATA, 2001; RASSI et al, 2010). A forma indeterminada é definida como um estado no qual o indivíduo apresenta-se assintomático, mas com sorologia positiva, xenodiagnóstico e/ou hemocultura e PCR positivos ou não, dano cardíaco discreto causado pela persistente inflamação, que não reflete em alterações no ECG convencional, e em exames radiológicos do tórax e abdômen. A

forma clínica indeterminada dura cerca de 10 a 20 anos, ou mesmo pelo resto da vida do paciente (PRATA, 2001; RASSI et al, 2010). Cerca 30 a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas sintomáticas da DC crônica. A forma clínica cardíaca, que ocorre em cerca de 30% dos casos, é caracterizada por sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e alterações eletrocardiográficas de gravidade variável. Ela é responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da doença pela ocorrência frequente do fenômeno de morte súbita (PRATA, 2001; RASSI et al, 2010). A forma digestiva (10% dos casos) é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais do esôfago e do cólon, principalmente. Pacientes com a forma mista apresentam sintomatologias cardíaca e digestiva associadas (PRATA, 2001; RASSI et al, 2010).

Devido a peculiar epidemiologia da DC, caracterizada pela diversidade de situações de risco, tais como grande número de vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de infecção, diferentes estoques do parasito que circulam nos ambientes domiciliares, peridomiciliares e silvestres, ausência de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo, esta endemia continua sendo um complexo problema de saúde pública para os países endêmicos, a exemplo do Brasil (DIAS e SCHOFIELD, 2002). Além do mais, não existe um entendimento mais completo da fisiopatologia e evolução desta doença (COURA e CASTRO, 2002; DIAS et al, 2008). Somado a isso, o fármaco disponível, o Benznidazol, tem se mostrado pouco eficaz e apresenta diversos efeitos colaterais, e requer longo período de tratamento (BZ 60 dias). Esses aspectos colaboram para uma baixa adesão dos pacientes ao tratamento desta enfermidade (ESPUELAS et al, 2012). O BZ se mostra mais ativo na fase aguda da doença e menos ativo na fase crônica (CASTRO et al, 2006) apresentando aproximadamente 15% de cura devido, principalmente, à baixa permeabilidade celular, que dificulta a penetração do fármaco no citoplasma das células hospedeiras, onde as formas amastigotas estão alocadas (LOZANO et al, 2015).

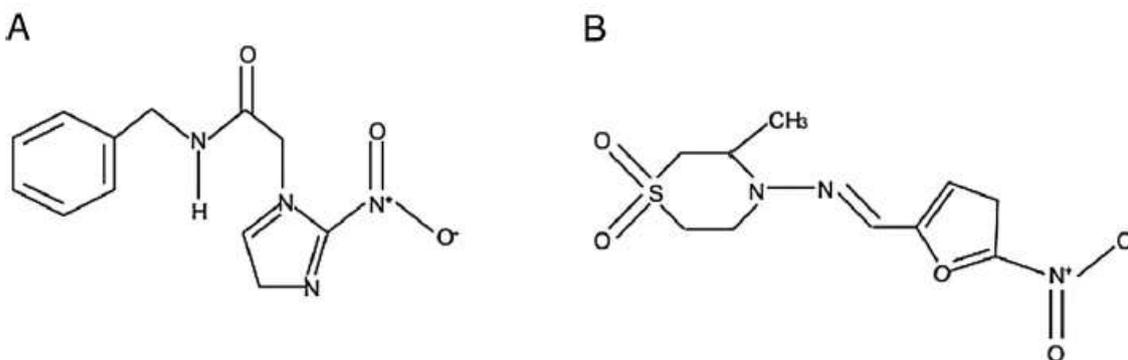
Dessa forma, considerando as dificuldades encontradas no tratamento da DC, a pesquisa de novos medicamentos permanece negligenciada, aliada ao desinteresse por parte das indústrias farmacêuticas de investir em novas alternativas de tratamento devido à relação histórica da DC com a pobreza e ainda ao reconhecimento da associação das lesões da fase crônica a componentes auto-ímmunes (CUNHA NETO e KALIL, 1996). Porém, a partir da compreensão da importância da presença de *T. cruzi* como desencadeador e mantenedor dos fenômenos patológicos, aliada a avanços substanciais na compreensão dos mecanismos

imunopatogênicos, novo vigor foi dado aos estudos de novos alvos e estratégias terapêuticas para esta parasitose. Nos últimos anos, diversos estudos apresentaram novos compostos com atividade promissora anti-*T. cruzi*, ou mesmo uma nova abordagem de uso para aqueles compostos já existentes (NOGUEIRA e SILVA et al, 2008; BUCKNER et al, 2011; 2012; MAXIMIANO et al, 2011; BAHIA et al, 2013; SOEIRO et al, 2013).

2.2 TRATAMENTO ATUAL DA DOENÇA ATUAL E BUSCA POR NOVAS ALTERNATIVAS

O atual tratamento da DC é baseado em dois compostos nitroheterocíclicos: O NF e BZ. Ambos foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70, sendo a produção do primeiro descontinuado na década de 80, e recentemente reintroduzido na clínica e distribuído pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) para os países latinos americanos, exceto o Brasil. O benznidazol também teve sua produção interrompida até ter sua patente repassada ao Brasil (Laboratório LAFEPE) e Argentina (Laboratório ELEA). O Laboratório LAFEPE em PE é atualmente o responsável pela sua produção no Brasil, cuja oferta ainda é limitada e controlada pelo Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais. Ainda hoje, mais de um século após a descoberta desta enfermidade, o BZ e o NF são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento humano, mesmo após grandes esforços na busca de novos compostos (COURA e CASTRO, 2002; URBINA, 2010).

Figura 1: Estrutura química do Benznidazol (A) e do Nifurtimox (B).



Os mecanismos de ação destes compostos ainda são pouco conhecidos. O mecanismo de ação do NF envolve redução do grupo nitro em radicais nitro aniônicos instáveis que

produzem metabólitos altamente reativos e tóxicos, como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1990; MAYA et al, 2007). O BZ também age causando estresse redutivo, porém envolvendo reações covalentes de macromoléculas, originadas pela nitroredução de radicais intermediários e vários componentes celulares como RNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (DOCAMPO, 1990; MAYA et al, 2007; MUÑOZ et al, 2011). Devido ao mecanismo de ação pouco específico do BZ, são observadas uma gama elevada de reações adversas que culminam, muitas vezes, no abandono do tratamento por parte dos indivíduos chagásicos, como: (I) sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema generalizado; (II) depressão do sistema imune; (III) polineuropatia e parestesia (COURA e CASTRO, 2002). O NF se notabiliza ainda mais pela vasta apresentação de efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais (anorexia, perda de peso, náusea, vômito e diarreia) que ocorrem em cerca de 70% dos pacientes (CASTRO et al, 2006). Além de todos esses efeitos colaterais descritos, ambos requerem longos períodos de tratamento (BZ 60 dias e NF até 90 dias), sendo que todos esses aspectos colaboram para a baixa adesão dos pacientes ao tratamento desta enfermidade (ESPUELAS et al, 2012).

Uma importante questão no tratamento com esses dois fármacos nitroheterocíclicos é que suas eficácias quimioterápicas variam em pacientes advindos de diferentes áreas geográficas. Esse comportamento é provavelmente relacionado com as diferentes respostas aos fármacos que as variadas cepas de *T. cruzi* apresentam (URBINA; DOCAMPO, 2003), sendo algumas linhagens genéticas resistentes a um dos fármacos ou, via de regra, a ambos (FILARDI e BRENER, 1987; ANDRADE et al, 1992; TOLEDO et al, 1997).

Estas informações ilustram as limitações do tratamento disponível atualmente e evidenciam a necessidade da avaliação de novos fármacos ou novos regimes de tratamento que apresentem atividade anti-*T. cruzi*. Uma das vertentes na busca por novas metodologias de tratamento da DC é a pesquisa por novas substâncias e produtos naturais que possuam atividade anti-*T. cruzi*. Produtos derivados de plantas representam uma imensa fonte de substâncias que poderiam ser potencialmente ativas contra protozoários (CROFT et al, 2005; SALEM e WERBOVETZ, 2006), e apesar de terem sido extensivamente estudadas, ainda existem muitas substâncias a serem descobertas. Tendo em vista a grande diversidade de espécies de plantas medicinais no vasto território brasileiro, fica notório o potencial de substâncias naturais a serem pesquisadas e testadas como alternativas terapêuticas para várias enfermidades (BOLZANI et al, 2009). Dados do Ministério do Meio Ambiente (2007)

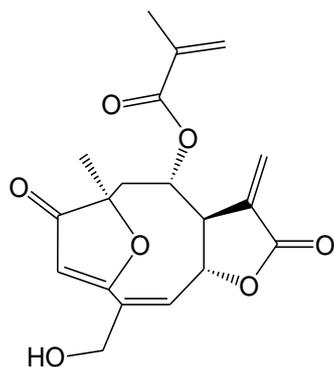
estimam que das mais de 50 mil espécies de plantas, 775 são chamadas “plantas do futuro”, por apresentarem propriedades intrínsecas capazes de prevenir e erradicar enfermidades nacionais e até mesmo internacionais, sobre as quais o estudo deve ser estimulado.

2.3 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS DO GÊNERO *Lychnophora*: ÊNFASE GOIAZENSOLIDA

O gênero *Lychnophora* (pertencente à família Asteraceae) é distribuído amplamente no Brasil, sendo sua ocorrência desconhecida fora de nosso país (BOHLMANN e JAKUPOVIC, 1990). Muitas espécies desta família são usadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, sendo estas lactonas descritas como seus principais constituintes ativos (WAGNER et al, 2006).), que em geral são medidas quimicamente pela presença de carbonilas α , β -ciclopentenona insaturada (UCHIYMA, 2009) e a α -metileno- γ -lactona (RODRIGUEZ et al, 1976; PICMAN, 1986; SCHIMIDT, 2009). As LS são os principais metabólitos secundários do gênero *Lychnophora* (SANTOS et al, 2003), sendo algumas de suas espécies conhecidas na medicina popular como “arnica”, “falsa arnica”, “candeia” ou “arnica da serra” devido ao odor semelhante à arnica europeia (CERQUEIRA et al, 1987; OLIVEIRA et al, 1996). Esta classe de micromoléculas é considerada marcador químico da família Asteraceae, de onde a grande maioria de substâncias com enorme variedade estrutural foi isolada (SEAMAN, 1982).

O mecanismo de ação das LS está provavelmente associado à inibição de enzimas lisossomais que conduzem, por sua vez, a inibição da síntese do DNA e, portanto a multiplicação de microrganismos unicelulares, tais como os protozoários da família Tripanosomatidae. Uchiyama (2009) sugeriu que a atividade tripanocida destes compostos são, em grande parte, dependentes da formação de uma ligação covalente entre a porção γ -lactona e nucleófilos (reação com o grupo-SH).

Figura 2: Estrutura química da Goiazensolida.



