



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia



L M

MORFOPATOLOGIA
Universidade Federal de Ouro Preto

**Avaliação das alterações histopatológicas após o tratamento com
uma nova molécula de Cumarina em camundongos *Swiss*
infectados com o *Trypanosoma cruzi***

LEONARDO MOREIRA SILVA

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

agosto/2021

LEONARDO MOREIRA SILVA

**Avaliação das alterações histopatológicas após o tratamento com
uma nova molécula de Cumarina em camundongos *Swiss*
infectados com o *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro
Preto como requisito parcial para obtenção do título
de Farmacêutico generalista. Orientadora: Prof^a. Dr^a.
Paula Melo de Abreu Vieira, Co-orientadora: Ms.
Viviane Flores Xavier

Leonardo Moreira Silva

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

agosto/2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Leonardo Moreira .
Avaliação das alterações histopatológicas após o tratamento com uma nova molécula de Cumarina em camundongos Swiss infectados com o *Trypanosoma cruzi* . [manuscrito] / Leonardo Moreira Silva. - 2021.
36 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Coorientadora: Ma. Viviane Flores Xavier.

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

1. Chagas, Doença de. 2. Quimioterapia . 3. Cumarina. 4. Morfopatologia. 5. Histopatologia. I. Vieira, Paula Melo de Abreu. II. Xavier, Viviane Flores . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Moreira Silva

Avaliação das alterações histopatológicas após o tratamento com uma nova molécula de Cumarina em camundongos *Swiss* infectados com o *Trypanosoma cruzi*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 31 de agosto de 2021

Membros da banca

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira - Orientadora (DECBI/Universidade Federal de Ouro Preto)
Msc. Viviane Flores Xavier - Co-Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Thais Vieira Carvalho Silva -(Universidade Federal de Ouro Preto)
Msc. Flávia de Souza Marques - (Universidade Federal de Ouro Preto)

[Paula Melo de Abreu Vieira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 31/08/2021



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/08/2021, às 19:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0215540** e o código CRC **86FD4327**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.009114/2021-45

SEI nº 0215540

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde e por estar comigo durante toda a minha jornada.

Aos meus pais, Gerson Fonseca da Silva e Gerlina Moreira Durães Silva, pelos cuidados, preocupações, amor, confiança depositada ao longo dos anos de estudo, por serem meus maiores incentivadores, por me auxiliarem a passar por todas as adversidades que enfrentei ao longo dessa jornada. Agradeço por terem me sustentado emocionalmente e financeiramente se doando e se sacrificando para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida.

Ao meu avô Gerson dos Santos Durães, pelas orações e pelo apoio que sempre me incentivou seguir em frente.

Às minhas irmãs Leila Paula Durães Silva e Leiliane Durães Silva, pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos meus amigos e irmãos da República Dusmininu, que comigo estiveram em minha trajetória ouro-pretana.

Ao meu amor, Alice Arruda, pelo carinho, cuidado e consolo nos meus momentos de adversidades.

À Prof^ª Dra Paula Melo de Abreu Vieira por me orientar neste trabalho, pela paciência e por ter me inserido no universo científico que tanto me encanta.

À doutoranda Viviane Flores Xavier, por me Co-orientar durante a Iniciação Científica e por me transmitir a maior parte do conhecimento adquirido em laboratório.

À todos do Laboratório de Morfopatologia, que sem eles não teríamos concluído os nossos experimentos e trabalhos. Agradeço pela coletividade e companheirismos de todos.

À Escola de Farmácia (EFAR) e a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pela inestimável formação profissional e pessoal.

Aos amigos, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

Os que se encantam com a Prática sem a ciência são
como os timoneiros que entram no navio sem timão
nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo da Vinci.

RESUMO

A Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Atualmente, existem dois fármacos utilizados no tratamento desta doença, o Nifurtimox e o Benznidazol (BZ). Infelizmente o uso desses medicamentos resultam em muitos efeitos colaterais devido a toxicidade e apresentam baixa eficácia no tratamento em estágios mais avançados da doença. Neste contexto, novos medicamentos antiparasitários que atuam por diferentes mecanismos de ação são necessários para tratar pacientes infectados com o *T.cruzi*, com o propósito de evitar efeitos colaterais graves e obter maior eficácia terapêutica. A Cumarina utilizada nesse estudo, foi obtida por meio de síntese orgânica. Testes *in vitro* realizados anteriormente mostraram que a Cumarina apresenta baixa toxicidade e uma excelente atividade tripanocida *in vitro*, sendo então recomendada para testes *in vivo*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade tripanocida dessa nova molécula de Cumarina em camundongos *Swiss* infectados com o *T.cruzi*. Para cumprir com objetivo, 50 camundongos *Swiss*, fêmeas, com 30 dias de idade foram infectados com a cepa Y do *T.cruzi*, posteriormente foram tratados por 5 dias, durante a fase aguda da infecção, com Cumarina nas concentrações 50, 100 e 250 mg/kg. Os grupos tratados com diferentes concentrações de Cumarina apresentaram parasitemia significativamente maior que o grupo tratado com BZ. Na avaliação histológica de coração observou-se hiperemia, processo inflamatório, e necrose em todos os grupos infectados, sendo esses parâmetros mais intensos nos animais tratados com BZ, Cum 100 e 250 mg/kg. Na avaliação histológica de colón, também foi possível observar inflamação e necrose, entretanto, ao contrário do observado no coração, o tratamento com BZ e Cum 250 mg/kg foi capaz de reduzir as alterações histopatológicas na maioria dos animais desses grupos. Desta forma, embora a Cumarina não tenha mostrado sinais de toxicidade *in vivo* em testes previamente realizados pelo grupo de pesquisa, o seu uso não apresentou resultados satisfatórios para o tratamento da infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi*, visto que não foi capaz de reduzir os níveis parasitêmicos e as alterações histopatológicas cardíacas.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1 Revisão Bibliográfica.....	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas	1
1.2 Epidemiologia da doença de Chagas.....	3
1.3 Farmacoterapia da doença de Chagas	4
1.4 Busca por novas terapias.....	5
1.5 Cumarinas.....	5
2 Justificativa	7
3 Objetivos.....	7
3.1 Objetivo Geral	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4 Material e métodos	8
4.1 Avaliação da atividade tripanocida	8
4.1.1 Curva de parasitemia.....	9
4.1.2 Taxa de sobrevivência.....	10
4.1.3 Processamento dos tecidos.....	10
4.1.4 Coloração histológica	10
4.2.3 Análise histopatológica qualitativa de coração e cólon.....	10
4.2.4 Análise histopatológica quantitativa de inflamação do tecido muscular cardíaco.....	11
4.2 Análise estatística	11
5 Resultados e discussão.....	11
5.1 Avaliação da atividade tripanocida	11
5.2 Avaliação das alterações histológicas presentes no coração e cólon dos animais.....	14
6 Conclusão	23
7 Perspectivas.....	23
8 Referências	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classes de Cumarinas: (1) 1,2 benzopirona estrutura base da Cumarina, (2) 7-furanocumarina, (3) 7-metoxicumarina, (4) 7-piranocumarina.	6
Figura 2: Fluxograma Metodologia.	8
Figura 3: Curva de parasitemia.	13
Figura 4: Sobrevida.....	13
Figura 5: Análise quantitativa do processo inflamatório no coração de animais infectados com a cepa Y do T.cruzi e tratados na fase aguda.	15
Figura 6: Avaliação da presença de necrose no tecido muscular cardíaco.	16
Figura 7: Avaliação da presença de hiperemia no tecido muscular cardíaco.	17
Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados com a cepa Y do T. cruzi e tratados na fase aguda... ..	19
Figura 9: Análise qualitativa da presença de infamação no cólon dos animais estudados.	20
Figura 10: Análise qualitativa da presença de infamação no cólon dos animais estudados. ...	21
Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de camundongos infectados com a cepa Y do T. cruzi e tratados na fase aguda.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros avaliados na parasitemia.....	12
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BZ	Benznidazol
DAI	Dias Após a Infecção
DC	Doença de Chagas
DP	Desvio Padrão
DPMP	Dia do Pico Máximo de Parasitemia
HGB	Hemoglobina
IS	Índice de Seletividade
NT	Não Tratado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
PMP	Pico Máximo de Parasitemia
PP	Período Patente
PPP	Período Pré-Patente
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças
MSF	Médicos Sem Fronteiras
WHO	World Health Organization
Cum	Cumarina
INT	Infectado e Não Tratado

1 Revisão Bibliográfica.

1.1 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) foi descoberta há mais de um século, abril de 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Chagas, C., 1909). Inicialmente Carlos Chagas, vinha desenvolvendo um trabalho no combate à Malária na região de Lassance, Minas Gerais, ao realizar análises em seu laboratório encontra uma nova espécie de tripanossomo no sangue do sagui, *Callithrix penicilata*, descrevendo-o como *Trypanosoma minasense* em 1908 que originou um trabalho publicado no Brazil-Medico uma das principais revistas médicas do país, e em 1909 no Archiv fur Schiffs- and Tropenhygiene, na Alemanha.

Posteriormente a descoberta do *Trypanosoma minasense* em saguis, Carlos Chagas observa um inseto hemíptero que se escondia durante o dia nas frestas e orifícios das paredes de barro batido das casas, (casas de adobe) e com hábitos alimentares noturnos picando mamíferos enquanto dormiam. Esse hemíptero era conhecido vulgarmente por “barbeiro” pelo fato de picar a face dos habitantes ao se alimentar. Examinando o inseto, Carlos Chagas observou uma quantidade considerável de protozoários flagelados com características de *Crithidia* que é um gênero de protozoários tripanossomos encontrados nos intestinos dos artrópodes e tratava-se de formas intermediárias dos tripanossomos observados anteriormente por ele nos saguis. Afim de confirmar sua hipótese, enviou para Manguinhos, insetos parasitados para que fossem utilizados nos experimentos com macacos da mesma espécie. O experimento, foi conduzido por Oswaldo Cruz, e resultou em uma infecção bem sucedida, porém, os parasitos encontrados possuíam morfologia completamente diferente do tripanossomo encontrado anteriormente por Chagas no sagui. Ficou constatado que se tratava de uma espécie nova de tripanossomo até então desconhecida, denominou-se a nova espécie *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz.

