



**Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP**

**Escola de Farmácia - EFAR**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CiPharma**

**Laboratório de Doença de Chagas – LADOC**



**Eficácia do tratamento com licnofolida livre e em nanocápsulas em camundongos experimentalmente infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* de perfis distintos de resistência aos fármacos usuais.**

Mestrando: Carlos Geraldo Campos de Mello

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Renata Tupinambá Branquinho

Ouro Preto - MG, Outubro de 2015.

Carlos Geraldo Campos de Mello

Eficácia do tratamento com licnofolida livre e em nanocápsulas em camundongos experimentalmente infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* de perfis distintos de resistência aos fármacos usuais.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Diagnóstico, Vacinas e Terapêutica.

Orientadora: Profa Dra. Marta de Lana

Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Renata Tupinambá Branquinho

Ouro Preto - MG, Outubro de 2015.

MS27e Mello, Carlos Geraldo Campos de.  
Eficácia do tratamento com licnofolida livre e em nanocápsulas em camundongos experimentalmente infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* de perfis distintos de resistência aos fármacos usuais [manuscrito] / Carlos Geraldo Campos de Mello. - 2015.  
94f. : il. : color; graf; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Lana.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Diagnóstico, Vacinas e Terapêutica.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Fármacos. I. Lana, Marta de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937:615

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
ESCOLA DE FARMÁCIA



#### LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 103ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Carlos Geraldo Campos de Mello**, com a defesa da dissertação intitulada: “Eficácia do tratamento com licnofolida livre e em nanocápsulas em camundongos experimentalmente infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* de perfis distintos de resistência aos fármacos usuais”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 19 de outubro de 2015.

Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva  
(UFOP)

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite  
(UFMG)

Aos meus pais, Neuza e Carlos, pelo apoio incondicional. A Patrícia e Marianne pelo companheirismo. A Ana Lia pelo amor e companhia. A todos do LADOC pelo aprendizado.

A Deus, por guiar meus passos e pela proteção.

À minha família por ser meu alicerce e meu porto seguro. Aos meus pais, Carlos e Neuza, por me apoiar em tudo na minha vida e por darem meios para que eu pudesse conseguir o que quero. As minhas irmãs, Patrícia e Marianne por serem minhas companheiras.

A Ana Lia por todo amor, companheirismo, compreensão, ajuda, enfim por tudo, simplesmente essencial em minha vida.

A todos meus amigos de Vitória e Ouro Preto por tornarem minha jornada inesquecível.

A República UPA, moradores, ex-alunos e Terezinhas, por me proporcionarem um lar nesta cidade. A Chapa pela tranquilidade e amizade.

A todos os colegas do Laboratório doença de Chagas, alunos de iniciação, mestrados e doutorandos pela ajuda e pelo conhecimento compartilhado. Ao Auffy, Jaqueline, Maykon e Renata pela ajuda e pelos conhecimentos partilhados, imprescindíveis para minha formação.

A todos os colegas do laboratório de Imunopatologia, em especial professores Alexandre, Paula e ao mestre Levi.

À professora Marta pela orientação e suporte para que eu pudesse executar este trabalho com qualidade.