A realização dos testes *in vivo*, para avaliação da eficácia terapêutica em modelo murino, experimentalmente infectados por *T. cruzi*, proposto neste estudo, foi motivada pelos resultados *in vitro* realizado por OLIVEIRA et al (1996) e SAÚDE et al (1998). Esses autores realizaram o estudo fitoquímico das espécies *L. passerina*, *L. trichocarpha* e *L. pinaster*, e demonstraram sua elevada atividade tripanocida. Dentre os constituintes químicos isolados destas espécies, destacaram-se as LS: 15-desoxigoiazensolida, goiazensolida, isocentraterina e licnofolida. Da *L. passerina* isolou-se a goiazensolida (GZL), que inibiu 100% da cepa Y de tripomastigotas sanguíneos na concentração de 240 µg/mL (OLIVEIRA et al, 1996). Valores de IC₅₀ e IC₁₀₀ obtidos na literatura de ambos os compostos GZL e BZ, tendo a GZL IC₁₀₀/24h para tripomastigotas sanguíneos de 240 µg/mL (Oliveira et al, 1996) enquanto BZ demonstrou IC₅₀/24h de 3,3 µg/mL (da Silva et al., 2013). Observa-se uma relação de maior segurança no uso de BZ em relação à GZL em ambos os tempos de incubação quando comparados os IS de tripomastigotas sanguíneos. Porém, ao se comparar os valores obtidos através da análise em amastigotas, observa-se um valor de IS muito superior para GZL. Tais atividades, bem como seus efeitos tóxicos gerais, têm sido atribuídas à presença de dois grupos funcionais alquilantes: α-metileno- γ -lactona; α, β-ciclopentenona insaturada. Não são raros os casos onde substâncias com potente ação citotóxica, como é o caso da GZL (DOS SANTOS et al, 2004; VONGVANICH et al, 2006; REN et al, 2012), sejam também ativas contra parasitos como o *T. cruzi*, como revisado por ROMERO e MORILLA (2010), provavelmente devido à redução da capacidade de multiplicação do parasito, similarmente ao que ocorre nas células tumorais. Entretanto, certas desvantagens devem ser contornadas antes do uso desta classe de compostos: extração em baixas concentrações das fontes naturais, biodisponibilidade limitada devido à alta lipofilia, perfis toxicológicos desfavoráveis e a

existência de interações não-específicas com grupamentos tíois de enzimas e proteínas vitais (GHANTOUS et al, 2010).

Trabalhos utilizando produtos naturais foram realizados por BRANQUINHO et al, (2014) com a lactona sesquiterpênica (LS) licnofolida (LIC) onde realizou-se o tratamento de camundongos Swiss experimentalmente infectados com as cepas CL (sensível) e Y (parcialmente sensível) de *T. cruzi* aos tratamentos com BZ e NF. Os animais infectados e tratados com LIC em solução apresentaram redução significativa da parasitemia e aumento de sobrevivência em relação aos grupos controles, porém sem levar à cura dos animais; já a LIC nanoencapsulada em formulações poliméricas de longa circulação com superfície polimérica covalentemente ligada ao polietilenoglicol (PEG) foram capazes de promover 100% de cura parasitológica em camundongos infectados com as duas cepas quando tratados na fase aguda da infecção. Mais tarde, o uso de doses mais elevadas de LIC-NC por via oral curou 100% dos animais tratados nas fases aguda e crônica da infecção por cepa de *T. cruzi* totalmente resistente aos tratamentos usuais (BZ e NF) (LANA et al, 2014).

Com isso, atualmente se investe na avaliação da lactona sesquiterpênica, goiazensolida (GZL), que tem os mesmos grupos funcionais alquilantes da licnofolida, LS já bastante estudada pelo nosso grupo e com atividade tripanocida comprovada *in vitro* e *in vivo*. Neste trabalho será dada ênfase à eficácia terapêutica anti-*T. cruzi* da lactona sesquiterpênica goiazensolida (GZL) em modelo murino.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando as dificuldades e complexidades encontradas no tratamento da doença de Chagas, visto que o BZ é o único medicamento disponível no Brasil, apresentando baixa eficácia terapêutica principalmente na sua fase crônica, elevada toxicidade, além da existência de cepas do *T. cruzi* com níveis distintos de resistência ao tratamento. Este trabalho se justifica por buscar um tratamento mais eficaz para a DC, através de um **desenvolvimento pré-clínico de um novo fármaco** de origem natural, cujo ativo foi isolado de planta brasileira e muito promissor considerado os estudos já realizados *in vitro*.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma solução contendo a lactona sesquiterpênica (LS) goiazensolida e determinar sua eficácia terapêutica em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as dosagens da LS goiazensolida para os testes de eficácia terapêutica em modelo murino a partir de um teste rápido de susceptibilidade ao tratamento.
- Avaliar a eficácia das formulações em modelo murino experimentalmente infectado com a cepa Y de *T. cruzi* em tratamento convencional de 20 dias segundo o critério clássico de cura.
- Avaliar por qPCR o tecido cardíaco dos animais.

5. METODOLOGIA

5.1 COLETA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA GOIAZENSOLIDA

A goiazensolida (GZL) foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora passerina*, conforme descrito por Ugoline et al, 2017, e previsto para a realização deste trabalho pelo Laboratório de Plantas Medicinais (LAPLAMED) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

O benznidazol (2-nitroimidazol- (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida), adquirido de LAFEPE/PE (Lote: 16070001), foi utilizado como um medicamento de referência em comparação com o GZL.

5.2 ESTUDOS DA EFICÁCIA *IN VIVO*

Para realização dos experimentos *in vivo* o projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP com seu protocolo 2016/45. Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas com idade entre 28 a 30 dias, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Para este estudo, os animais foram inoculados com a Cepa Y (FILARDI e BRENER 1987).

5.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE GOIAZENSOLIDA LIVRE

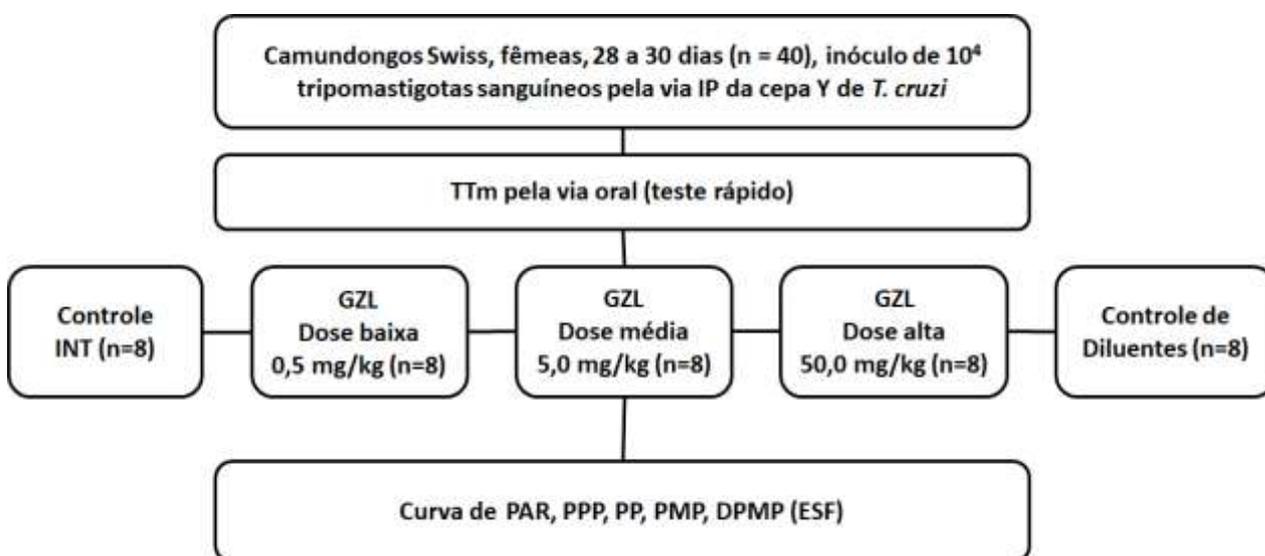
As doses da GZL livre por via oral e endovenosa foram determinadas numa curva dose resposta, segundo estudos *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA et al., 1996; MONTAVANI et al.,1993). A GZL foi dissolvida em mistura de DMSO – Cremofor – H₂O (13%, 22%, 65% respectivamente).

5.4 TRATAMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA EM ANIMAIS INFECTADOS PELA CEPA Y DE *T. cruzi*

Para determinar quais são as doses ativas ou eficazes para o tratamento da DC experimental em camundongos utilizando a GZL, foi feito um estudo piloto de tratamento para determinação de uma curva dose-resposta empregando os dados obtidos da curva de

parasitemia avaliada por sete dias consecutivos, segundo proposto por ROMANHA et al, (2010). Dessa forma, grupos com oito camundongos fêmeas, Swiss, infectados pela cepa Y de *T. cruzi* foram tratados por via oral com doses crescentes e logarítmicas da GZL (0,5; 5,0 e 50,0 mg/kg/dia) por cinco dias consecutivos sendo a parasitemia determinada por sete dias consecutivos.

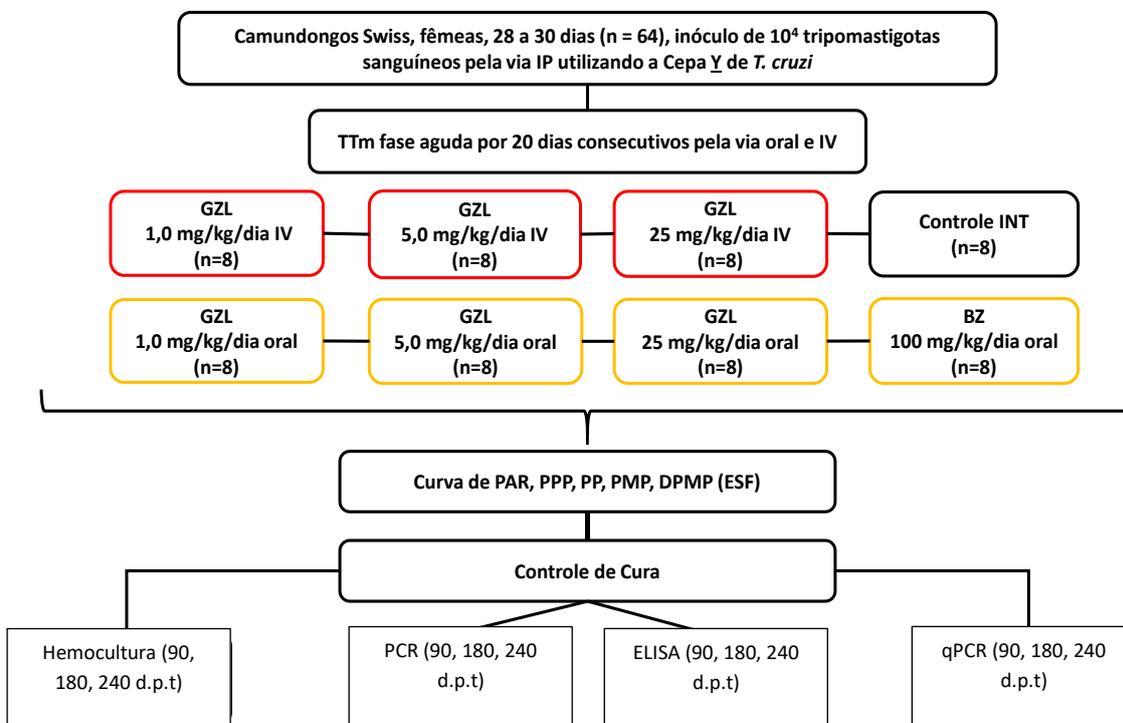
Figura 3: Delineamento experimental da avaliação da atividade tripanocida da lactona sesquiterpênica goiazensolida em concentrações crescentes e logarítmicas, pela via oral, para determinação de curva dose-resposta em teste rápido de parasitemia em camundongos.