Carlos Chagas continuou seus estudos e ao examinar animais domésticos encontrou tripanossomos no sangue desses animais. Em 14 de abril de 1909, observou um parasito no sangue de uma criança febril cuja as características morfológicas eram idênticas ao *Trypanosoma cruzi* recém descoberto por ele. Berenice era o nome da criança, ela morava em uma casa infestada por "barbeiros" infectados com o mesmo parasito. Em nota prévia enviada ao Brasil, o médico Carlos Chagas anunciou a descoberta.

Após estudar e conhecer o ciclo do tripanossomo quase que por completo, Carlos Chagas descreveu as manifestações clínicas da fase aguda da doença e que tornou público sua descoberta sendo um marco histórico (Chagas, C., 1909).

O *T. cruzi* infecta naturalmente mais de 100 espécies diferentes de mamíferos como os seres humanos, animais domésticos e animais silvestres, além dos hospedeiros invertebrados, os insetos vetores. O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre em duas fases distintas: uma evidenciada pela presença do parasito no interior do hospedeiro invertebrado (vetor) e outra evidenciada pela sua presença no interior do hospedeiro vertebrado (AZAMBUJA, 2017).

A fase no hospedeiro invertebrado ocorre nos transmissores da doença de Chagas, que são insetos hematófagos, esses vetores são denominados popularmente por “barbeiros”. Após ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado o barbeiro passa a carrear ao longo de seu tubo digestivo o *T. cruzi*. Uma drástica transformação, ocorre após ser ingerido, o *T. cruzi* diferencia-se em epimastigota que se multiplicam por divisão binária perpetuando a infecção do vetor por toda sua vida. Na porção posterior do intestino do barbeiro as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas, processo conhecido como metaciclogênese. As formas metacíclicas são eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor, e são infectantes ao hospedeiro vertebrado (Fiocruz, 2017).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é regulado por fatores fisiológicos e bioquímicos do inseto vetor, por isso esse ciclo depende da espécie do inseto, da cepa do parasito, carga parasitária ingerida e fatores ambientais. (Brener, Z., 1997; Neves, D. et al, 1995; Rey, L., 2001).

A fase no hospedeiro vertebrado ocorre em diversas espécies de mamíferos, dentre elas, o homem que é o hospedeiro definitivo mais importante. O parasito precisa adentrar no tecido celular do mamífero e penetrar a célula para cumprir o ciclo evolutivo, desta forma, a infecção independente do mecanismo de transmissão, seja ela pela derme, oral, mucosa oftálmica ou transfusão sanguínea, obrigatoriamente o *T. cruzi* terá que penetrar o epitélio do mamífero e alcançar um tecido alvo. No hospedeiro vertebrado, durante ou logo após o repasso sanguíneo o vetor excreta formas tripomastigotas metacíclicas, que por sua vez, penetram pelo local da picada ou nas mucosas podendo invadir os primeiros tecidos e tipos de células encontrados, e estes podem ser macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ao invadir a célula o *T. cruzi* passa por uma diferenciação em amastigota e se multiplica promovendo a proliferação intracelular e posteriormente a liberação no espaço intercelular de formas tripomastigotas, bem como algumas formas intermediárias e

amastigotas, estas últimas em menor número (Fiocruz, 2017). Estas formas tem o potencial de invadir novas células próximas ao sítio de infecção e também podem alcançar a corrente sanguínea e promover infecções em todos os tecidos do hospedeiro, invadir diferentes tipos celulares realizando um novo ciclo celular ou podem ser destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro (Brener, Z., 1997; Neves, D. et al, 1995 Rey, L., 2001).

1.2 Epidemiologia da doença de Chagas

Presente em diversos países, estima-se que haja entre 6 e 7 milhões de pessoas infectadas em todo mundo e cerca de 70 milhões de pessoas em risco de contrair DC nos 21 países endêmicos das Américas. A DC é hoje considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas. Essa infecção parasitária causa a morte de 12 mil pessoas nos países endêmicos a cada ano (WHO, 2021). Sabe-se que menos de 10% das pessoas infectadas tem o diagnóstico confirmado a tempo e menos ainda recebem o tratamento adequadamente (DNDi, 2019).

No Brasil, é estimado entre 1,9 e 4,6 milhões de pessoas afetadas pela DC, das quais 60% vivem em áreas urbanas, e provocam grandes impactos sociais, previdenciários e assistenciais. Gerações de pessoas convivem com a DC, e a maioria não conhece às possibilidades de tratamentos existentes (MSF, 2018).

A urbanização e o fluxo de pessoas na América Latina proporcionaram a migração da doença de regiões rurais para os grandes centros e áreas urbanas. A grande movimentação intercontinental de pessoas da América Latina para outros países fora da América, como a Europa e alguns países da África, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental, proporcionou a disseminação da doença se tornando uma preocupação epidemiológica global (OPAS, 2020).

Segundo o diretor médico do Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas da OMS (Organização Mundial da Saúde), Pedro Albajar Viñas, nos países não latino-americanos a DC não é transmitida por insetos triatomíneos. Dessa forma evidencia-se nesses países as transmissões não vetoriais, sendo elas, a transmissão transfusional, transplante de órgãos, gestacional, e por acidentes de laboratório (OPAS, 2020). O Ministério da Saúde do Brasil no dia 9 de junho de 2006, recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Apesar do Brasil ter recebido

esse certificado é importante salientar que, tal certificação não representa a erradicação da DC tão pouco de sua transmissão, mas sim, de não ter mais notificação ou valores de prevalência irrisórios da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* no país, e com isso deve-se atentar a outras formas de infecção não vetorial da DC no Brasil e na América Latina como a infecção oral que hoje representa a principal forma de contágio da DC sendo a forma de contágio mais notificada no Brasil e configurando uma problemática importante em relação a epidemiologia da DC (Brasil, 2020).

1.3 Farmacoterapia da doença de Chagas

O final da década de 60 e início dos anos 70 foram marcados pelo surgimento dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol para o tratamento da DC. Sendo que o Nifurtimox (5-nitrofurano) foi introduzido na terapêutica em 1967 e o Benznidazol (2 - nitroimidazol) em 1972 (Boainain, E. & Rassi, A., 1979). Na década de 1980, o Nifurtimox foi retirado do mercado, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul, devido aos diversos efeitos colaterais sofridos pelos pacientes (Cançado, 1997). Ambos possuem eficácia considerável no tratamento da fase aguda, entretanto, na fase crônica sua eficiência é reduzida. Somado a esta condição tem-se a elevada toxicidade destes compostos o que acarreta efeitos colaterais frequentes e intensos durante o tratamento, como: parestesias, polineurite periférica, mialgia, febre, reações cutâneas como dermatites com erupção e distúrbios digestivos graves. Essa problemática evidencia a necessidade de se buscar novos fármacos que apresentem uma melhor eficácia na fase crônica, bem como menores efeitos colaterais (Urbina, J. 2010).

Apesar do Benznidazol e o Nifurtimox serem utilizados para o tratamento da doença de Chagas, estes compostos são considerados fármacos não ideais para o tratamento dessa doença. Segundo a OMS o fármaco ideal para o tratamento da doença de Chagas deve atender as seguintes exigências: cura parasitológica de casos agudos e crônicos; ação eficaz com uma única dose ou poucas doses; acessibilidade aos pacientes, custo reduzido; baixos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos; nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento e nenhuma indução da resistência (WHO, 2019).

1.4 Busca por novas terapias

Segundo Bezerra, W. et al (2012) a falta de um tratamento eficaz é um dos motivos que contribui para que as doenças parasitárias ainda sejam um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico de países mais pobres, pois estas doenças diminuem a expectativa e a qualidade de vida das pessoas acometidas, deixando-as muitas vezes incapacitadas de realizar suas atividades cotidianas. Desta forma, o desenvolvimento de um novo medicamento para tratar a doença de Chagas é importante.

Durante décadas, muitas classes de substâncias foram testadas *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi*. Sendo que os primeiros compostos desenvolvidos experimentalmente para o tratamento específico da doença de Chagas foram o atoxyl (arsênico), tintura de fucsina, tártaro emético (antimonial pentavalente), cloreto de mercúrio, derivados quinoleínicos, arsenobenzóis sulfurados, derivados fenantridínicos, compostos nitrofurânicos e antagonistas purínicos. Todos evidenciaram nítida atividade tripanosomicida, em maior ou menor grau, diminuíram o índice de mortalidade dos animais infectados, mas não foram capazes de combater a persistência da infecção (Rassi, A.& Ferreira, H. 1971; Croft, L., 1999; Coura, J., 2002).

Dentre os compostos já testados, os compostos cumarínicos podem ser potenciais fármacos para o tratamento da DC. Na busca por moléculas que pudessem servir de orientação no desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da DC, verificou-se que alguns derivados de carboxilato de brevifolina isolados a partir da planta *Geranium bellum Rose*, tinham uma atividade biológica que inativa a enzima triosefosfato isomerase de *T.cruzi* (TcTIM) importante em uma das etapas da via glicolítica do *T. cruzi*, de uma forma específica da espécie (Gayosso L. et al., 2009).