À UFOP, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A doença de Chagas (DCh) permanece negligenciada. O único fármaco disponível no Brasil para seu tratamento é o benznidazol (BZ), que provoca efeitos colaterais graves e baixa eficácia terapêutica na fase crônica (FC) da infecção. Já foi demonstrado que a licnofolida (LIC), isolada de *Lychnophora trichocarpa* apresenta atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* e eficácia terapêutica nas fases aguda (FA) e FC da infecção *in vivo*. Sendo a LIC uma substância lipofílica com ação citotóxica, uma formulação farmacêutica para carregá-la, como nanocápsulas poliméricas (NC) é viável por permitir liberação controlada de substâncias, seletividade tecidual e redução da toxicidade. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram **(I)** determinar a eficácia terapêutica da LIC livre e de formulações de NC contendo LIC na FA e FC da infecção em modelo murino infectado com cepas de *T. cruzi* de distintos perfis de resistência ao BZ e **(II)** avaliar o real benefício das NC na evolução da infecção e eliminação tecidual do *T. cruzi*. Para tal, camundongos Swiss foram infectados com as cepas Y (parcialmente resistente ao BZ) e VL-10 (resistente ao BZ) tratados por 20 dias por via oral durante as FA e FC. Tratamentos: (I) Cepa Y – FA/FC: LIC-livre 5,0 mg/kg/dia, BZ 100,0 mg/kg/dia e controles; (II) Cepa VL-10 – FA/FC: LIC-livre 12,0 mg/kg/dia, BZ 100,0 mg/kg/dia, NC-PLAPEG-LIC (8,0 e 12,0 mg/kg/dia – FA) e controles. A avaliação da eficácia terapêutica foi realizada por exame de sangue a fresco (ESF-FA), hemocultura (HC), PCR e ELISA. **(i) FA – Cepa Y:** Não foi observada cura em nenhum animal tratado com LIC-livre e controles, mas 62,5% dos tratados com BZ foram curados. As taxas de sobrevivência foram de 75,0%, 100,0% e 0% dos animais tratados com LIC-livre, BZ e controles, respectivamente, cujo tempo médio de sobrevivência foi de somente 19 dias. **FC – Cepa Y:** Ao avaliar os resultados dos exames parasitológicos e ELISA não foi observada cura em nenhum animal dos grupos tratados com LIC-livre, BZ e controles. As taxas de sobrevivência foram semelhantes em todos os grupos: 70,0% nos tratados com LIC-livre e controles e 80,0% nos tratados com BZ. **(ii) FA – Cepa VL-10:** Houve cura em 75,0% e 37,5% dos animais tratados com NC-PLAPEG-LIC 12mg e NC-PLAPEG-LIC 8mg, enquanto nenhum animal tratado com LIC-livre, BZ e dos grupos controles foi curado. **FC – Cepa VL-10:** Não foi revelada cura em nenhum animal tratado com LIC-livre. A sobrevivência dos animais tratados com LIC-livre, BZ e controles foi de: 70,0%, 80,0% e 60,0% respectivamente. LIC-livre foi capaz de reduzir a parasitemia em animais infectados com as cepas Y e VL-10, mas não curou a infecção. NC-LIC promoveu cura de 75% dos animais infectados com a cepa VL-10 tratados na FA, e apresentou efeito dose x resposta. Os resultados da qPCR foram concordantes em sua maioria (97%) com os resultados obtidos com o controle de cura clássico (negatividade da HC, PCR convencional em sangue e ELISA). Esta técnica demonstrou eficiência > 97,0%, redução do parasitismo tecidual nos animais tratados com LIC-livre e NC-PCL-LIC, e ausência do *T. cruzi* no tecido cardíaco em 100% dos animais tratados com NC-PLAPEG-LIC, independentemente da cepa e fase da infecção em que o tratamento foi administrado.

Chagas disease (DCH) remains neglected. The only drug available for its treatment in Brazil is the benznidazole (BZ), which causes severe side effects and low therapeutic efficacy in the chronic phase (CP) infection. It was already demonstrated that lychnopholid (LYC), isolated from *Lychnophora trichocarpa* has anti-*T. cruzi* activity *in vitro* and efficacy in the acute phase (AP) and CP *in vivo*. As LYC is a lipophilic substance with cytotoxic activity, polymeric nanocapsules (NC) are available to load LYC, because NC is effective for allow controlled release of substances, tissue selectivity and reduce toxicity. Thus, the objectives of this study were (i) determine the therapeutic efficacy of free-LYC and LYC-NC during the AP and CP infections in mice infected with *T. cruzi* strains of different resistance profiles to BZ (II) evaluate the real benefit of the NC in the evolution of infection and tissue elimination of *T. cruzi*. For this, Swiss mice were infected with the Y strain (partially resistant to BZ) and VL-10 strain (resistant to BZ) orally treated for 20 days during the AP and CP. Treatments: (i) Y strain - AP/CP: free-LYC 5.0 mg/kg/day, BZ 100.0 mg/kg/day and controls; (II) VL-10 strain- AP/CP: free-LYC 12.0 mg/kg/day, BZ 100.0 mg/kg/day, LYC-PLAPEG-NC (8.0 and 12.0 mg/kg/day - AP) and controls. The evaluation of therapeutic efficacy was performed by fresh blood exam (FBE - AP), hemoculture (HC), PCR and ELISA. **(i) AP - Y strain:** No cure was observed in animals treated with free-LYC and controls, but 62.5% of those treated with BZ were healed. The survival rates were 75.0%, 100.0% and 0% of the animals treated with free-LYC, BZ and controls, respectively, and the survival time was of only 19 days. **CP - Y strain:** When the results of parasitological tests and ELISA were evaluated no cure were observed in groups of animals treated with free-LYC, BZ and controls. Survival rates were similar in all groups: 70.0% in treated with free-LYC and controls and 80.0% in the treated with BZ. **(ii) AP - VL-10 strain:** Cure was observed in 75.0% and 37.5% of the animals treated with LYC-PLAPEG-NC 12mg and LYC-PLAPEG-NC 8mg, while no cure was observed in animals treated with free-LYC, BZ and control groups. **CP - VL-10 strain:** No cure was observed in animals treated with free-LYC. The survival of animals treated with free-LYC, BZ and controls were: 70.0%, 80.0% and 60.0%, respectively. Free-LYC was able to reduce the parasitemia in infected animals with the Y and VL-10 strains, but it didn't cure the infection. LYC-NC promoted cure in 75.0% of the animals infected with the VL-10 strain treated in the AP and presented effect dose response. The qPCR results were consistent in their majority (97%) with the results obtained with classical cure control (HC negativity, conventional PCR in blood and ELISA). This technique showed efficiency > 97.0%, showed reduction of tissue parasitism in animals treated with free-LYC-free and LYC-PCL-NC, and absence of *T. cruzi* in the cardiac tissue in 100.0% of animals treated.