5.5 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os testes *in vivo* foram feitos em grupos de oito camundongos inoculados com as cepas Y de *T. cruzi*. Para o tratamento da fase aguda os animais foram inoculados pela via intraperitoneal (IP) com inóculo de 10.000 tripomastigotas sanguíneos obtido no dia de pico de parasitemia e quantificado segundo a técnica de BRENER (1962). O tratamento por via oral e intravenosa foram feitos com a GZL em diferentes doses de 1,0 mg/kg/dia; 5,0 mg/kg/dia e 25,0 mg/kg/dia pela via IV e VO, traçadas à partir da curva dose resposta, de acordo com os resultados dos estudos *in vivo*, em paralelo ao tratamento clássico com BZ em suspensão (100 mg/kg/dia- VO) - e todos os controles: controles infectado não tratado (INT) e controle de diluentes (CD). O tratamento da fase aguda foi iniciado no 5º dia pós-infecção, onde deu-se início o período patente (FILARDI e BRENER, 1987). As administrações das doses foram feitas por via IV e VO, durante 20 dias consecutivos.

Figura 4: Delineamento experimental da avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* da lactona sesquiterpênica goiazensolida em diferentes doses administradas por via oral e intravenosa em camundongos Swiss fêmeas, inoculados com a cepa Y.



5.6 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO

A contagem da parasitemia (PAR) foi feita diariamente ao longo da fase aguda da infecção por meio do exame de sangue a fresco (ESF) coletado da veia caudal do animal (BRENER, 1962). A contagem dos parasitos teve início no 5º dia, onde foi possível observar os primeiros parasitos na corrente sanguínea. O tratamento dos animais iniciou no primeiro dia de parasitemia patente por 20 dias consecutivos, uma dose por dia. A curva de PAR foi plotada utilizando a média diária da PAR dos animais. Da curva de parasitemia foram determinados o período pré-patente (PPP), período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PM) e dia do pico máximo de parasitemia (DPM) e a área sob a curva (AUC). A sobrevivência dos animais foi expressa em porcentagem cumulativa ao longo de toda experimentação.

5.7 AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO

5.7.1 Hemocultura (Hc)

A coleta de sangue para a avaliação por HC foi realizada 90, 180 e 240 dias pós-tratamento (d.p.t.) apenas nos animais que apresentarem exame de sangue a fresco (ESF) negativo. Para tal, foi coletada do plexo venoso orbital uma amostra de 0,2 ml de sangue que foram adicionados a um volume de 3 mL de meio LIT (Liver Infusion Triptose), homogeneizado e incubado à 28°C, segundo a técnica descrita por FILARDI e BRENER (1987). Os tubos foram homogeneizados diariamente e aos 30, 60, 90 e 120 dias após a coleta, uma lâmina contendo uma gota da hemocultura foi examinada ao microscópio ótico para verificação da presença ou não de parasitos.

5.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realização desta técnica, foram coletados 0,2 mL de sangue do plexo orbital de cada animal aos 90 e 180 e 240 dias após o tratamento que foram imediatamente adicionados à 0,4 mL de solução de guanidina (Guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,2M/ pH 8,0, como descrito por ÁVILA et al, (1991). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante sete dias e em seguida fervidas a 100°C durante 5 minutos para a clivagem do DNA (BRITTO et al, 1993). Uma alíquota de 0,2 mL do lisado foi submetida à extração do DNA utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega) seguindo todas as recomendações do fabricante.

A mistura reacional para a PCR foi preparada contendo 10mM cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl)/pH 9,0, 0,1% de Triton X-100 (Tampão PCR 10x, Invitrogen São Paulo, SP, Brasil), 75mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão PCR 10x, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 3,5mM cloreto de magnésio (MgCl₂ – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA), 0,5U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 10 pmoles de cada iniciador #121 (AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA) e #122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) descritos por DEGRAVE *et al.*, (1988). A amplificação do DNA foi processada em um termociclador PTC-150 (MJ Research, Ramsey, MA, EUA) nas seguintes condições: 35 ciclos assim descritos: uma fase inicial de desnaturação a 95 °C, 5 minutos, seguida pelo

anelamento a 65°C por 1 min e etapa final de extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de 33 ciclos com temperatura de extensão de 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento de 65°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C, 1 minuto; um último ciclo com temperatura de extensão de 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 65°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão por 10 minutos. O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel eletrônico.

Para descartar a hipótese de contaminação durante o processo de extração e da amplificação, foram realizados os seguintes controles: controle negativo; controle positivo; controle de reagentes e controle interno da reação (amostras negativas serão submetidas à amplificação do gene TNF- α).

5.7.3 Avaliação sorológica: Sorologia convencional pela ELISA (ELISA)

A técnica de ELISA foi utilizada como controle de cura após tratamento para detecção de Imunoglobulina G total (IgG) anti-*T. cruzi* de acordo com a metodologia estabelecida por VOLLER et al,(1975) e já padronizada no Laboratório de Doença de Chagas, NUPEB, UFOP (SANTOS et al, 2012). As coletas foram feitas nos tempos de 90, 180 e 240 d.p.t.

5.7.4 qPCR no tecido cardíaco

A técnica de qPCR em tecido cardíaco foi realizada em 240 d.p.t após a necropsia dos animais dos diferentes grupos experimentais. O protocolo padronizado por Caldas (2012) foi utilizado para realização da técnica. Os fragmentos do coração dos camundongos, previamente armazenados a -80°C, foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi e pesados fragmentos entre 15-30 mg. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA total utilizando o kit WizardTM Genomic DNA Purification (Promega[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Para a digestão enzimática dos fragmentos de coração, foram adicionados aos tubos 30,0 μ L de Proteinase K (Sigma-Aldrich[®], USA) na concentração de 20,0 mg/mL. Para realizar a detecção do DNA do parasito em fragmentos de coração de camundongos por qPCR, fez-se necessário construir uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito comparativamente. Utilizou-se formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura, até atingir o número total de $1,0 \times 10^8$ parasitos contados em câmara de Neubauer, os quais foram submetidos ao mesmo protocolo de extração de DNA

utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega®) seguindo todas as recomendações do fabricante (idem ao realizado com as amostras teste). Em seguida, a concentração e a qualidade do DNA obtido foram determinadas por espectrofotômetro (Nanodrop, GE Healthcare Products).

As amostras foram analisadas em duplicata para amplificação do DNA de *T. cruzi* e em cada reação de qPCR foram utilizados 3,0 µL da amostra extraída diluída, contendo 30,0 ng de DNA genômico e 5,0 µL de “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega®) e 10uM de cada iniciador. Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3' (Caldas et al. 2012). Na mesma placa também foi realizada em unicata a reação para dosar o fator alfa de necrose tumoral murino-específico (TNF-α), utilizado como controle endógeno. Os iniciadores para o TNF-α foram: TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3', e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCATAGCACTTAGACCCC-3' - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3' (Caldas et al. 2012). Cada placa de reação de 96 poços continha a curva padrão (em triplicata), criada a partir de uma solução obtida pela extração de DNA na concentração de $1,0 \times 10^8$ epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Dessa solução, procederam-se diluições seriadas em água ultrapura autoclavada (1:10) para obter os pontos da curva, que foi medida a partir de DNA equivalente a $1,0 \times 10^5$ até de $1,0 \times 10^0$ parasito. A placa continha poços com controle negativo da reação, com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi analisada em triplicata (duplicata para *T. cruzi* e unicata para TNF-α). O programa de termociclagem consistiu em três etapas: (i) aquecimento a 95 °C por 2 minutos; (ii) 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60,0 °C por 1 minuto; (iii) desnaturação inicial a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 30 segundos e resfriamento até 60 °C por 15 segundos (*melting curve stage*). As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp® Optical 96 - Well Reaction Plate (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos - Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA).

5.8 CRITÉRIO DE CURA

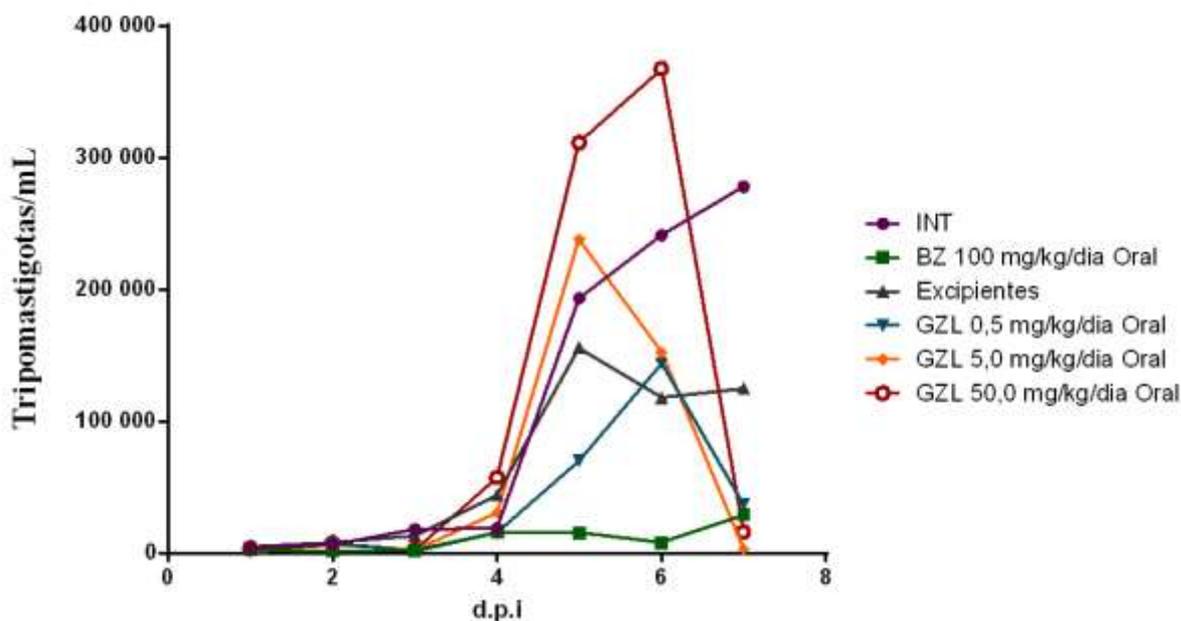
Foram considerados curados aqueles animais que apresentaram simultaneamente todos os testes parasitológicos (HC e PCR) e sorológicos (ELISA) negativos conforme o critério clássico de cura (OMS, 2005). Os animais que apresentaram todos os exames parasitológicos negativos foram avaliados pela técnica de qPCR em tecido cardíaco para verificar se houve presença de DNA de *T. cruzi* neste órgão para o qual a cepa de *T. cruzi* em estudo apresenta especial tropismo.

6. RESULTADOS

6.1 TESTE RÁPIDO DE SUSCEPTIBILIDADE AO TRATAMENTO DE ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA Y DE *T. cruzi* TRATADOS COM A LS POR VIA ORAL DURANTE A FASE AGUDA.

Foi observada uma maior redução da parasitemia nos animais tratados com a GZL nas menores doses (GZL 0,5 mg/kg/dia oral e GZL 5,0 mg/kg/dia VO, respectivamente) quando comparados ao grupo controle INT. O grupo tratado com a maior dose de GZL (50,0 mg/kg/dia VO) apresentou a maior parasitemia quando comparado aos demais grupos tratados e não tratados. Os animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia, tratamento clássico de uso deste composto nos estudos de quimioterapia em modelo murino, apresentaram maior redução da parasitemia quando comparados aos grupos tratados com a GZL nas três doses testadas (**Figura 5**).

Figura 5: Curvas de parasitemia média do teste rápido com a goiazensolida e benznidazol em camundongos infectados com as cepas Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados pela via oral por cinco dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.



INT: Grupo Controle infectado não tratado; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com benznidazol na dose de 100,0 mg/kg/dia; GZL 0,5 mg/kg/dia VO: Grupo infectado tratado com GZL na dose de 0,5 mg/kg/dia; GZL 5,0 mg/kg/dia VO: Grupo infectado tratado com GZL na dose de 5,0 mg/kg/dia; GZL 50,0 mg/kg/dia VO: Grupo infectado tratado com GZL na dose de 50,0 mg/kg/dia; Excipientes: Grupo controle infectado tratado com Cremophor + solventes DMSO e H₂O; d.p.i.: dia pós-infecção.