1.5 Cumarinas

A biossíntese da Cumarina é proveniente do metabolismo secundário da glicose, derivadas da via do ácido chiquímico, presente em diversas formas de vida, como vegetais, fungos e bactérias, sendo encontradas principalmente nas famílias Asteraceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae, Thymeleaceae, Apiaceae e Rutaceae (CZELUSNIAK, 2012). Os compostos cumarínicos podem ser classificados, em quatro grupos de acordo com a sua estrutura química: as Cumarinas simples (1), que possuem estrutura química base das Cumarinas apresentando um anel benzênico fusionado a uma lactona; as furanocumarinas (2),

que apresentam um anel de furano fusionado a sua estrutura base das Cumarinas; as Cumarinas substituídas no anel de lactona (3) e as piranocumarinas (4) apresentando um anel pirano fusionado a estrutura base das Cumarinas (SOUZA,2005).

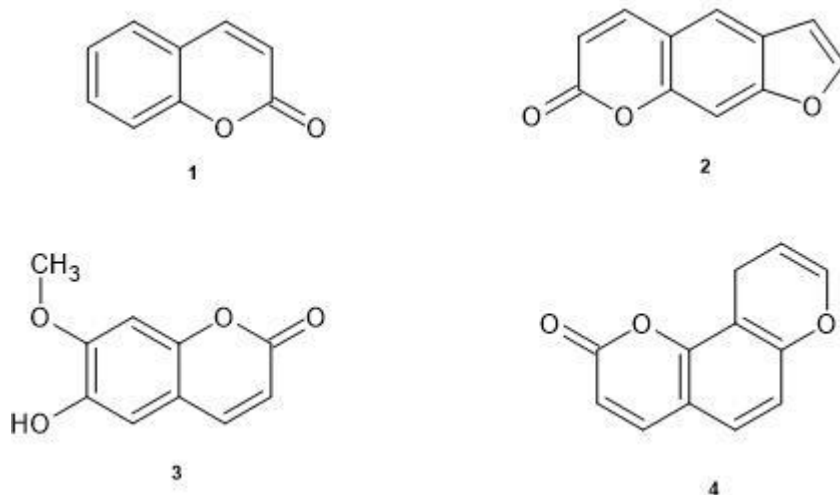


Figura 1 Classes de Cumarinas: (1) 1,2 benzopirona estrutura base da Cumarina, (2) 7-furanocumarina, (3) 7-metoxicumarina, (4) 7-piranocumarina.

Compostos cumarínicos provenientes de extratos vegetais e outras Cumarinas sintéticas e semissintéticas, possuem diversas atividades farmacológicas. Diversos trabalhos demonstram atividade antibacteriana, antifúngica e tripanocida de compostos cumarínicos *in vitro*, evidenciando essa classe de substância química como bastante relevante para um potencial fármaco no tratamento da DC o que instigou a execução desse trabalho (SOUZA, 2005). A atividade tripanocida e leishimanicida de substâncias com esqueleto base molecular de pirano cumarinas foi descrita na literatura. Esses estudos evidenciam uma potencial bioatividade contra o *T. cruzi* e deixa esperançosa possibilidade de que compostos cumarínicos sintéticos, semisintéticos e naturais, possam ter atividade tripanocida sem apresentar toxicidade (SOUZA, 2005. PIZZOLATTI e colaboradores,2008. MARTIN,2018.).

Em um trabalho anterior, por meio da síntese orgânica foi possível obter uma nova molécula de Cumarina. Previamente foram realizados ensaios contra as formas infectantes tripomastigotas sanguíneos e amastigotas, apresentando um excelente índice de seletividade (IS) > 128 sobre as formas amastigotas, isso é particularmente importante uma vez que um (IS) > 50 é necessário para que fármacos tripanocidas em desenvolvimento sejam indicados para testes *in vivo* (Coelho et al., 2018). Assim com estes resultados favoráveis à experimentação *in vivo*, neste trabalho iniciamos a avaliação da atividade tripanocida dessa nova molécula de Cumarina. (XAVIER,2017). Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo

de pesquisa, foram realizados testes de citotoxicidade da Cumarina sendo avaliados alterações histopatológicas de cólon, coração, cérebro, fígado, baço, duodeno, pulmão e rins. Além dessas análises foram avaliados parâmetros bioquímicos e clínicos dos animais. Nesse trabalho não foi observado nenhuma alteração histopatológica e todos os parâmetros bioquímicos e clínicos foram normais, evidenciando assim a segurança e nenhuma toxicidade foi apresentada pela Cumarina, inclusive o grupo não infectado e não tratado tido como controle nesse presente trabalho, é o mesmo grupo controle no referido experimento (SILVA, 2018).

2 Justificativa

Mesmo que a doença de Chagas tenha sido descoberta há mais de 100 anos, existem apenas duas opções de tratamento, o Nifurtimox e o Benznidazol, sendo este último o único comercializado no Brasil. Ambos os fármacos possuem baixa eficácia na fase crônica da doença, diversos efeitos colaterais e longo período de tratamento, sendo assim estão muito distantes de serem considerados ideais para o tratamento da doença de Chagas. Neste contexto, destaca-se uma classe de substância chamada de Cumarinas que apresentam um grande potencial tripanocida. Dessa forma, é importante avaliar esta classe de substâncias quanto à sua possível atividade tripanocida *in vivo*, visto que o desenvolvimento de fármacos menos tóxicos e mais efetivos irá contribuir para melhoria terapêutica da doença de Chagas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações histopatológicas após o tratamento com uma nova molécula de Cumarina em camundongos *Swiss* infectados com o *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a curva de parasitemia, período pré-patente, período patente, dia do pico máximo de parasitemia;
- Avaliar a taxa de sobrevida;
- Analisar as alterações histológicas presentes no coração e cólon dos animais.

4 Material e métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2017/40).

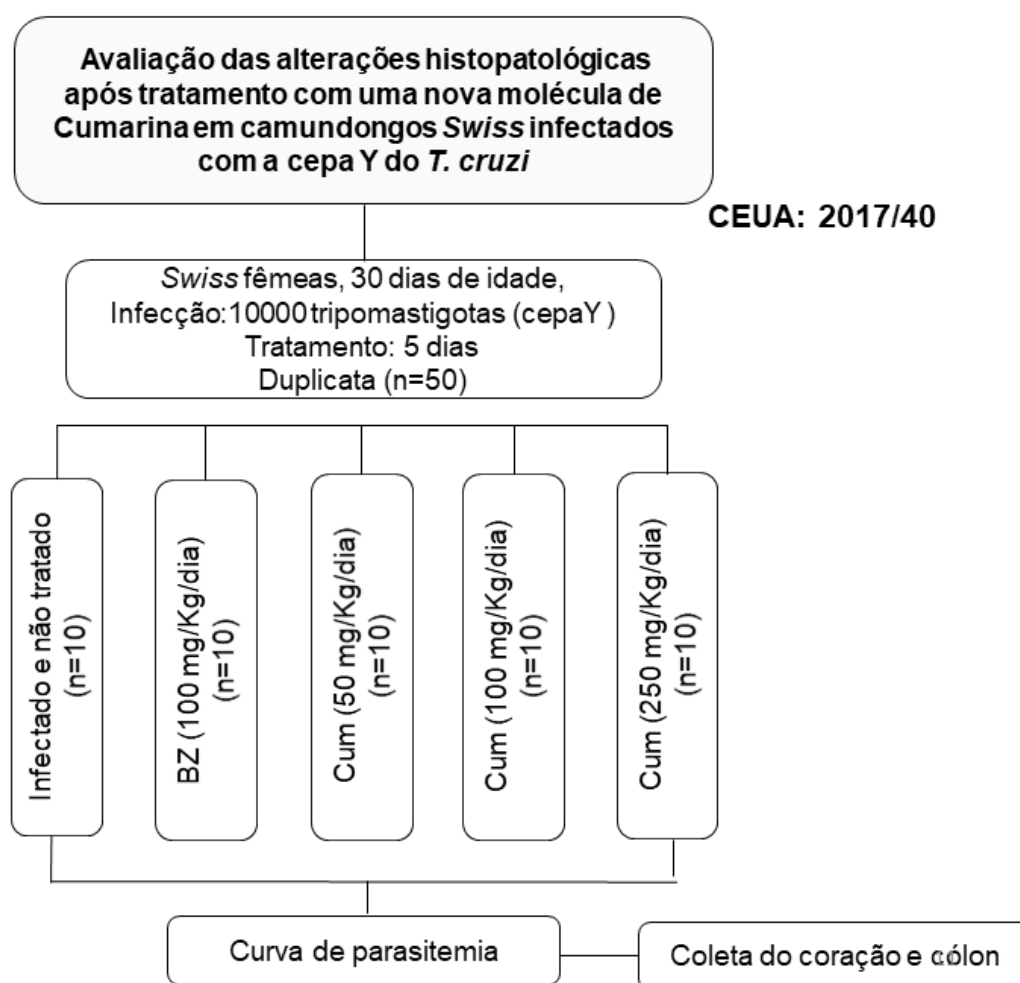


Figura 2: Fluxograma Metodologia.

4.1 Avaliação da atividade tripanocida

Para a avaliação atividade tripanocida da molécula de Cumarina na fase aguda da infecção experimental com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* foram utilizados 50 camundongos Swiss, fêmeas, pesando 18-20g. Os animais foram distribuídos em 05 grupos: Infectados e não

tratados (n=10); Infectados e tratados com BZ 100mg/kg (n=10) e outros três grupos tratados com Cumarina 50, 100, 250mg/kg (n =10 animais/cada). A infecção foi realizada pela via intraperitoneal com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y. Foram utilizados apenas os animais que apresentaram positividade na parasitemia. A qual foi realizada segundo a metodologia adaptada de Brener (Brener 1962). Os animais que apresentaram positividade das formas tripomastigotas sanguíneas na parasitemia, receberam tratamento (dose única diária) por meio de gavagem (via oral) durante cinco (05) dias consecutivos. Foram determinadas também, as taxas de sobrevivência para cada grupo conforme descrito no item 4.1.2.

No 14º DAI, os animais receberam por via intraperitoneal os fármacos Ketamina (90mg/Kg) e Xilazina (9mg/Kg). Após a completa sedação e anestesia, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e extraídos cérebro, coração, rins, pulmão, fígado, baço, cólon, duodeno e estômago. Os tecidos foram lavados com solução de PBS1x e fixados em solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) por pelo menos 5 dias. Posteriormente os tecidos foram processados e corados conforme descrito nos itens 4.1.3 e 4.1.4 respectivamente.

4.1.1 Curva de parasitemia

O exame de sangue a fresco foi realizado diariamente, após a confirmação da infecção, utilizando-se metodologia adaptada de Brener (1962). Foram coletados 5µL de sangue da veia caudal dos camundongos, posteriormente confeccionou-se lâminas, as quais foram analisadas ao microscópio óptico. A análise consiste na contagem do número de parasitos presentes em 50 campos aleatórios até a negatização do exame, por cinco dias consecutivos. Desta forma, foram determinados o período pré-patente, período patente e pico máximo de parasitemia. A curva de parasitemia foi plotada para cada grupo experimental e expressa em número de tripomastigotas sanguíneas por 0,1mL de sangue. Por meio da curva de parasitemia foram determinados:

- **Período pré-patente (PPP):** período compreendido entre a inoculação e o primeiro dia de detecção do parasito no sangue periférico do animal;
- **Período patente (PP):** período compreendido entre o primeiro dia de exame a fresco positivo até a completa negatização da parasitemia;
- **Dia do pico máximo de parasitemia (DPMP):** corresponde ao dia de ocorrência do máximo de parasitemia;

- **Pico máximo de parasitemia (PMP):** corresponde ao máximo de parasitemia e foi expresso em número de tripomastigotas sanguíneos/0,1 mL de sangue.

4.1.2 Taxa de sobrevivência

Os animais (mesmos da determinação da parasitemia) foram observados diariamente até o dia da eutanásia. A sobrevivência foi registrada e expressa em percentagem cumulativa.

4.1.3 Processamento dos tecidos

Após a fixação dos tecidos, esses foram incubados por 40min em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%) e em álcool absoluto (2 vezes), para desidratação. No processo de diafanização, os tecidos foram submersos em xilol por 30min (2 vezes). Em seguida os cassetes histológicos foram mergulhados em parafina liquefeita por 12 a 24horas. Após a parafinização, os tecidos foram emblocados em parafina com cera de abelha 5% com o auxílio de moldes de alumínio.

4.1.4 Coloração histológica

Por meio de microtomia foram confeccionadas lâminas de cortes histológicos com espessura de 4µm as quais, posteriormente foram desparafinadas e hidratadas. Os cortes histológicos foram incubados em xilol por 30min, este processo foi realizado duas vezes. Para hidratação, os cortes histológicos foram incubadas por 5min em álcool absoluto (duas vezes), em seguida em concentrações decrescentes de álcool (90, 80 e 70%) e em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram submersas na solução de hematoxilina de Harris por 1,5min e lavadas em água corrente por 30min. Em seguida, foram incubadas em solução de eosina por 1,0min e lavadas em água corrente por 15s. Posteriormente as lâminas foram montadas com o auxílio de Entellan^R e lamínula.

4.2.3 Análise histopatológica qualitativa de coração e cólon.

As lâminas histológicas de coração e cólon dos animais de cada grupo desse estudo, foram analisadas qualitativamente conforme seu aspecto histológico e presença de alterações histopatológicas, necrose e hiperemia. Cada lâmina foi observada no microscópio óptico Leica DM5000B na objetiva de 40x, totalizando um aumento de 400 vezes. Foram analisados 35 campos aleatórios do tecido muscular cardíaco e de cólon de cada um dos animais de todos os grupos estudados, conforme metodologia padronizada pelo grupo de pesquisa.

4.2.4 Análise histopatológica quantitativa de inflamação do tecido muscular cardíaco.

As lâminas histológicas de coração dos animais de cada grupo desse estudo, foram analisadas quantitativamente com intuito de verificar o processo inflamatório no tecido muscular cardíaco. Foi coletadas microfotografias de 25 campos aleatórios do tecido muscular cardíaco de Cada lâmina de cada um dos animais de todos os grupos estudados. As microfotografias foram adquiridas com o auxílio do microscópio óptico Leica DM5000B na objetiva de 40x, totalizando um aumento de 400 vezes. Após a coleta das microfotografias, as mesmas foram analisadas com o auxílio do software Leica Qwin V3, em que, se contou o número de núcleos celulares presentes em cada microfotografia dos 25 campos de cada lâmina, e ao final calculou-se a média aritmética da quantidade de núcleos contados para cada lâmina histológica referente a cada animal dos grupos estudados. O resultado dessa análise foi compilado em um gráfico quantitativo de inflamação (Figura 4).

4.2 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA)*, sendo as diferenças consideradas significativas quando os valores de p foram inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). O teste D'Agostino-Pearson foi realizado para verificar os padrões de normalidade. Para os dados classificados como paramétricos foram realizadas análises de variância (ANOVA *one-way*) e Teste T *Student* para comparação entre os grupos. A análise dos dados não-paramétricos foi realizada utilizando-se *Kruskal-Wallis* seguida pelo teste de Dunns.

5 Resultados e discussão

5.1 Avaliação da atividade tripanocida

Neste projeto a atividade tripanocida da Cumarina na fase aguda da DC foi avaliada. Os animais apresentaram parasitemia positiva no quarto dia após a infecção (DAI). O DPMP dos animais tratados com BZ ocorreu no quinto DAI, já o grupo não tratado e os grupos tratados com 100, 50 e 250mg/kg Cumarina apresentaram pico de parasitemia no oitavo DAI. Os animais tratados com BZ 100mg/Kg apresentaram menor período patente, sendo este

compreendido entre o 4 DAI e 9 DAI. Além disso, os animais tratados com BZ 100mg/Kg também apresentaram o menor PMP, sendo 62,150 tripomastigotas/0,1 mL de sangue (Tabela 1). O grupo não tratado e os grupos que receberam diferentes concentrações de Cumarina tiveram um número significativamente maior de tripomastigotas/0,1mL de sangue quando comparados ao grupo tratado com BZ (Figura 3).

Tabela 1 Parâmetros avaliados na parasitemia.

Parâmetros	Não Tratado	Cumarina 50 mg/kg	Cumarina 100mg/kg	Cumarina 250mg/kg	100mg/kg (BZ)
PPP (dia)	1-4	1-4	1-4	1-4	1-4
PP (dia)	14	14	14	14	9
DPMP	8	8	8	8	5
PMP (tripomastigotas /0,1 mL de sangue)	903,300	912,200	858,100	892,750	62,150

O objetivo do tratamento da doença na fase aguda é a supressão da parasitemia e erradicar o parasito ainda presente na corrente sanguínea do hospedeiro, além de combater os sinais/sintomas apresentados nessa fase e prevenir a progressão para a forma crônica da doença (Antunes et al., 2016. SBAC, 2018). Neste teste, os animais tratados com BZ negativaram a parasitemia mais rapidamente em relação aos demais grupos infectados e tratados e apresentou 100% de sobrevivência. No entanto, mesmo em vista desse resultado, dados da literatura mostram que melhorias no tratamento da DC são necessárias (Amaral et al., 2017). O estudo BENEFIT, por exemplo, um ensaio clínico multicêntrico, duplo-cego, mostrou que os pacientes tratados com BZ tiveram uma redução na parasitemia quando comparados ao placebo, mas não levaram a melhorias clínicas nos pacientes. Dessa forma, a busca por um tratamento que melhore a qualidade de vida do paciente é importante (Morillo et al., 2015).

Neste estudo, ao contrário dos resultados encontrados *in vitro*, nenhuma das doses de Cumarina testadas foram eficazes na redução da parasitemia na fase aguda da DC (Figura 1). Esse resultado é indesejável, pois, o tratamento adequado da DC na fase aguda é fundamental para a prevenção da evolução da doença para a forma crônica (Antunes et al., 2016).

Os animais tratados com BZ apresentaram 100% de sobrevivência. Animais tratados com 100 e 250mg/kg de Cumarina apresentaram 60% de sobrevivência. Os animais que não receberam tratamento e os animais tratados com 50mg/kg Cumarina apresentaram 20 e 30% de sobrevivência, respectivamente (Figura 4).

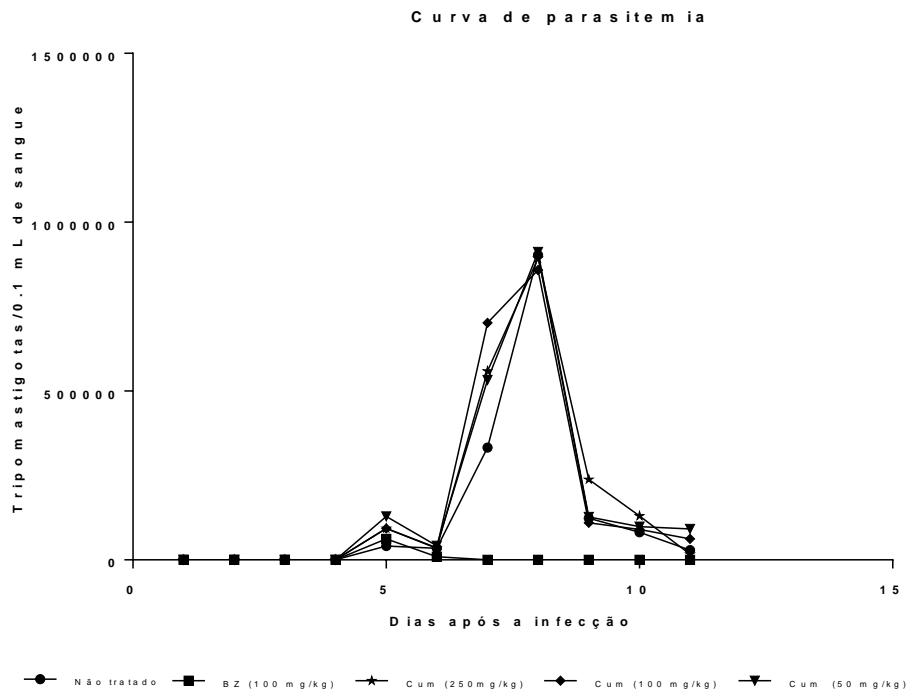


Figura 3: Curva de parasitemia.