6.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DOS TRATAMENTOS COM GOIAZENSOLIDA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

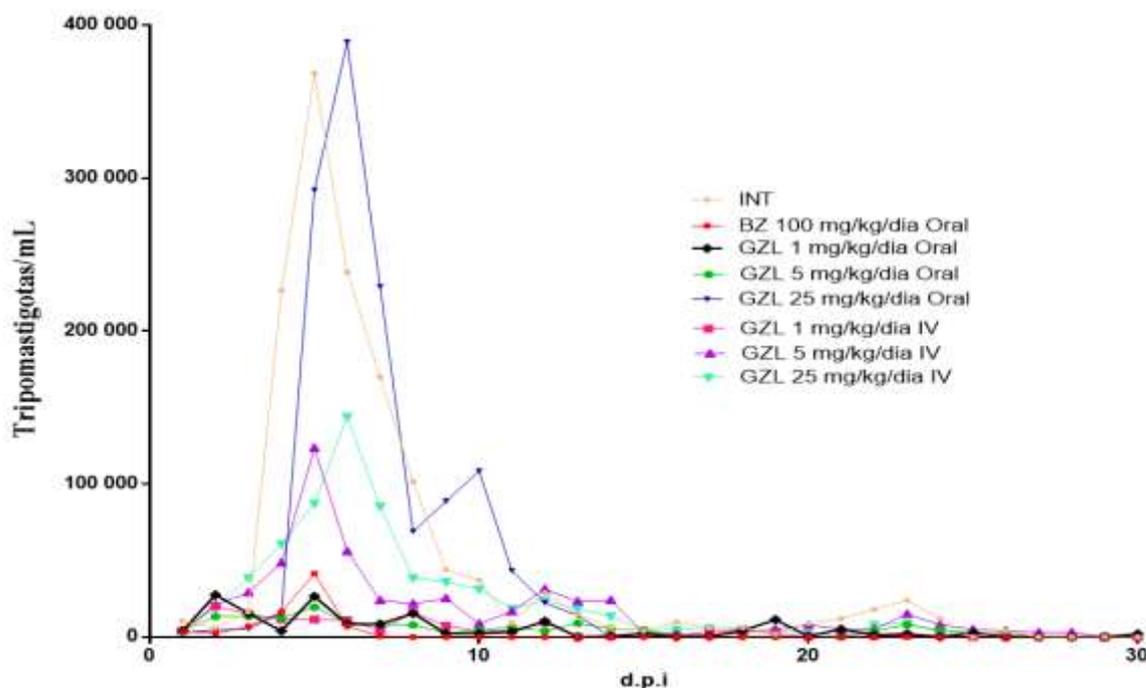
6.2.1 Curva de parasitemia de animais infectados pela cepa Y, tratados com goiazensolida, pela via oral e intravenosa, durante 20 dias consecutivos na fase aguda.

Os animais dos grupos infectados e tratados com GZL 1 mg/kg/dia VO, GZL 5 mg/kg/dia VO, GZL 1 mg/kg/dia IV e BZ na dose de 100 mg/kg/dia VO apresentaram área sob a curva de parasitemia (ASC) semelhantes entre si ($15,025 \pm 10,3042$; $14,725 \pm 18,9727$;

13,2 ± 6,4036 e 7,675 ± 5,1856, respectivamente), com redução significativa da parasitemia em relação ao grupo controle INT e GZL 25 mg/kg/dia VO [(123,8 ± 61,6186 e 122,4 ± 39,5414, respectivamente) ($p < 0,05$) (**Figura 6**)].

O grupo tratado com a maior dose de GZL (25 mg/kg/dia VO) apresentou a maior ASC dentre os grupos tratados com GZL, sendo seu valor semelhante ao grupo INT (122,4 ± 39,5414 e 123,8 ± 61,6186, respectivamente). Apenas os grupos tratados com GZL 25 mg/kg/dia VO e IV e o grupo 5mg/kg/dia IV observou-se diferença estatística entre os grupos tratados com GZL ou BZ, os demais grupos não foi observado diferença estatística (**Figura 6**).

FIGURA 6: Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com goiazensolida pelas vias oral e intravenosa por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.



INT: grupo controle infectado não tratado; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com benznidazol na dose de 100,0 mg/kg/dia; GZL mg/kg/dia VO: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via oral; GZL mg/kg/dia IV: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia por via intravenosa; d.p.i.: dia pós-infecção.

6.2.2 Parâmetros derivados da curva de parasitemia

Ao analisar a curva de parasitemia dos animais tratados por 20 dias consecutivos (**Figura 6**) observou-se que o parâmetro PMP mostrou uma redução significativa nos animais tratados com GZL 1 mg/kg/dia VO e GZL 5 mg/kg/dia VO ($45,50 \pm 27,63$ e $30,00 \pm 26,96$, respectivamente) em comparação aos grupos controles INT e GZL 25 IV ($407,0 \pm 190,9$ e $482,5 \pm 190,3$, respectivamente) ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). Todos os animais tratados, com exceção dos tratados com GZL 25 mg/kg/dia VO, apresentaram PMP semelhantes entre si (**Tabela 1**). Os grupos infectados e tratados com GZL não apresentaram diferença estatística quanto ao parâmetro DPMP, com exceção do grupo GZL 25 mg/kg/dia IV que diferiu estatisticamente dos grupos tratados com GZL 1 mg/kg/dia IV e GZL 5 mg/kg/dia VO ($12,00 \pm 7,528$; $3,571 \pm 2,299$ e $3,500 \pm 1,414$, respectivamente) [$p < 0,05$]. (**Tabela 1**). Da mesma forma, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos avaliados quanto ao parâmetro PPP (**Tabela 1**). Em relação ao PP, foi observado diferença estatística entre o grupo BZ 100 mg/kg/dia e os grupos tratados com GZL 1 mg/kg/dia VO, GZL 5 mg/kg/dia oral e GZL 1 mg/kg/dia IV (5.625 ± 0.9161 ; 22.25 ± 7.046 ; $22,25 \pm 5,898$ e $18,88 \pm 4,673$, respectivamente), sendo BZ o que apresentou o menor PP ($p < 0,05$) (**Tabela 1**).

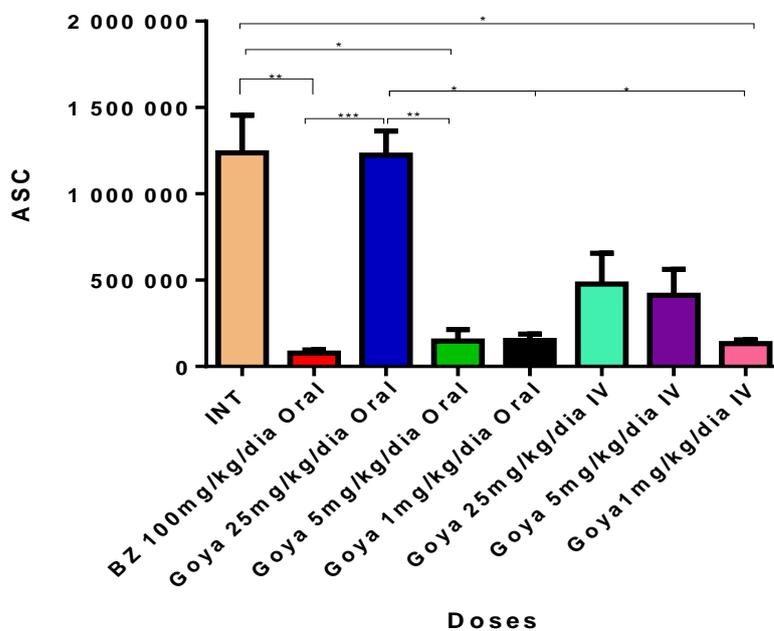
TABELA 1: Parâmetros biológicos derivados da curva de parasitemia em camundongos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados durante a fase aguda da infecção por via oral e intravenosa com diferentes dosagens de goiazensolida.

Grupos (TTm)	TTm	PPP(Dias) ± DP	PP(Dias) ± DP	PMP(x10 ⁴) ± DP	DPMP (Dias) ± DP	ASC (x10 ⁴) ± DP
INT ^a	-	5.00±0.00	13.88±6.03	407,0±190,9	5,33±0,58	123,8±62
BZ 100 mg/kg/dia ^b		5.13±0.35	5.63±0.92	46,00±33,94	4,63±0,52	7,675±52 ^{a*/d**}
GZL 1 mg/kg/dia ^c	Oral	5.00±0.00	22.25±7.05 ^{b***}	45,50±27,63 ^{e*}	6,17±7,41	15,025±10 ^{d*}
GZL 5 mg/kg/dia ^d		5.13±0.512	22,25±5,90 ^{b***}	30,00±26,96 ^{a**/e***}	3,50±1,41 ^{h*}	14,725±19 ^{a*/d*}
GZL 25 mg/kg/dia ^e		5.38±0.512	11,63±1,06	482,5±190,3	5,75±0,50	122,4±39
GZL 1 mg/kg/dia ^f	IV	5.13±0.35	18,88±4,67 ^{b**}	30,00±13,18 ^{a*/e***}	3,57±2,30 ^{h*}	13,2±64 ^{a*/d*}
GZL 5 mg/kg/dia ^g		5.00±0.00	14,75±7,61	115,0±127,7	4,75±2,50	41,25±42
GZL 25 mg/kg/dia ^h		5.13±0.35	14,50±9,17	150,5±217,1	12,00±7,53	47,75±50

TTm: tratamento; PPP: período pré-patente; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; ASC: área sob a curva; DP: desvio padrão; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; BZ (100 mg/kg/dia VO): grupo de animais infectados e tratados com benznidazol na dose de 100 mg por quilograma de peso por dia; GZL mg/kg/dia VO: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg por quilograma de peso por dia pela via oral; GZL mg/kg/dia IV: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg por quilograma de peso por dia pela via intravenosa; Diferença estatística consideradas quando $p < 0,05$. As letras “a” a “h” identificam cada grupo avaliado, e foram utilizadas para diferenciados grupos que apresentaram diferenças estatísticas (*).

A **Figura 7** também mostra em gráfico de barra que os tratamentos com GZL com as doses de 1 mg/kg/dia oral; 5 mg/kg/dia oral e 1 mg/kg/dia IV, promoveram redução significativa da ASC em comparação ao que foi observado com os grupos INT e GZL 25 mg/kg/dia oral, e que os seus valores da ASC foram semelhantes ao observado no grupo de animais tratados com BZ (100 mg/kg/dia).

FIGURA 7: Área sob a curva de parasitemia média de camundongos Swiss experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com goiazensolida e benznidazol pelas vias oral e intravenosa por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.



ASC: área sob a curva; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; BZ (100,0 mg/kg/dia VO): grupo de animais infectados e tratados com benznidazol na dose de 100,0 mg/kg/dia; GZL mg/kg/dia VO: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via oral; GZL mg/kg/dia IV: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via intravenosa; diferença estatística consideradas quando $p < 0,05$.

6.2.3 Hemocultura (HC)

Com relação à avaliação dos animais por hemocultura apenas os grupos tratados com GZL 5 mg/kg/dia, VO e 5 mg/kg/dia via IV foram 100% negativos. Os animais tratados com GZL 1 mg/kg/dia IV apresentaram taxa de negatividade na HC de 85,7%, seguidos pelos grupos GZL 25 mg/kg/dia IV, GZL 1 mg/kg/dia VO e GZL 25 mg/kg/dia VO, que apresentaram taxa de negatividade em HC de 75%, 66,6% e 50%, respectivamente. O grupo dos animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia apresentou 42,9% de negatividade, enquanto o grupo INT apresentou 100% de positividade neste exame (**Tabela 3**).