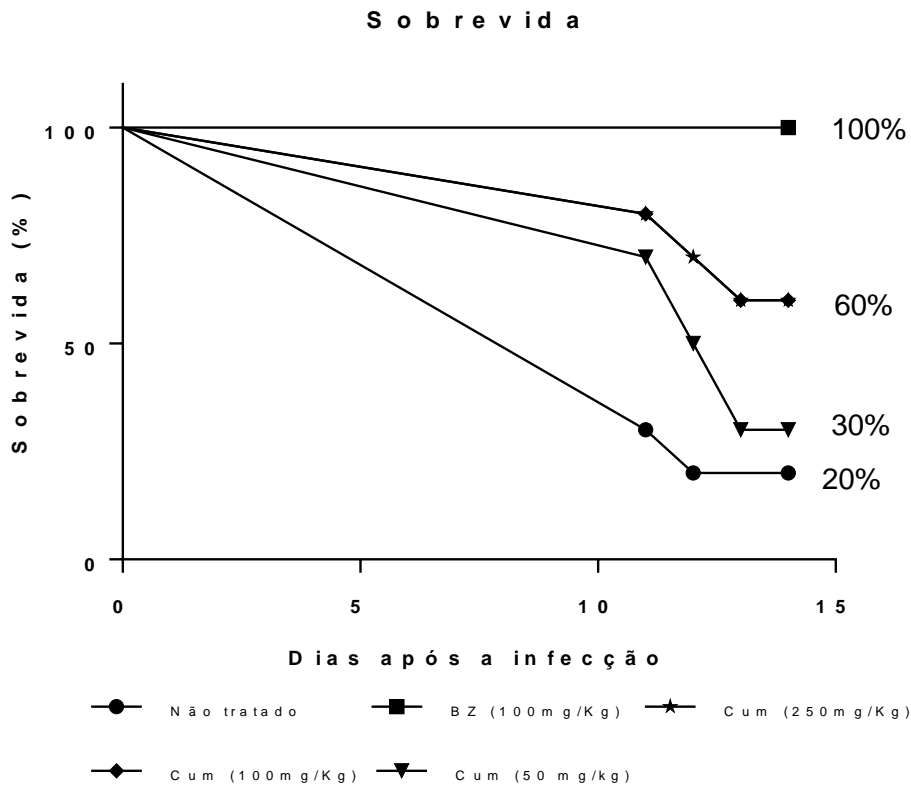


Figura 4: Sobrevida

5.2 Avaliação das alterações histológicas presentes no coração e cólon dos animais.

5.2.1 Análise quantitativa do processo inflamatório no tecido muscular cardíaco.

Foi evidente a diferença estatística em relação ao processo inflamatório no tecido muscular cardíaco dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos deste experimento. A linha tracejada indica o o número de células por 34614 micrômetros quadrados do grupo de animais não infectados e não tratados provenientes de um estudo realizado anteriormente. Os grupos experimentais Cumarina (50mg/Kg), Cumarina (100mg/Kg), Cumarina (250mg/Kg) e infectado e não tratado apresentaram um número significativamente maior de células em relação ao grupo controle. Um número de células maior em relação ao número de células observadas no grupo controle, implica que sejam células do sistema imune e assim evidenciam inflamação. Em um processo inflamatório células do sistema imune guiados por mediadores inflamatórios migram-se para o tecido acometido pelo processo inflamatório (Robbins.Patologia Básica, 9ªEd). Nesse processo células do sistema imune estão presentes no tecido combatendo o agente causador da lesão que induziu o processo inflamatório. Dessa forma uma contagem de células maior no tecido em relação ao grupo não infectado, implica que essas células extras que fizeram a contagem de células exceder o número contabilizado no grupo controle não infectado sejam células do sistema imune, evidenciando um processo inflamatório. Essa diferença quantitativa de células ficou representado no gráfico (Figura 5).

Inflamação: Coração

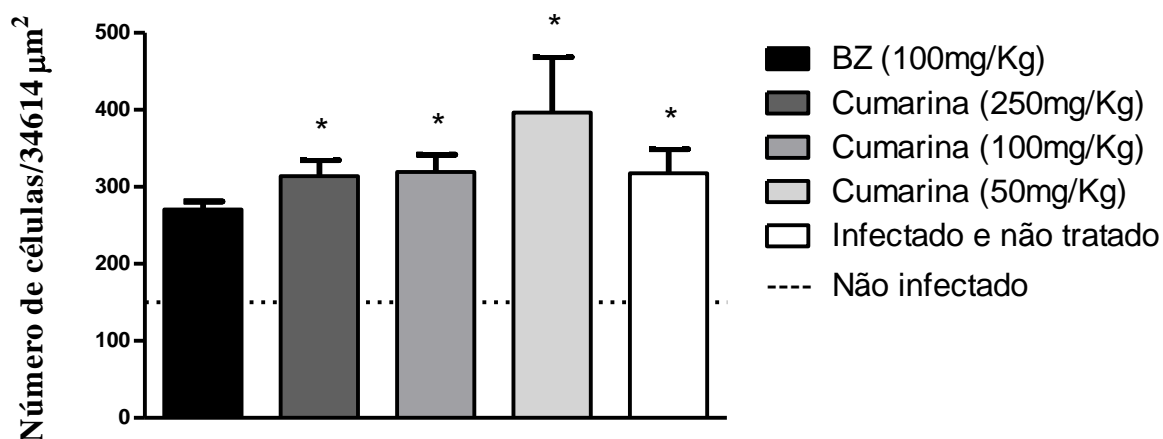


Figura 5: Análise quantitativa do processo inflamatório no coração de animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados na fase aguda. *Número de células inflamatórias significativamente maior ($p < 0,05$) que o grupo não infectado representado pela linha tracejada.

5.2.2 Análise qualitativa dos aspectos histopatológicos do tecido muscular cardíaco.

A análise qualitativa de todas as lâminas foi compilada em dois gráficos, um apresenta a presença de necrose nos diferentes grupos estudados (figura 6) e hiperemia (figura 7). Apresentam alterações histopatológicas presentes no tecido muscular cardíaco dos animais de cada grupo estudado nesse experimento. As alterações histopatológicas analisadas foram definidas em, presença de necrose e presença de hiperemia.

Utilizou-se o microscópio Leica DM5000B Zeiss AxioImager.Z2, e observou-se todo o tecido presente nas lâminas a fim de verificar qualquer alteração histopatológica em relação ao grupo não infectado.

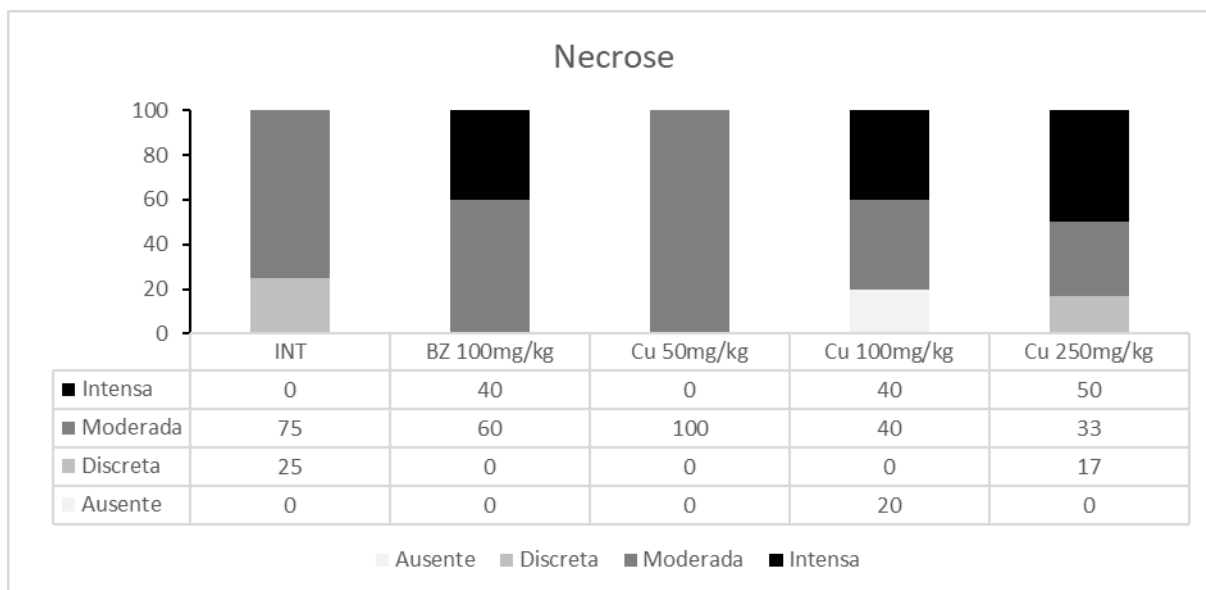


Figura 6: Avaliação da presença de necrose no tecido muscular cardíaco. Grupo Infectado e não Tratado (INT), Infectado e tratado com Benzinidazol 100mg/kg (BZ 100mh/kg), Infectado e tratado com Cumarina 50, 100, 250mg/kg (Cu 50mg/kg, Cu 100mg/kg, Cu 250mg/kg)

Conforme observado na figura 6, a presença de necrose foi observada em todos os grupos, variando em presença discreta, moderada e intensa. Com exceção do grupo não infectado todos os animais dos demais grupos do experimento apresentaram necrose tecidual, possivelmente causada pela lise celular no momento da diferenciação das formas amastigotas do *T.cruzi* em formas tripomastigotas e seu extravasamento para o meio extracelular.

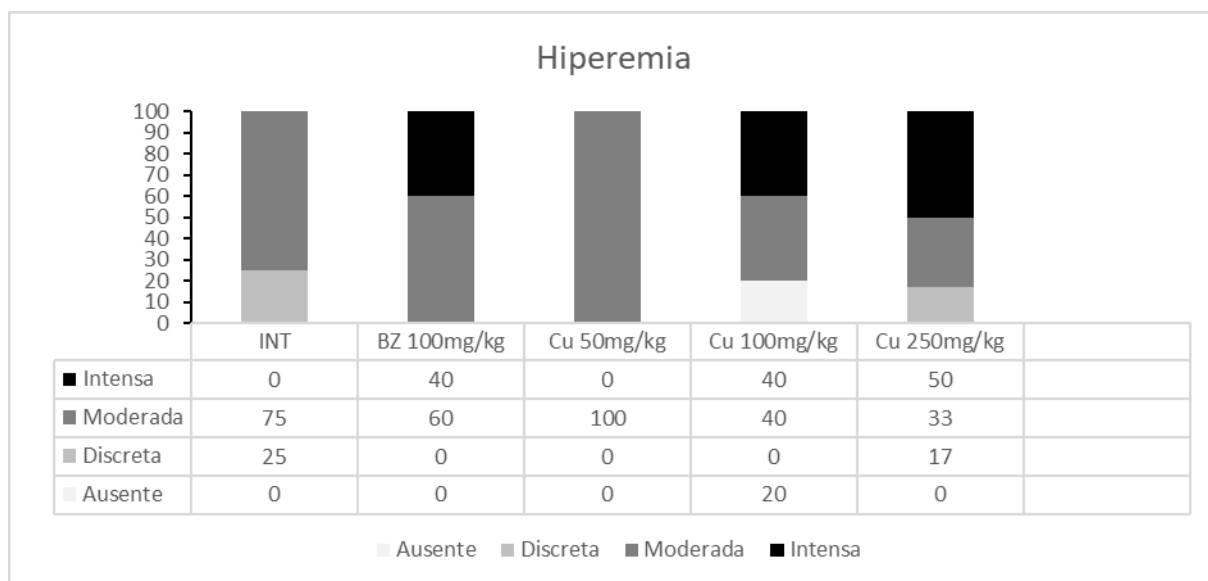


Figura 7: Avaliação da presença de hiperemia no tecido muscular cardíaco. Grupo Infectado e não Tratado (INT), Infectado e tratado com Benzinidazol 100mh/kg (BZ 100mh/kg), Infectado e tratado com Cumarina 50, 100, 250mg/kg (Cu 50mg/kg, Cu 100mg/kg, Cu 250m)

Na figura 7 observada acima, fica evidente a presença de hiperemia em todos os grupos infectados desse experimento. A prevalência de hiperemia moderada é maior nos grupos INT, BZ 100mg/kg e Cu 100mg/kg. No grupo Cu 50mg/kg a prevalência foi de 100% de hiperemia moderada.

Na figura 8 apresenta os cortes histológicos de tecido muscular cardíaco dos animais de cada grupo deste estudo. No grupo não infectado, observa-se que o tecido muscular cardíaco não apresenta alterações histopatológicas.

Com relação ao grupo infectado e não tratado, Observa-se hiperemia discreta, esse fenômeno vascular é representado por modificações na microcirculação, que, são comandadas por mediadores liberados durante uma irritação no tecido, como em um processo inflamatório causado por infecção, semelhante ao que ocorre nesse experimento (Bogliolo – Patologia, 9.^a edição).

No grupo infectado e tratado com BZ, fármaco de referência no tratamento da doença de Chagas, foi observado processo inflamatório evidenciado pela grande quantidade de células do sistema imune no tecido muscular cardíaco, esse processo inflamatório apresenta-se de forma difusa pelo tecido muscular cardíaco, além disso observou-se hiperemia intensa.

Em relação ao grupo infectado e tratado com Cumarina (50mg/Kg) é possível observar a migração de uma grande quantidade de células do sistema imune para o tecido e essas células encontram-se por toda área representada na figura 8, tornando aparente a forma difusa desse processo inflamatório. Infelizmente não foi possível apresentar uma imagem representativa desse grupo de melhor qualidade, porém, não influenciou na análise e foi possível observar estruturas citológicas e principalmente o processo inflamatório evidente.

Analisando a microfotografia do grupo infectado e tratado com Cumarina (100 mg/Kg), podemos observar nitidamente intenso processo inflamatório de forma difusa pelo tecido muscular cardíaco com grande quantidade de células do sistema imune em migração da luz do vaso para o tecido. Observa-se também hiperemia intensa e local com grande quantidade de hemácias na luz do vaso observado.

No grupo infectado e tratado com Cumarina (250 mg/Kg), observou-se intenso processo inflamatório no tecido muscular cardíaco. Grande quantidade de células do sistema imune encontra-se difusa pelo tecido evidenciando o processo inflamatório nesse grupo.

Após analisar as micrografias de forma qualitativa do tecido muscular cardíaco dos grupos estudados neste experimento, percebe-se que há intenso processo inflamatório no tecido, comum aos grupos infectado e não tratado e infectado e tratado com Cumarina. A presença de hiperemia também foi observada nos cinco grupos infectados.

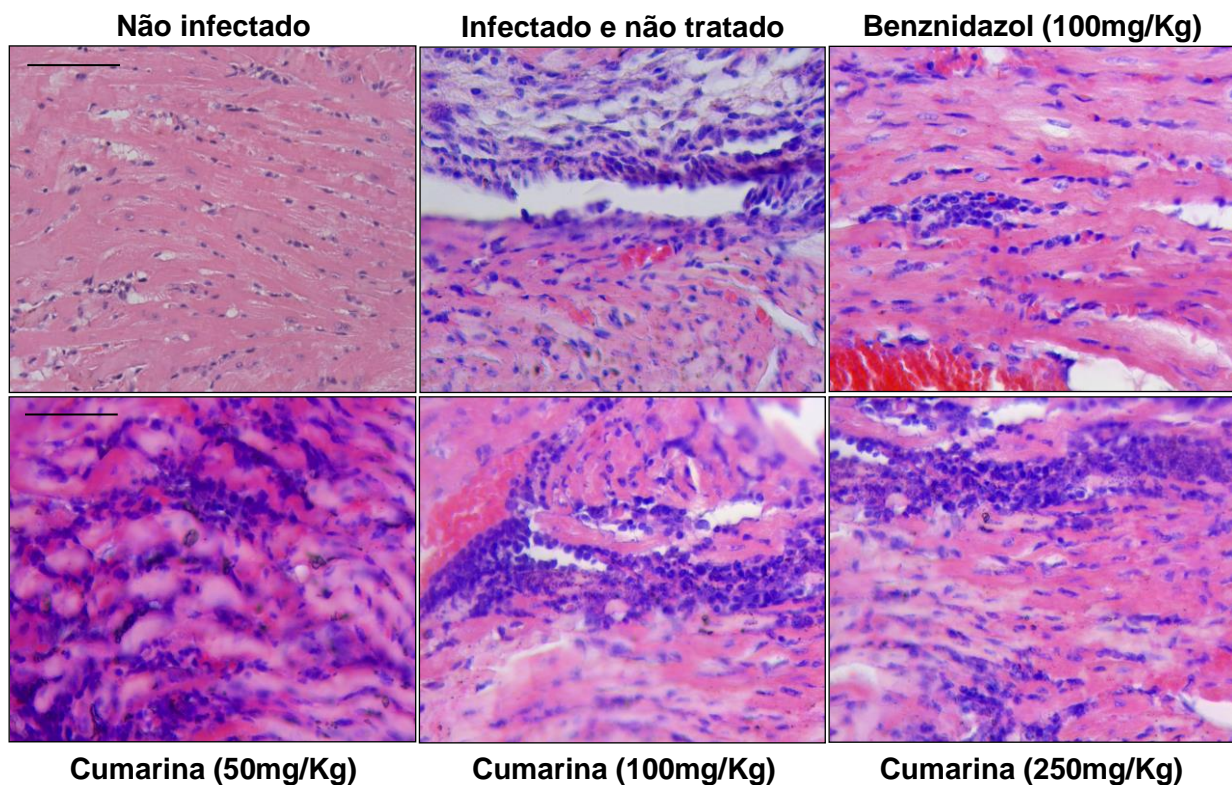


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados na fase aguda. Aspecto histológico muscular cardíaco normal em animais não-infectados. Infiltrado inflamatório moderado no grupo Benznidazol (100mg/Kg)..

5.2.3 Análise dos aspectos histopatológicos de Cólon.

A análise qualitativa de todas as lâminas de cólon dos animais de todos os grupos, foi compilada nos dois gráficos apresentados abaixo (Figura 9 e 10) em que estão representadas as alterações histopatológicas observadas no cólon dos animais estudados. A figura 9 apresenta os tecidos analisados em, presença de inflamação e a figura 10 demonstra a presença de necrose.