6.2.4 PCR

Foi observado nos grupos de animais tratados com GZL 5 mg/kg/dia VO, GZL 25 mg/kg/dia VO, GZL 1 mg/kg/dia IV, GZL 5 mg/kg/dia IV e GZL 25 mg/kg/dia IV negatividade em 100% dos animais avaliados em todas as coletas da PCR, seguidos de 85,7% para os animais tratados com BZ 100 mg/kg/dia e 66,6% daqueles tratados com GZL 1,0 mg/kg/dia VO. O controle INT apresentou positividade, sendo avaliado apenas um animal (**Tabela 3**).

A **Figura 8** representa um gel eletrônico com os resultados obtidos e a **Figura 9** o eletrofenograma da separação do material amplificado, tendo na quinta análise o pico de 330 pb marcado em vermelho, característico do KDNA do *Trypanosoma cruzi*.

FIGURA 8: Gel eletrônico da PCR de camundongos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com goiazensolida e benznidazol por 20 dias consecutivos por via oral e intravenosa durante a fase aguda da infecção.

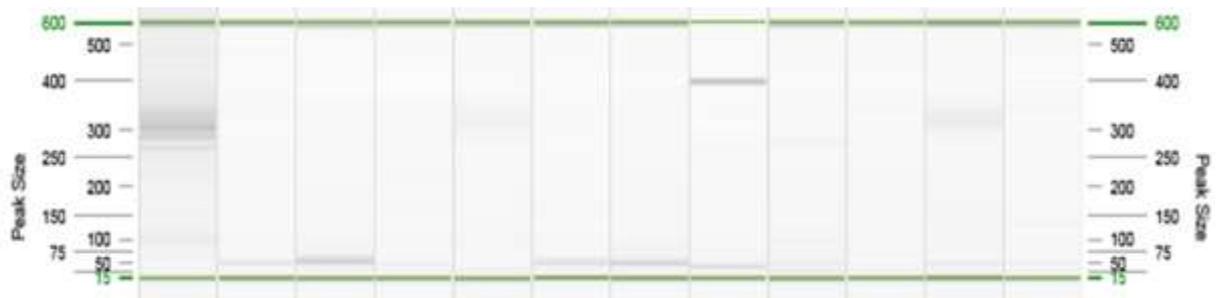
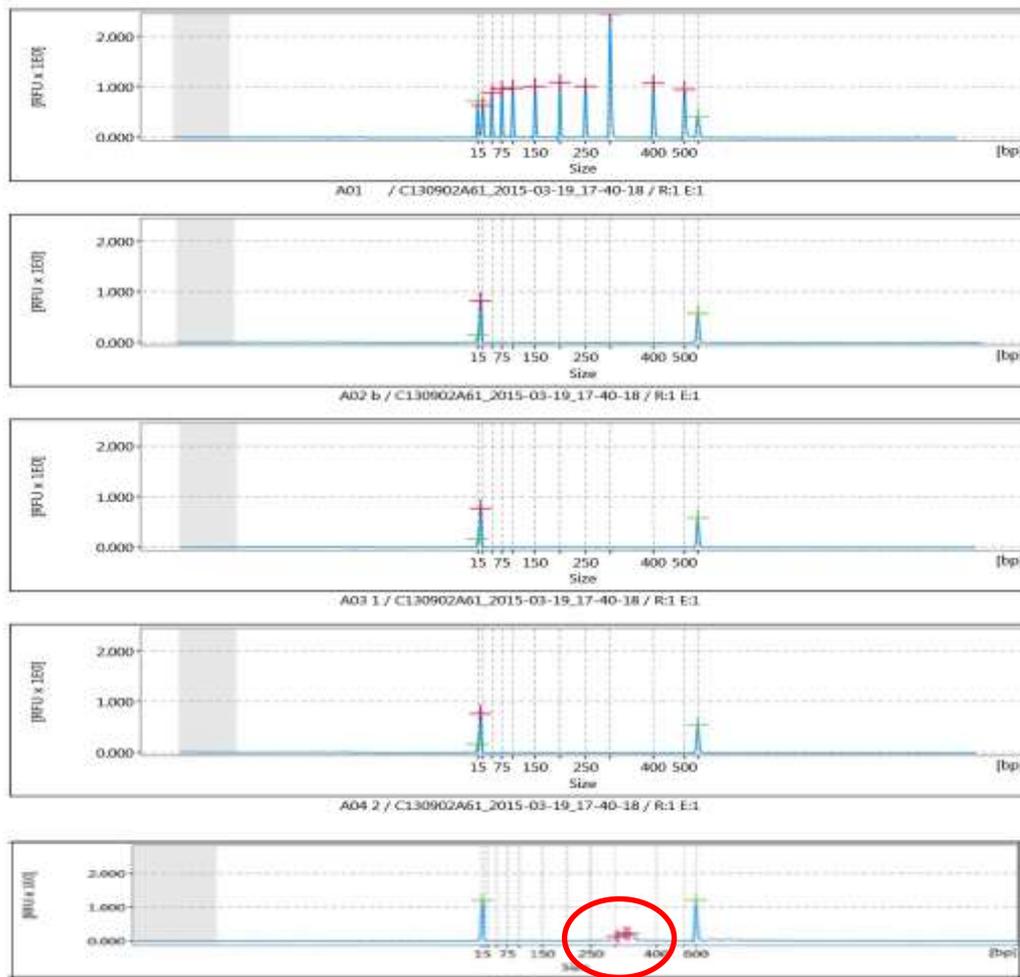


FIGURA 9: Eletrofenograma demonstrativo de amostras aleatórias no gel eletrônico de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com goiazensolida e benznidazol por 20 dias consecutivos pelas vias oral e intravenosa durante a fase aguda da infecção.



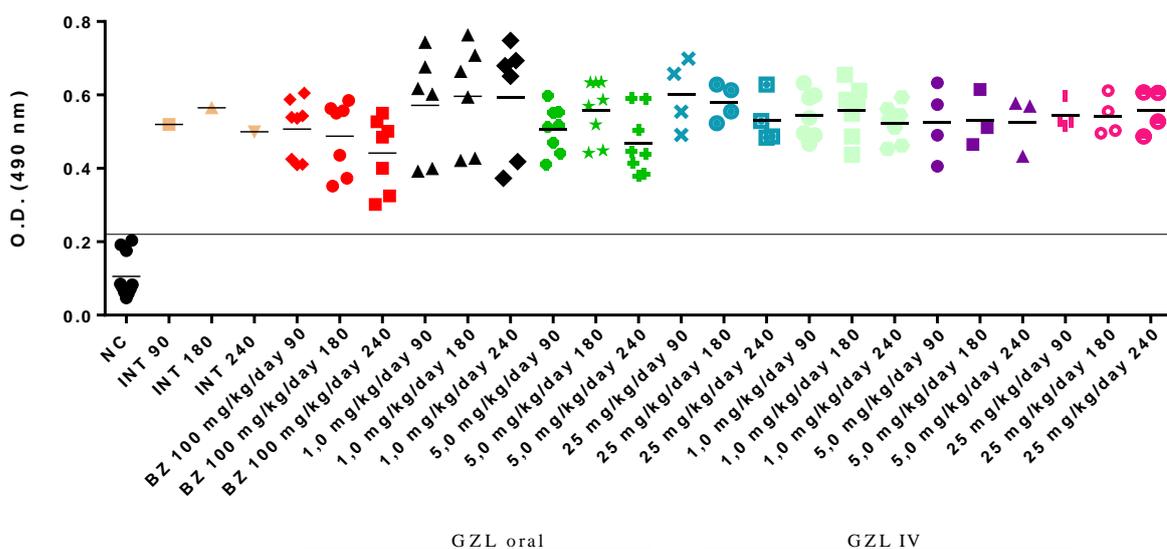
Eletrofenograma da separação do material amplificado, tendo na quinta análise o pico de 330 pb marcado em vermelho, característico do KDNA do *Trypanosoma cruzi*.

6.2.5 ELISA

A densidade ótica, medida relacionada à concentração de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* nas amostras coletadas 90, 180 e 240 d.p.t dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tratados por via oral e IV durante a fase aguda estão demonstradas na **(Figura 10)**. Todas as amostras dos animais dos grupos tratados com GZL e BZ, assim como nos animais do grupo controles INT foram reativas **(Figura 10)**. Não foram observadas diferenças significativas ao se comparar os níveis de anticorpos dos animais 90, 180 e 240 d.p.t. **(Figura 10)**, sendo observada apenas uma pequena queda no 240 d.p.t. nos animais dos grupos GZL 5 mg/kg/dia

oral (5/8) e BZ 100 mg/kg/dia (3/7), nos quais o número de animais com níveis de IgG abaixo da média do grupo é visível.

FIGURA 10: Gráficos de dispersão da absorbância relativos à sorologia convencional (ELISA) em amostras de soro de camundongos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com goiazensolida e benznidazol por via oral e intravenosa por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.



NC: grupo de animais controle não infectados e não tratados; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com Benznidazol na dose de 100,0 mg/kg/dia; GZL mg/kg/dia VO: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via oral; GZL mg/kg/dia IV: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via intravenosa; dpt: dias pós tratamento; D.O.: densidade ótica.

6.2.6 qPCR Coração

A avaliação do parasitismo no tecido cardíaco (**Tabela 2**) pelo método qPCR revelou ausência de material genético do kDNA de *T. cruzi* em 85,7% dos camundongos infectados com a cepa Y e tratados com GZL 1 mg/kg/dia/IV, seguido pelo grupo controle BZ com 71,4% de negatividade na qPCR. Os animais tratados com GZL 1, 5 e 25 mg/kg/dia/oral foram 66%, 62,5% e 50% negativos, respectivamente. O único animal sobrevivente do grupo controle INT infectado com a cepa Y foi positivo na qPCR do coração.

TABELA 2: Resultados da avaliação pós-tratamento de acordo com os critérios de cura clássicos e alternativos de camundongos infectados com a Y de *Trypanosoma cruzi* tratadas com goiazensolida pelas vias oral e intranosa por 20 dias consecutivos durante a fase aguda.

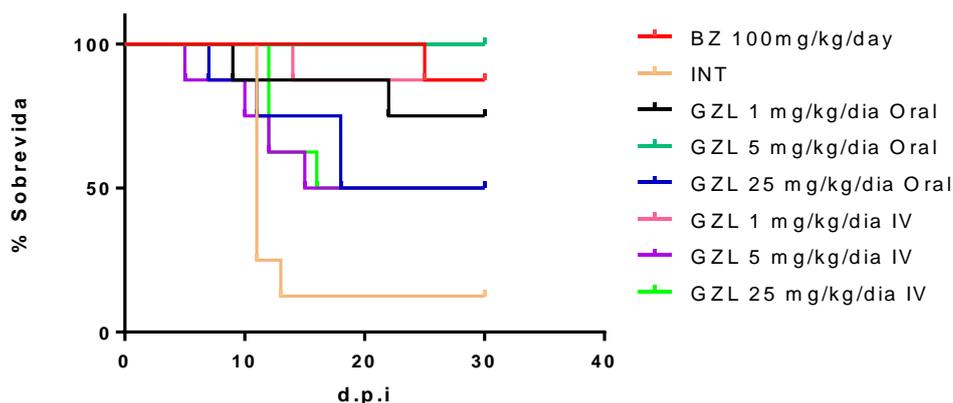
Cepa de <i>T. cruzi</i>	Via	Grupos experimentais (mg/kg/dia)	Taxa de sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)			Critério clássico de cura (%)	Negativação da qPCR (%)	Concordância entre PCR e qPCR (%)	Negatividade parasitológica (%) (HC, PCR e qPCR)
				HC	PCR	ELISA				
Y	Oral	BZ 100	87.5 (7/8)	42.9 (3/7)	85.7 (6/7)	0.0 (0/7)	0	71.4 (5/7)	86 (6/7)	43 (3/7)
		GZL 1	75 (6/8)	66.6 (4/6)	66.6 (4/6)	0.0 (0/6)	0	66.6 (4/6)	100 (6/6)	67 (4/6)
		GZL 5	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	0.0 (0/8)	0	62.5 (5/8)	62.5 (5/8)	62.5 (5/8)
		GZL 25	50 (4/8)	50.0 (2/4)	100 (4/4)	0.0 (0/4)	0	50 (2/4)	50 (2/4)	50 (2/4)
	IV	GZL 1	87.5 (7/8)	85.7 (6/7)	100 (7/7)	0.0 (0/7)	0	85.7 (6/7)	86 (6/7)	86 (6/7)
		- INT	12.5 (1/8)	0.0 (0/1)	0.0 (0/1)	0.0 (0/1)	0	0.0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)

HC: Hemocultura; PCR: reação em cadeia da polimerase; ELISA: ensaio imunabsorvente ligado a enzima; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa; BZ: Grupo de animais infectados e tratados com benznidazol 100 mg / kg / dia; GZL mg / kg / dia: Grupos de animais infectados e tratados com goiazensolide em doses de 1, 5 ou 25 mg / kg / dia por via oral ou intravenosa; INT: Grupo controle de animais infectados não tratados.