Utilizou-se o microscópio Leica DM5000B Zeiss AxioImager.Z2, e observou-se todo o tecido presente nas lâminas a fim de verificar qualquer alteração histopatológica em relação ao grupo não infectado.

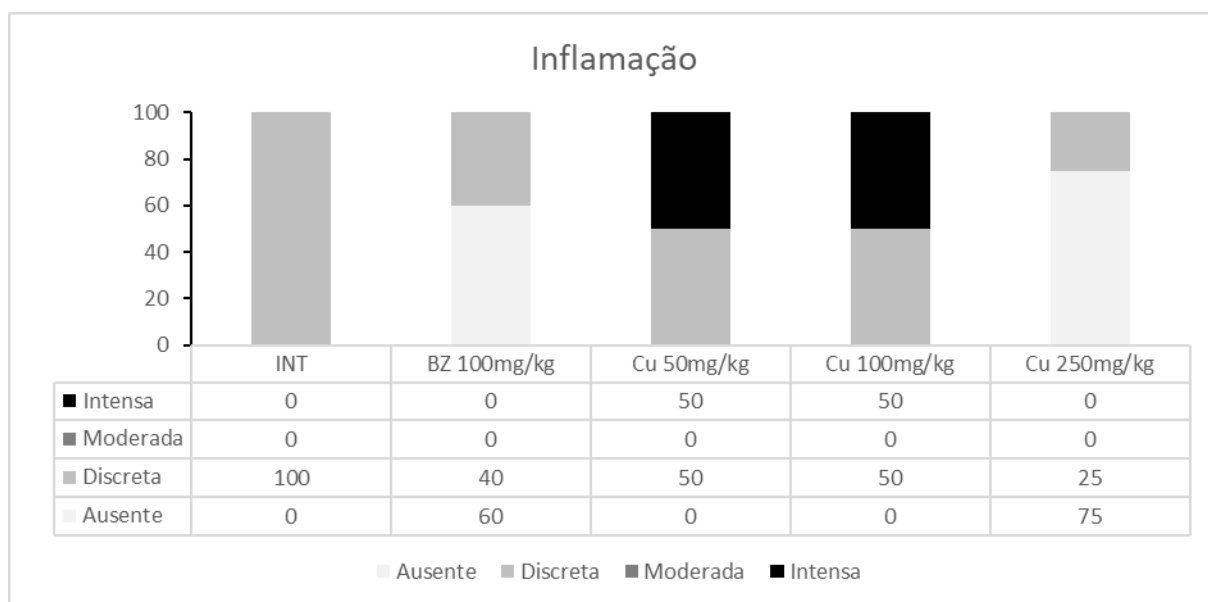


Figura 9: Análise qualitativa da presença de inflamação no cólon dos animais estudados. Grupo Infectado e não Tratado (INT), Infectado e tratado com Benzinidazol 100mg/kg (BZ 100mg/kg), Infectado e tratado com Cumarina 50, 100, 250mg/kg (Cu 50mg/kg, Cu 100mg/kg, Cu 250mg)

Na figura 9 observada acima, fica evidente a presença de inflamação em todos os grupos infectados desse experimento. A prevalência de hiperemia moderada é maior nos grupos INT, BZ 100mg/kg e Cu 100mg/kg. No grupo Cu 50mg/kg a prevalência foi de 100% de hiperemia moderada.

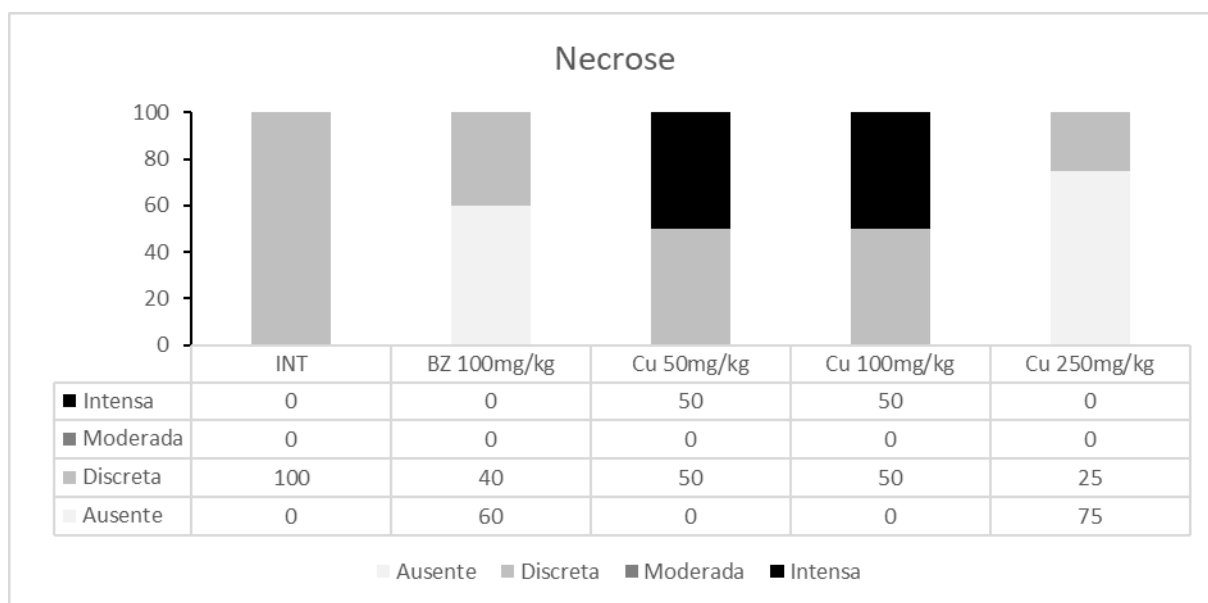


Figura 10: Análise qualitativa da presença de infamação no cólon dos animais estudados. Grupo Infectado e não Tratado (INT), Infectado e tratado com Benzinidazol 100mg/kg (BZ 100mg/kg), Infectado e tratado com Cumarina 50, 100, 250mg/kg (Cu 50mg/kg, Cu 100mg/kg, Cu 250 mg/kg)

Com relação a necrose observou-se no grupo INT que 100% dos animais tiveram necrose discreta. O grupo infectado e tratado com BZ apresentou menor prevalência de necrose e ausência em 60% dos animais do grupo. O grupo infectado e tratado com Cumarina 250 mg/kg apresentou ausência de necrose no cólon de 75% dos animais do grupo. Já os grupos infectados e tratados com Cumarina 50mg/kg e 100mg/kg apresentaram o mesmo perfil e tiveram 50% de prevalência de necrose intensa e discreta.

Os cortes histológicos representados na figura 11, são do cólon dos animais estudados e foram obtidos a partir dos processos descritos na metodologia (4.1.3 e 4.1.4). As análises foram feitas nos animais sobreviventes de cada grupo. Os grupos analisados foram: Não infectado, infectado e não tratado, infectado e tratado com BZ (100 mg/Kg), infectado e tratado com Cumarina (50 mg/kg), infectado e tratado com Cumarina (100 mg/kg) e infectado e tratado com Cumarina (250 mg/kg).

Na figura 11 apresentada abaixo, temos cortes histológicos de cólon dos animais, neles é possível observar alterações histológicas em relação ao grupo não infectado. No grupo não infectado, observa-se um aspecto histológico de cólon normal sem alterações histopatológicas.

Com relação ao grupo infectado e não tratado, observou-se área de necrose e hiperemia discreta na camada muscular lisa do cólon.

No grupo infectado e tratado com BZ, foi observado discreta área de necrose e hiperemia intensa, há uma grande quantidade de emácias na luz do vaso demonstrado na figura 7.

O grupo infectado e tratado com Cumarina (50mg/Kg) apresentou área de necrose discreta na camada muscular do cólon. Analisando a microfotografia do grupo infectado e tratado com Cumarina (100 mg/Kg), podemos observar área de necrose intensa e de forma difusa pela camada muscular do cólon. Observa-se também hiperemia discreta com a presença de algumas hemácias na luz dos vasos. No grupo infectado e tratado com Cumarina (250 mg/Kg), observou-se também necrose de forma difusa na camada muscular do cólon. É visível uma discreta área de necrose na mucosa do tecido.

Após analisar as micrografias de forma qualitativa do cólon dos grupos estudados neste experimento, percebe-se que há áreas de necrose nos grupos não tratado, infectado e tratado com Cumarina (50 mg/kg), infectado e tratado com Cumarina (100 mg/kg) e infectado e tratado com Cumarina (250 mg/kg). No grupo infectado e tratado com Cumarina (100 mg/kg) a necrose foi mais intensa em relação aos demais grupos porém não se pode inferir que foi devida a Cumarina ou a dosagem visto que a Cumarina não apresentou toxicidade em estudos anteriores.