6.2.7 Sobrevida dos camundongos

A sobrevida dos animais experimentalmente infectados com a cepa Y e tratados com GZL 5 mg/kg/dia VO foi de 100%, seguidos por GZL 1 mg/kg/dia IV e BZ 100 mg/kg/dia que apresentaram sobrevida de 87,5% (**Tabela 2**). Os animais tratados com GZL 1 mg/kg/dia VO apresentaram sobrevida de 75%. Os demais grupos tratados com GZL 25 mg/kg/dia VO, GZL 5 mg/kg/dia IV e GZL 25 mg/kg/dia IV apresentaram sobrevida de 50%, enquanto apenas 12,5% dos animais do grupo INT sobreviveram até 240 d.p.t. (**Figura 11**).

FIGURA 11: Gráfico de sobrevida de camundongos *swiss* experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados com goiazensolida por via oral e intravenosa por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.



BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com Benznidazol na dose de 100,0mg por quilograma de peso por dia; INT: grupo controle infectado não tratado; GZL: Grupos infectados e tratados com goiazensolida nas determinadas concentrações; dpi: dia pós-infecção; IV: via intravenosa; Oral: via oral.

6.2.8 Eficácia do tratamento dos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*

A avaliação dos resultados obtidos na HC, PCR e ELISA dos camundongos tratados com as diferentes formulações de GZL e BZ revela que os dois compostos não foram capazes de levar os camundongos avaliados à cura parasitológica (DIAS, 2016).

Apesar de não se observar cura nos camundongos pelo critério de cura adotado, é importante ressaltar que a GZL administrada nas doses de 5 mg/kg/dia pela VO e 1 mg/kg/dia pela via IV durante 20 dias consecutivos na **fase aguda** da infecção pela cepa Y de *T. cruzi*

foi capaz de reduzir a parasitemia (ASC e PMP) e aumentar a sobrevivência dos animais significativamente (100%) em relação ao INT (12,5%).

6.3 AVALIAÇÃO GERAL DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA Y DE *T. cruzi*

A **Tabela 3** representa o conjunto de resultados do tratamento obtidos segundo o controle de cura clássico.

TABELA 3: Resultados da avaliação pós-tratamento segundo o critério de cura clássico de camundongos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e tratados com goiazensolida, via oral e intravenosa, por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

Cepa	Via de administração	Grupos experimentais	Sobrevivência (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)			Cura (%)
				HC	PCR	ELISA	
Y	Oral	BZ 100 mg/kg/dia	87,5 (7/8)	42,9 (3/7)	85,7 (6/7)	0,0 (0/7)	0%
		GZL 1 mg/kg/dia	75,0 (6/8)	66,6 (4/6)	66,6 (4/6)	0,0 (0/6)	0%
		GZL 5 mg/kg/dia	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	0,0 (0/8)	0%
		GZL 25 mg/kg/dia	50,0 (4/8)	50,0 (2/4)	100,0 (4/4)	0,0 (0/4)	0%
	IV	GZL 1 mg/kg/dia	87,5 (7/8)	85,7 (6/7)	100,0 (7/7)	0,0 (0/7)	0%
		GZL 5 mg/kg/dia	50,0 (4/8)	100,0 (4/4)	100,0 (4/4)	0,0 (0/4)	0%
		GZL 25 mg/kg/dia	50,0 (4/8)	75,0 (3/4)	100,0 (4/4)	0,0 (0/4)	0%
	-	-	INT	12,5 (1/8)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)

HC: Hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; BZ: Grupo de animais infectados e tratados com benznidazol 100/mg/kg/dia; GZL mg/kg/dia oral: grupos de animais infectados e tratados com goiazensolida nas doses de 1, 5 ou 25 mg/kg/dia pela via oral e GZL mg/kg/dia IV.

A partir da interpretação da **Tabela 3**, é possível observar que a partir dos resultados obtidos na HC, PCR e ELISA (**Tabela 3**) em animais infectados com a cepa Y, a negativação dos testes parasitológicos foi maior nos animais tratados com GZL do que os verificados em camundongos tratados com BZ. No entanto, considerando os resultados do ELISA, que foram sempre reativos, não foi observada cura em nenhum dos grupos tratados com ambos os compostos, seguindo o critério clássico de cura. Por outro lado, considerando a negativação apenas dos resultados de HC, PCR sanguínea ao longo da infecção e qPCR do coração (240 dpt), a negativação parasitológica avaliada foi de 68% nos animais infectados com a cepa Y tratados com GZL, enquanto para BZ foram de 43% (**Tabela 2**).

7. DISCUSSÃO

A DC, causada pelo *T. cruzi*, é responsável por significativas perdas econômicas e um grave problema de saúde pública na América Latina (DIAS et al. 2002, URBINA 2002, MONCAYO 2003, CERECETTO e GONZÁLEZ 2008). Os fármacos atualmente em uso para o seu tratamento são o nifurtimox (4 [(5-nitrofurfuril-ideno) amino] -3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido), derivado do nitrofurano (Lampit®, Bayer), e benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (Rochagan®, Roche). Ambos os fármacos são tripanocidas para todas as formas do parasita (MADY et al, 2008; MECCA et al, 2008) e atuam através da produção de radicais livres por uma via metabólica. Como as enzimas que eliminam os radicais livres estão ausentes ou apresentam níveis muito baixos de atividade no parasita, o *T. cruzi* é altamente suscetível ao dano induzido por esses metabólitos (URBINA 1999, 2002 DOCAMPO 2001).

Os dois fármacos listadas acima são mais eficazes durante a fase aguda da doença. Durante a fase crônica, sua atividade é limitada. Além disso, nifurtimox e benznidazol também podem causar toxicidade sistêmica e efeitos adversos que incluem anorexia, náusea, vômito, cefaleia, depressão do sistema nervoso central, sintomas maníacos, convulsões, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatite (COURA e DE CASTRO 2002, URBINA e DOCAMPO 2003, KIRCHHOFF 2005, RODRÍGUEZ 2005, URBINA 2005).

Dessa forma, é evidente a necessidade de identificar novos compostos e/ou estratégias terapêuticas que sejam mais eficientes, seguras e acessíveis para o tratamento da infecção por *T. cruzi*, (URBINA et al, 2009), quando os parasitos ficam reproduzindo lentamente no interior da célula hospedeira, e em geral inalcançáveis pelos fármacos disponíveis. Por estas razões triagens mais racionais para busca de novos compostos quimioterapêuticos têm sido desenvolvidas a fim de se padronizar a sua busca de forma mais racional (ROMANHA, 2010).

No último século, os produtos naturais forneceram moléculas com propriedades semelhantes aos fármacos e alta diversidade estrutural. Recentemente, o Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde, trabalhando com o Drug Discovery Research Program, considerou a investigação de plantas medicinais tradicionalmente usadas para tratar infecções parasitárias como um campo de estudo essencial e de alta prioridade (SULSEN et al, 2008). As lactonas sesquiterpênicas são compostos terpenóides com ampla variedade de estruturas químicas e são características da família Asteraceae. Um conjunto

notável de atividades farmacológicas, tais como propriedades anti-tumorigênicas, citotóxicas, antibacterianas, antifúngicas, inseticidas, cardiotônicas, antiulcerosas e antiprotozoárias, já foi relatado para esses terpenóides (SULSEN et al, 2008), a exemplo de nosso grupo em relação a licnofolida isolada de *L. trichocarpha* em nanocápsulas (BRANQUINHO et al, 2014; MELLO et al, 2016). No presente estudo, a atividade antiparasitária da LS goiazesolida foi investigada. Foram realizados testes *in vivo* com a GZL em solução, como descrita por ACUÑA (2013), frente à infecção experimental com a cepa Y do *T. cruzi* em modelo murino.

Considerando os resultados promissores já realizados *in vitro* por nosso grupo de estudo, deu-se início à etapa seguinte deste estudo, que foi a avaliação do efeito da GZL em solução no tratamento de camundongos *Swiss* infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. As diferentes doses de GZL utilizadas neste estudo foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos em experimentos prévios em camundongos, utilizando esta mesma cepa de parasitos, pelo chamado “teste rápido” de susceptibilidade anti-*T. cruzi*, com a mesma formulação de GZL, onde seu efeito em tratamento de apenas cinco dias (teste rápido) sobre a curva de parasitemia diária (FILARDI e BRENER (1984)) modificado e citado por ROMANHA et al, (2013). Foi observado que as menores doses de GZL geraram os melhores efeitos na redução da parasitemia, o que levou à escolha das doses de 1 mg/kg/dia; 5 mg/kg/dia e 25 mg/kg/dia pelas VO e IV no prosseguimento de sua avaliação no “teste longo” ou clássico (BRENER, 1962) de atividade terapêutica da GZL em modelo murino.

De forma semelhante, ao se analisar os resultados obtidos no tratamento dos animais, também infectados pela cepa Y de *T. cruzi*, por 20 dias consecutivos (teste longo ou clássico), no qual a parasitemia foi avaliada até completa negativação do ESF, foi novamente observado melhor efeito na redução da parasitemia nos animais tratados com as doses menores de GZL, ou seja, de 5,0 mg/kg/dia pela VO e 1,0 mg/kg/dia pela via IV. Tal fato, também observado no teste rápido, pode estar relacionado à potente atividade moduladora de NF-kB pela GZL em doses mais elevadas, que podem estar potencializando um efeito negativo no combate da GZL à infecção pelo acometimento simultâneo do sistema imune. Uma vez que nas células imunocompetentes a ativação desta via induz a transcrição de uma gama de genes, como os de citocinas (TNF, IL-1beta, IL-2, IL6, IL-12), moléculas de adesão (VCAM, ICAM) e enzimas (iNOS – sintase de óxido nítrico induzida; COX – ciclooxigenase), todos essenciais à montagem de uma resposta imune, tanto inata quanto adaptativa (O’NEILL e KALTSCHMIDT, 2007). Dessa forma, as menores doses de GZL foram capazes de gerar os

melhores resultados, possivelmente devido ao fato de seu efeito tripanocida ter se sobressaído ao efeito que ela é capaz de exercer sobre NF-kB.