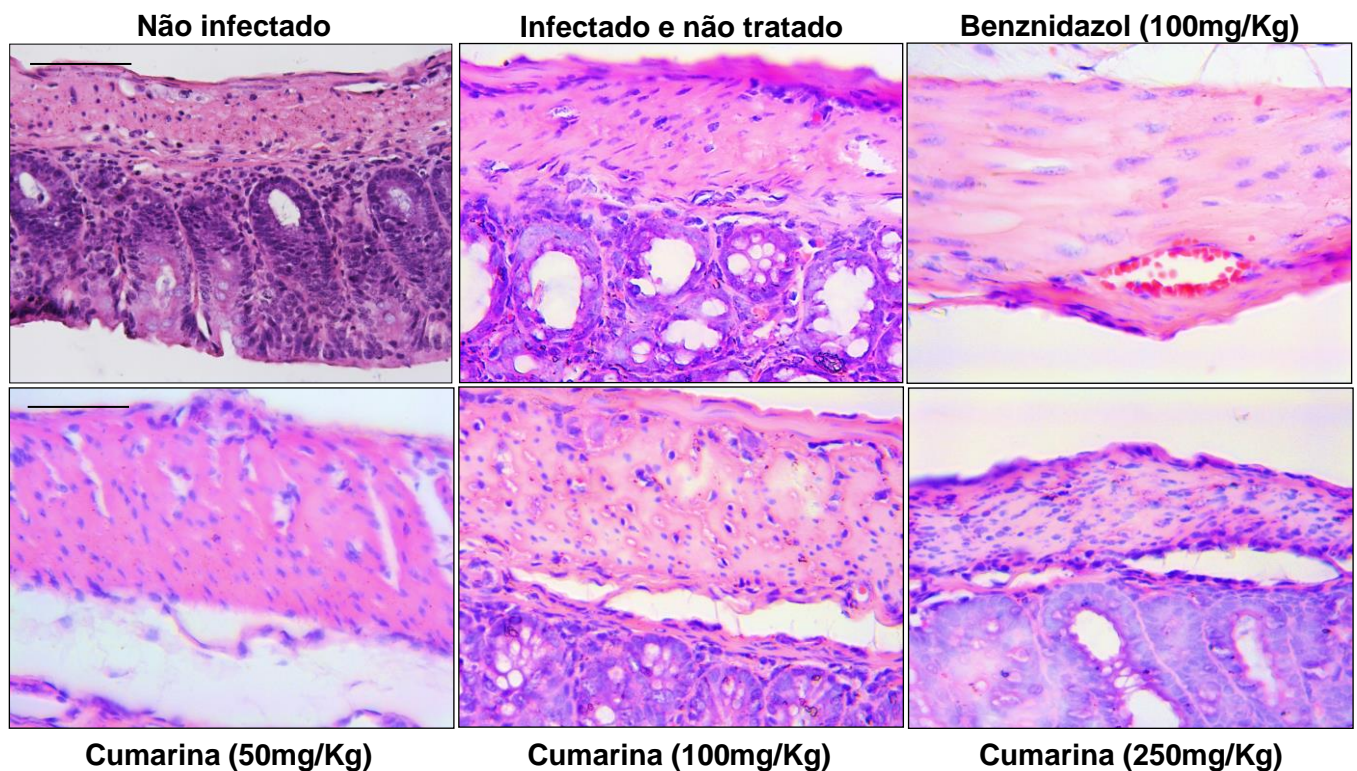


Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos do cólon de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados na fase aguda. Perfil histológico normal em animais não-infectados. Infiltrado inflamatório discreto, presença de hiperemia e necrose nos grupos infectados e tratados com Cumarina (50, 100, 250 mg/kg) e no grupo infectado com Benznidazol (100mg/kg).

6 Conclusão

Embora a Cumarina não tenha mostrado sinais de toxicidade *in vivo* em testes realizados pelo grupo de pesquisa anteriormente, o uso de Cumarina não apresentou uma boa opção para o tratamento da infecção experimental com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Mais estudos são necessários para avaliar se a Cumarina é eficaz contra outras cepas de *T. cruzi* ou em associação com fármacos como o Benznidazol.

7 Perspectivas

Estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, podem ser realizados para compreender melhor os resultados descritos neste trabalho, principalmente em relação aos resultados apresentados no cólon dos animais estudados. Esses estudos poderiam guiar o prosseguimento

do trabalho em busca de se obter uma molécula ou uma formulação com a Cumarina que apresente resultados mais positivos com relação á melhora nas alterações histopatológicas dos tecidos dos animais infectados.

8 Referências

Amaral, G. C., Orati, A. D., Ferreira A. I. C., Nakashima F., De Freitas Favaro, P. C., De Oliveira A. P., 2017. Doença de chagas: breve revisão com ênfase no tratamento. 1(1).

Antunes, A. F., Maduro S. G., Pereira, B.V. M., Barbosa, M.G.V., Guerra, J.A.O., Ferreira, J. M. B. B., 2016. Cardiopatia Crônica após Tratamento de Doença de Chagas Aguda Oral Arq Bras Cardiol. 107(2), 184-186

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. GESEF. 2, 1-48.

AZAMBUJA, Patrícia. GARCIA, Eloi S. **Ciclo Evolutivo. Fiocruz.** 30 jun 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/#:~:text=Durante%20a%20alimentação%20do%20inseto,transformam%20em%20epimastigotas%20e%20esferomastigotas>>. Acesso em: 19 mar 2021.

Boainain, Elias; Rassi, Anis. Terapêutica etiológica da doença de chagas. Arq. Bras. Cardiol. 32/6 395-399.1979.

Boletim epidemiológico Doença de Chagas. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde Número Especial. Abr. 2020

Branco, A. C. S. C., Diniz, M.F.F.M., Almeida R.N., Santos, H. B., De Oliveira, K. M., Ramalho, J.A., Dantas, J.G., 2011. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos *Swiss* do Biotério Professor Thomas George. 15(2), 209-214.

Brener Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 4, 389-396.

Carta de Santa Cruz: o compromisso com Chagas. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Jun 2019. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/carta-de-santa-cruz-o-nosso-compromisso-com-chagas/>> Acesso em: 20 jan 2019.

Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1(2), 160-218.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos Na Experimentação Animal. Editado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em junho de 1991.

Coelho, G.S., Andrade, J.S., Xavier, V.F., Sales Junior, P.A., Rodrigues de Araujo, B.C., Fonseca, K. da S., Caetano, M.S., Murta, S.M.F., Vieira, P.M., Carneiro, C.M., Taylor, J.G., 2018. Design, synthesis, molecular modelling, and in vitro evaluation of tricyclic coumarins against *Trypanosoma cruzi*. Chem. Biol. Drug Des. 93(3),337-350.

Coura, J. R., De Castro S. L. A., 2002. Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97(1), 3-24.

Croft, Simon L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 215-220. 1999.

Evaluation of the efficacy of a new Coumarin molecule in curing Swiss mice infected with *Trypanosoma cruzi* by authors SILVA, L.M.1 ; XAVIER, V.F.1 ; MARQUES, F.S.1 ; DUARTE, T.H.C.1 ; FERRAZ, A.T.1 ; DAS MERCÊS, A.C.1 ; CARVALHO, T.V.1 ; TAYLOR, J.G.1 ; CARNEIRO, C.M.1 ; VIEIRA, P.M.A.1 1 UFOP, OURO PRETO - MG - BRASIL was presented during the XXXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease in Caxambu, Minas Gerais, Brazil, from November 05th to 07th, 2018.

DIAS, JCP., and COURA, JR., org. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. ISBN 85-85676-31-0. Available from SciELO Books.

Médicos sem Fronteiras. Doença de Chagas. O que fazemos, Atividades Médicas, Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas> Acesso em: 21/01/2021.

FERREIRA, Israel de Lucena Martins; SILVA, Tiago Pessoa Tabosa e. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Rev. SOUZA, Simone Machado. Atividade Antibacteriana De Cumarinas Naturais e Derivados.** Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Ciências Biológicas Departamento De Microbiologia E Parasitologia Programa De Pós-Graduacao Em Biotecnologia. Florianópolis 2005.

Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 39, n. 5, p. 507-509, out. 2006 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000500018&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 26 nov. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000500018>.

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses. Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização. Volume 50 - Nº 4 – 2018 Edição online - ISSN 2448-3877. Página 331.

AZAMBUJA Patrícia. GARCIA Eloi S. **CICLO EVOLUTIVO**. Portal da doença de Chagas. 30/06/2017.

Gayosso L. J., Torres-Valencia, M., Rojo-Domínguezl, A., Nájera-Peña, H., Aguirre-López, B., Salas-Pacheco, J., Téllez-Valencia, A., Bioorganic Med. Chem. Lett. 2009, 19, 5936-5939.

CANÇADO, Joaquim Romeu. *Terapêutica Específica*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. ISBN 85-85676-31-0. Available from SciELO Books.

Malafaia, G., De Lima Rodrigues A. S., 2010. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*43(5), 483-485.

MARTIN, Erlon Ferreira. **Síntese de 4-aril-4h-cromenos e aril-piranocumarinas e avaliação da citotoxicidade e Atividade antiprotozoária.** o Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2018.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol* [Internet]. 2020 abr 27/11/2020; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr., A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S.J., Yusuf, S., 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373 (14), 1295–1306.

OECD.Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 1-14.

Rassi, Anis & Ferreira, Humberto O. Tentativas de tratamento específico da fase aguda da doença de chagas com nitrofuranos em esquemas de duração prolongada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol. V — N° 5. Set.-Outubro, 1971.

Moacir G. Pizzolatti. Beatriz G. MendesAnildo Cunha Jr. Cristian Soldi. Adolfo H. KogaIriane EgerEdmundo C. Grisard Mário Steindel. **Atividade tripanocida de cumarinas e estiril-2-pironas de Polygala sabulosa A.W. Bennett (Polygalaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia. Aceito em 19 março de 2008.

Vinay Kumar, MBBS, MD, FRCPath. Abul K. Abbas, MBBS. Jon C. Aster, MD, PhD. **Robbins Patologia Básica 9ª Edição.** Elsevier Editora Ltda. 2013.

XAVIER, Viviane Flores. Síntese E Avaliação Biológica Da Ação Dos Derivados De Xilitan Sobre o Trypanosoma cruzi. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Ouro Preto. Março de 2017.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) Available in: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))> Access in: 23/02/2019.

WHO. World Health Organization. WHO calls for comprehensive, equitable access to healthcare for every Chagas disease patient. Available in: <https://www.who.int/news/item/14-04-2021-who-calls-for-comprehensive-equitable-access-to-healthcare-for-every-chagas-disease-patient> Access in:26/07/2021.

Urbina, J. A. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.*, 115 (1–2): 55– 68.