Ao se fazer a avaliação pós-terapêutica dos animais infectados pela cepa Y, considerando o critério de cura clássico (MS, 2016) cuja definição de cura está atrelada à negatificação da sorologia (ELISA) que ocorre muito tardiamente (KRETTLI e BRENER, 1982), nenhum animal foi considerado curado. No entanto, foi observado que a GZL administrada nas doses de 5,0 mg/kg/dia pela VO e 1,0 mg/kg/dia pela via IV, durante 20 dias consecutivos na fase aguda da infecção, foram capazes de reduzir a parasitemia (ASC e PMP) e de manter a sobrevivência de 100% dos animais, diferente do observado nos animais INT (12,5%), sendo estes resultados melhores do que o obtido com o fármaco de referência BZ, testado paralelamente. Em alguns tratamentos, houve negatificação de 100% de todos os parâmetros parasitológicos avaliados, incluindo a hemocultura e a PCR, importantes parâmetros parasitológicos empregados na determinação do fracasso terapêutico (COURA e CASTRO, 2002) especialmente no modelo camundongo, que é o modelo animal mais usado nos estudos experimentais de biologia de *T. cruzi* e em testes de novas opções terapêuticas (BRENER, 1962). Estes dados demonstraram a grande capacidade da GZL de reduzir a infecção em relação ao BZ.

Ainda, nos animais tratados com GZL 5 mg/kg/dia via oral, todos os parâmetros parasitológicos (HC e PCR) se mantiveram repetidamente negativos em todas as avaliações, o que é um ótimo indicativo de uma terapia eficaz. Assim, esses dados demonstraram a capacidade do GZL em reduzir ou eliminar a infecção pelo *T. cruzi* em animais infectados com a cepa Y, de acordo com o critério clássico de cura aqui avaliado, houve 0% de cura nos animais. Entretanto, considerando apenas os resultados parasitológicos (HC, PCR sanguíneo e qPCR coração), houve negatificação de até 86% de determinados grupos. Os resultados da PCR sanguínea e a concordância com os resultados da qPCR aqui obtida são semelhantes aos observados no modelo de camundongo, onde os autores verificaram que a qPCR no tecido é um método importante a ser considerado na avaliação pós-tratamento (CALDAS et al., 2012).

Uma das questões mais relevantes na avaliação da eficácia terapêutica da DC é a falta de ferramentas para identificar e certificar a cura parasitológica definitiva. Portanto, novas metodologias de alta sensibilidade devem ser usadas, como a qPCR feita naqueles animais com repetidos testes parasitológicos negativos e somente positivos em testes sorológicos para verificar a presença de kDNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco dos hospedeiros, pois a

negativação da qPCR indica ausência de kDNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco dos hospedeiros.

Da Silva et al, (2013) realizou um estudo envolvendo duas LS, a Psilostachyin A e a Cynaropicrin, onde suas atividades foram avaliadas em camundongos infectados com cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*. Não foi observada atividade significativa em comparação com o fármaco de referência BZ, e ainda não foram capazes de apresentar a capacidade de prevenir a mortalidade dos animais. No entanto, os resultados de sobrevivência dos animais tratados com GZL aqui encontrados são semelhantes aos descritos por BRANQUINHO et al. (2014) utilizando a LS licnofolida (LIC livre), que demonstrou, empregando formulações nanoestruturadas (nanocápsulas), uma forte atividade desta lactona frente ao *T. cruzi*, o que em conjunto estimulam a continuidade e aprimoramento de nossos estudos com a GZL, empregando formulações mais elaboradas que poderiam aumentar a eficácia terapêutica desta substância. É importante ressaltar ainda que os diversos estudos com a LS licnofolida livre desenvolvidas por nosso grupo (BRANQUINHO et al., 2014 e 2016), tão ativa em formulações nanoestruturadas (nanocápsulas), nunca registraram cura parasitológica com a LIC livre não encapsulada em modelo murino infectado por cepas de perfis distintos de resistência/susceptibilidade ao tratamento com o BZ e NF, o que revela o grande potencial efeito terapêutico da GZL para o *T. cruzi* a ser explorado posteriormente.

De acordo com LANA e MARTINS FILHO 2015, uma das questões mais relevantes para avaliação da eficácia do tratamento etiológico da doença de Chagas é a falta de ferramentas consensuais / factíveis para identificar e certificar a cura parasitológica definitiva. Vários métodos de natureza distinta (parasitológico, sorológico e molecular) têm sido continuamente propostos e novas perspectivas estão sob investigação. Atrelar a definição de cura à negativação da sorologia convencional como descrito no critério clássico (DIAS, 2016) pode ser questionada uma vez que sua positividade permanece por longo tempo após o tratamento e pode não estar necessariamente indicando infecção ativa, pois 14 outros fatores distintos de *T. cruzi* podem explicar a permanência reatividade por longo tempo (KRETTLI, 2009). Além do mais, a queda dos níveis destes anticorpos após o tratamento já é um indicativo de atividade terapêutica que poderá ser confirmada por outros testes parasitológicos ou até mesmo pela sorologia realizada mais tardiamente.

8. CONCLUSÃO

A GZL se mostrou bastante ativa *in vivo* contra o *T. cruzi*. Os resultados obtidos confirmam a potencial atividade tripanocida da GZL demonstrada pela negatividade dos testes parasitológicos (HC, PCR e qPCR) e queda discreta dos níveis sorológicos, tendo os melhores resultados nas menores doses que foi 5 mg/kg/dia VO e 1 mg/kg/dia via IV. Portanto, isso estimula a continuidade dos estudos no sentido de avaliar novas formulações mais elaboradas para melhorar os resultados alcançados.

9. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.G., RASSI A., MAGALHÃES, J.B., FERRIOLLI, F.F. and LUQUETTI, A.O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 86, 624-626, 1992.
- ÁVILA, H.A., SIGMAN, D.S., COHEN, L.M., MILLIKAN, S. and SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Parasitol**, 48, 222-223, 1991.
- BAHIA, M. T., DE ANDRADE, I. M., MARTINS, T. A. F., NASCIMENTO, A. F. S., DINIZ, L. F., CALDAS, I. S., TALVANI, A., TRUNZ, B. B., TORREELE, E. and RIBEIRO, I. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS negl Trop Dis**, 6, 2013.
- BOHLMANN, F. and JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernoniae (Compositae). **Plant Syst Evol**, 4, 3-43, 1990.
- BOHLMANN, F. and JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the Vernoniae (Compositae). **Plant Syst Evol**, 4, 3-43, 1990.
- BRANQUINHO, R. T., MOSQUEIRA, V. C. F., KANO, E. K., DE SOUZA, J., DORIM, D. D. R., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. and DE LANA, M. HPLC-DAD and UV-spectrophotometry for the determination of lychnopholide in nanocapsule dosage form: Validation and application to release kinetic study. **J Chromatogr Sci**, 52, 19-26, 2014 a.
- BRANQUINHO, R. T., MOSQUEIRA, V. C. F., OLIVEIRA-SILVA, J. C. V. D., SIMÕES-SILVA, M. R., SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. and LANA, M. D. Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, 58, 2067-2075, 2014 b.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 4, 389-396, 1962.

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

BRITTO C, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 88: 171-172, 1993.

BUCKNER, F. S. and NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Curr Opin Infect Dis**, 23, 609-616, 2010.

DIAS CARLOS PINTO, J., NOVAES RAMOS, A., DIAS GONTIJO, E., LUQUETTI, A., APARECIDA SHIKANAI-YASUDA, M., RODRIGUES COURA, J., MORAIS TORRES, R., RENAN DA CUNHA MELO, J., ANTONIO DE ALMEIDA, E., DE OLIVEIRA JR, W., CARLOS SILVEIRA, A., MARCONDES DE REZENDE, J., SCALABRINI PINTO, F., WALTER FERREIRA, A., RASSI, A., AUGUSTO FRAGATA FILHO, A., SILVESTRE DE SOUSA, A., CORREIA FILHO, D., MARIA JANSEN, A., MANZAN QUEIROZ ANDRADE, G., FELÍCIA DE PAOLI DE CARVALHO BRITTO, C., YECÊ DAS NEVES PINTO, A., RASSI JR, A., ELISABETH CAMPOS, D., ABAD-FRANCH, F., ELOI SANTOS, S., CHIARI, E., MARCEL HASSLOCHER-MORENO, A., FURTADO MOREIRA, E., SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D., SEILA DE OLIVEIRA MARQUES, D., LAGES SILVA, E., ANTONIO MARIN-NETO, J., MARIA DA CUNHA GALVÃO, L., SALLES XAVIER, S., ALDO DA SILVA VALENTE, S., BARBOSA CARVALHO, N., VIANA CARDOSO, A., ALBUQUERQUE E SILVA, R., MAIA DA COSTA, V., MONZANI VIVALDINI, S., MAMEDE OLIVEIRA, S., DA COSTA VALENTE, V., MAIA LIMA, M. AND VIEIRA ALVES, R. (2016). II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 25, 1–10. doi: 10.5123/S1679-49742016000500002.

CASTRO JA, MECCA MM, BARTEL LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology** 25: 471-479, 2006.

CASTRO JA, MECCA MM, BARTEL LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology** 25: 471-479, 2006.

CERECETTO H, DI MAIO R, GONZÁLEZ M, RISSO M, SAGRERA G, SEOANE G, DENICOLA A, PELUFFO G, QUIJANO C, STOPPANI AOM, PAULINO M, OLEA-AZAR C, BASOMBRIO MA . Synthesis and antitrypanosomal evaluation of E-isomers of 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives, structure-activity relationships. **Eur J Med Chem** 35: 343-350, 2008.

CERQUEIRA, M.B.S., SOUZA, J.T., JÚNIOR, R.A. and PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica). **Ciência e Cultura**, 39 (5/6), 551-553, 1987.

CIMERMAN, B.; CEMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 81-112, 2008.

COURA JR, DE CASTRO SL . A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97: 3-24, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 108, 962-967, 2013.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., STOLF N, BELLOTTI, G, PATARROYO, M.E., PILLEGGI, F. and KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, 92, 3541-3545, 1996.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Jul; 97(5):603-12, 2002.

DIAS JC, SILVEIRA AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Jul; 97(5):603-12, 2002.

DIAS, J.C.P., PRATA, A. and CORREIA, D., Problems and perspectives for Chagas disease control: In search of a realistic analysis, **Rev Soc Bras Med Trop**, 41(2), 193-196, 2008.

DOCAMPO R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des** 7: 1157-1164, 2001.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem Biol Interact**, 73, 1-27, 1990.

DOS SANTOS, P. A., AMARANTE, M. F., PEREIRA, A. M., BERTONI, B., FRANCA, S. C., PESSOA, C., DE MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V., PEREIRA, M. R. and LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 52, 1433-1435, 2004.

ESPUELAS S, PLANO D, NGUEWA P, FONT M, PALOP JA, IRACHE JM, SANMARTÍN C. 2012. Innovative lead compounds and formulation strategies as newer kinetoplastid therapies. **Curr. Med. Chem.** 19:4259–4288. Disponível em: ><http://dx.doi.org/10.2174/092986712802884222>>. Acesso em: 16 Janeiro 2019.

FILARDI, L.S. e BRENER, Z. A Rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Vol. 79(2). 221-225), 1987.

FILARDI, L.S. e BRENER, Z. A Rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Vol. 79(2). 221-225), 1984.

GARCIA, E.S e AZAMBUJA, P. Infection of Triatomines with *Trypanosoma cruzi*, p. 143-155. In **JM Crampton, CB Beard & Louis K (eds)**, The Molecular Biology of Insector Disease Vectors: a Methods Manual, Champ & Hall, London, 1996.

GHANTOUS, A., GALI-MUHTASIB, H., VUORELA, H., SALIBA, N. A. and DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discov Today**, 15, 668-678, 2010.

KIRCHHOFF LV. Trypanosomiasis. In: DL Kasper, AS Fauci, DL Longo, E Braunwald, SL Hauser, JL Jameson. **Harrison's principles of internal medicine**, 16th edition, Mac Graw Hill, New York, p. 1373-1377, 2005.

KRETTLI AU, CANCADO JR, BRENER Z. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. **Transation Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, 76: 334-340, 1982.

KRETTLI AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104(Suppl I): 142 – 151, 2009.

LANA, M AND MACHADO, E. M. M. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity (Chapter XIV). In: Jenny Telleria and Michel Tibayrenc. (Org.). American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of reserach. 1ed. London, England: **ELSEVIER**. 339-356. 2010.

LANA, M., MARTINS-FILHO, O.A., 2015. Revisiting the posttherapeutic cure criterion inChagas disease: time for new methods, more questions, doubts, and polemicsor time to change old concepts? **BioMed Res. Int.** 2015, 652985.

LANA, M; BRANQUINHO, RT ; MOSQUEIRA, VCF ; SAÚDE-GUIMARÃES, DA . Improvement of pharmacokinetic profile and efficacy of sesquiterpene lactone in nanocarriers in the experimental Chagas disease in mice. **Planta Medica JCR**, v. 80, p. 1-1, 2014.

LOZANO, V. F. Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao benzonidazol em duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. São Paulo. **Dissertação**. Universidade Bandeirantes de São Paulo. 2011.

LOZANO, V. F., STRAUSS M., SPINA R., CIFUENTE D. , TONN C. , RIVAROLA HW. , SOSA MA. The in vivo trypanocidal effect of the diterpene 5-epi-icetexone obtained from *Salvia gilliesii*. Volume 65, p. 23-26, Setembro 2015.

MARKELL; VOGÉ; JOHN; KROTOSKI. **Parasitologica médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, p.126-136, 2003.

MAXIMIANO, F.P.; DE PAULA, L.M.; FIGUEIREDO, V.P.; DE ANDRADE, I.M.; TALVANI, A.; SÁ-BARRETO, L.C.; BAHIA, M.T.; CUNHA-FILHO, M.S. Benznidazole

microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. **Eur J Pharm Biopharm**,78:377-84, 2011.

MAYA, J.D., CASSELS, B.K., ITURRIAGA-VASQUEZ, P., FERREIRA, J., FAUNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A**, 146, 601-620, 2007.

MELLO, C. G. C., BRANQUINHO R. T., OLIVEIRA M. T., MILAGRE M. M., SAÚDE-GUIMARÃES D. A., MOSQUEIRA V. C. F., LANA M.: Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease, antimicrobial agentes and chemotherapy, Volume 60 Número 9, Setembro 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS, 2016). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso: 05 Maio 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA, 2007). Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/>>. Acesso em: 20 Fevereiro 2019.

MONCAYO A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **98**: 577-591, 2003.

MONTAVANI, M.S., TAKAHASHI, S.C, VICHENEWSKI, W. Evaluation of genotoxic activity of the sesquiterpene lactone goyazensolide in mammalian systems in vitro and in vivo. **Revista Brasileira de Genética**, v. 16(4), p.967-975, 1993.

MUÑOZ, M. J., MURCIA, L. and SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 9, 5-7, 2011.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 85-108, 2005.

O'NEILL, L.A., KALTSCHMIDT C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci**, 20(6): 252-258, 2007.

OLIVEIRA, A.B., SAÚDE, D.A., PERRY, K.S.P., DUARTE, D.S., RASLAN, D.S., BOAVENTURA, M.A.D. and CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytother Res**, 10(4), 292-295, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS, 2018). Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=417:doenca-de-chagas&Itemid=463>. Acesso em: 15 Janeiro 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS, 2005). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas#inicio>>. Acesso em: 5 abril 2019.

PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., BARBOSA, R.L., GUARALDO, A.M., FRANCO, R.M., DIAS, V.L. and PASSOS, L.A. Transmission of Chagas disease (American Trypanosomiasis) by food. **Adv Food Nutr Res**. 59, 63-85, 2010.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochem Syst Ecol**, 14, 225-281, 1986..

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, 1, 92-100, 2001.

RASSI A, JR., RASSI, A. and MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, **375(9723)**, 1388-1402, 2010.

REN, Y., ACUÑA, U.M., JIMÉNEZ, F., GARCÍA, R., MEJÍA, M., CHAI, H., et al., Cytotoxic and NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*. **Tetrahedron**, 68, 2671-2678, 2012.

RODRÍGUEZ AJ. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. **Rev Peru Med Exp Salud Publica** 22: 123-133, 2005.

RODRIGUEZ, E., TOWERSG, N.A., NDM ITCHELLJ.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, 15, 1573-158, 1976.

RODRIGUEZ, E., TOWERSG, N.A., NDM ITCHELLJ.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, 15, 1573-158, 1976.

ROMANHA, A. J., SOLANGE LISBOA DE CASTRO, MARIA DE NAZARÉ CORREIA SOEIRO, JOSELI LANNES-VIEIRA, ISABELA RIBEIRO, ANDRÉ TALVANI,

BERNADETTE BOURDIN, BETHANIA BLUM, BIANCA OLIVIERI, CARLOS ZANI, CARMENZA SPADAFORA, EGLER CHIARI, ERIC CHATELAIN, GABRIELA CHAVES, JOSÉ EDUARDO CALZADA, JUAN MANUEL BUSTAMANTE, LUCIO H FREITAS-JUNIOR, LUZ I ROMERO, MARIA TEREZINHA BAHIA, MICHEL LOTROWSKA, MILENA SOARES, SONIA GUMES ANDRADE, TANYA ARMSTRONG, WIM DEGRAVE, ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE; In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease; **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Vol. 105(2): 233-238, March 2010.

ROMERO, E. L. and MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 62, 576-588, 2010.

SALEM, M.M., WERBOVETZ, K.A. Natural products from plants as drugcandidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 13 (21), 2571–2598, **PubMed PMID:** 17017912. Epub2006/10/05. eng.

SALEM, M.M., WERBOVETZ, K.A., 2006. Natural products from plants as drugcandidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 13 (21), 2571–2598, **PubMed PMID:** 17017912, 2006.

SANTOS, P. A., CASANOVA TURATI, I. C., TOMAZ, J. C. AND PEPORINE LOPES, N. Quantification of furanoheliangolides by HPLC and GC, **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 39(3), 341-345, 2003.

SANTOS-MAGALHAES, N. S. and MOSQUEIRA, V. C. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. **Adv Drug Deliv Rev**, 62, 560-575, 2010.

SAÚDE, D. A., RASLAN, D. S., DE SOUZA FILHO, J. D. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia LXIX,69(1)**, 90-91, 1998.

SCHMIDT, T. J., NOUR, A. M., KHALID, S. A., KAISER, M. and BRUN, R. Quantitative structure--antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules*, 14, 20622076, 2009.

SCHMUNIS, G.A., YADON, Z.E. Chagas disease: a latin American health problembecoming a world health problem? **Acta Trop.** 115 (1-2), 14–21, 2010.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae. **The Botanical Review**, 48(2), 121-594, 1982.

SILVA C. F., BATISTA D. G. J ., ARAÚJO J.S., BATISTA M. M., LIONEL J., SOUZA E.M. , HAMMER E. R., SILVA P. B., MIERI M. , ADAMS M., ZIMMERMANN S. , HAMBURGUER M., BRUN R., SCHUHLY W., SOEIRO M. N..C. Activities of Psilostachyin A and Cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* In Vitro and In Vivo. **DOI: 10.1128/AAC.00595-13**, p. 5307-5314, vol. 57, Agosto 2013.

SOEIRO M. N., WERBOVETZ K., BOYKIN D.W., WILSON W.D., WANG M.Z., HEMPHILL A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. Volume 140, p.929-951, Abril 2013.

SULSEN, V. P., FRANK, F. M., CAZORLA, S. I., ANESINI, C. A., MALCHIODI, E. L., FREIXA, B., VILA, R., MUSCHIETTI, L. V. and MARTINO, V. S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2415-2419, 2008.

TOLEDO, M. J., GUILHERME, A. L. F., DA SILVA, J. C., DE GASPERI, M. V., MENDES, A. P., GOMES, M. L. and DE ARAUJO, S. M. *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 39, 283-290, 1997.

UCHIYAMA, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Health Science**, 55, 31-39, 2009.

URBINA JA . Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des** 8: 287-295, 2002.

URBINA JA. Nuevos avances en el desarrollo del tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. **Mesas de Debate**, OMS/ OPS, Buenos Aires, 9 pp, 2005.

URBINA JA. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94 (Suppl. I): 349-355,1999.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, 115, 55-68, 2010.

URBINA, J. A; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parsitology**, 19 (11), 495-501, 2003.

URBINA, J.A. New advances in the management of a long-neglected disease. **Clinical Infectious Diseases**, 49(11), 1685-1687, 2009.

VOLLER, A., BIDWELL, DE, BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. **Theory and practice**. Bull.World Health Organ. 53, 55-65, 1975.

VONGVANICH, N., KITTAKOOP, P., CHAROENCHAI, P., INTAMAS, S., SRIKLUNG, K. and THEBTARANONTH, Y. Antiplasmodial, antimycobacterial, and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. **Planta Med**, 72, 1427-1430, 2006.

WAGNER, S., HOFMANN, A., SIEDLE, B., TERFLOTH, L., MERFORT, I. and GASTEIGER, J. Development of a structural model for NF-kappaB inhibition of sesquiterpene lactones using self-organizing neural networks. **J Med Chem**, 49, 2241-2252, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2010). Disponível em: <http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/index.html.2010>. Acesso em: 16 Fevereiro 2019.

ZINGALES, SG ANDRADE, MRS BRIONES, DA CAMPBELL, E CHIARI, O FERNANDES, F GUHL, E LAGES-SILVA, AM MACEDO, CR MACHADO, MA MILES, AJ ROMANHA, NR STURM, M TIBAYRENC, AG SCHIJMAN. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1054, November 2009.

ANEXO I



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 077/2017, de 12 de junho de 2017

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Marta de Lana
DEACL/EFAR (NUPEB)**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. **2016/45**, intitulado "**Avaliação da ação terapêutica de lactona sesquiterpênica isolada de *Lychnophora passerina* em modelo murino experimentalmente infectado com *Trypanosoma cruzi*.**"

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do *site* da CEUA,

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.**



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceus@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2016/45**, intitulado "**Avaliação da ação terapêutica de lactona sesquiterpênica isolada de *Lychnophora passerina* em modelo murino experimentalmente infectado com *Trypanosoma cruzi***", que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a). Marta de Lana**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Camundongo <i>Swiss</i>	518	25 a 30 dias	Fêmeas	CCA/UFOP
Camundongo <i>Swiss</i>	15	25 a 30 dias	Machos	CCA/UFOP

Restrição de dieta: () sim (X) não
Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 28/05/2019.

Ouro Preto, 12 de junho de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

ANEXO III - PREMIAÇÃO



ANEXO IV-
21-May-2019

Dear Dr. Lana,

Your manuscript entitled "Activity of the sesquiterpene lactone goyazensolide against *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo" by Matheus Marques Milagre¹; Renata Tupinambá Branquinho¹; **Maíra Fonseca Gonçalves**¹; Gabriela Maíra Pereira de Assis², Maykon Tavares de Oliveira²; Levi Soares dos Reis¹, Dênia Antunes Saúde-Guimarães¹; Marta de Lana^{1,2} has been successfully submitted online and will be given full consideration for publication in *Parasitology*.

Your manuscript ID is PAR-2019-0141.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/par> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/par>.

Thank you for submitting your manuscript to *Parasitology*.

Sincerely,
Alison Sage
Parasitology