Key words: Lychnopholide, Chagas disease, nanocapsules, therapeutic efficacy.



$\Delta R_n$	Magnitude do sinal de fluorescência normalizada
$\mu\text{g/mL}$	Microlitros por mililitro
ALD	Anemometria do Laser Doppler
AP	"Acute phase"
ASC	Área sobre a curva
BENEFIT	"Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy"
BZ	Benznidazol
CCA-UFOP	Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CF-AATV	Pesquisa de anticorpos anti tripomastigota vivo pela citometria de fluxo
CHAGAZOL	"Clinical Trial For The Treatment Of Chronic Chagas Disease With Posaconazole And Benznidazole"
CiPharma	Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	"Cronic phase"
d.p.t.	Dias pós tratamento
DAD	Detector de arranjo diodos
dATP	Desoxinucleotídeo de Adenosina-5'-trifosfato
DCh	Doença de Chagas
dCTP	Desoxinucleotídeo de Citocina-5'-trifosfato
dGTP	Desoxinucleotídeo de Guanina-5'-trifosfato
DMA	Dimetilacetamida
DMA:PEG	Dimetilacetamida com polietilenoglicol
DMSO	Dimetilsilfóxido

DNA	Ácido desorribonucléioco
DNDi	Ácido desorribonucléioco
DPMP	Dia do pico máximo de parasitemia
dTTP	Desoxinucleotídeo de Timina-5'-trifosfato
DTU	"Discrept typing unit"
E1224	Pró-fármaco do ravuconazol
ECF	Espectroscopia de correlação de fótons
EDTA	Ácido etilenodietilnitritoteracético
EFAR	Escola de Farmácia
ELISA	"Enzime-linked immunosorbent assay"
ESF	Exame de sangue a fresco
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase aguda
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBE	"Fresh blood exame"
FC	Fase crônica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FX	Fexnidazol
H2O2	Peróxido de hidrogênio
H2SO4	Ácido sulfúrico
HAI	Hemaaglutinação indireta
HC	Hemocultura
HCl	Ácido Clorídrico
I.P	Índice de polidispersão

I.V.	Intra-venoso
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
INPI	Instituto nacional da propriedade industrial
INT	Controle infectado não tratado
IP	Intraperitoneal
ITR	Itraconazol
KCl	Cloreto de potássio
LADOC	Laboratório de doença de Chagas
LAFEPE	Laboratorio Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIC	Licnofolida
LIT	"Liver infusion tryptose"
LMC <sup>o</sup>	Lise mediada pelo complemento
LS	Lactona sesquiterpênica
LYC	"Lychnopholide"
MG	Minas Gerais
mg/kg	Miligramas por quilogramas
mg/kg/dia	Miligramas por kilogramas por dia
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MS	Ministerio da Saúde
NC	Nanocápsulas
NC-Br	Nanocápsulas brancas
NC-PCL-LIC	Nanocápsulas de Poli-ε-prolactona contendo licnofolida
NC-PLAPEG-LIC	Nanocápsulas de ácido poli-lático associado ao polietilenoglicol contendo liconofolida

NFX	Nifurtimox
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NUPEB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	Orto-fenileno-diamino
PAR	Parasitemia
PBS	Solução salina tamponada
PCL	Poli- $\epsilon$ -prolactona
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Acido poli-lático
PLAPEG	Ácido poli-lático associado ao polietilenoglicol
PM	Peso Molecular
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Período patente
PPP	Período pré-patente
PZ	Posaconazol
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
Rn	Reporter normalizado
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SNEDDS	Sistemas de distribuição auto-emulsionantes

<i>T. cruzi</i>	Soro fetal bovino
TGI	Trato gastrointestinal
TNF- $\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral murino-específico
Tris-HCl	Cloridrato de hidroximetilaminometano
TS	Tripomastigotas sanguíneos
TTm	Tratamento
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
USA	"United States of América"
V.O.	Via oral
WHO	"World Health Organization"

<b>FIGURA 1:</b> Estruturas químicas do Benznidazol (BZ) e do nifurtimox (NFX).....	22
<b>Figura 2:</b> Estrutura química da licnofolida.....	27
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: A) fármaco dissolvido ao núcleo oleoso; B) fármaco adsorvido à parede polimérica; C) nanocápsulas com polímero convencional; D) nanocápsulas com polímero furtivo.....	32
<b>Figura 4:</b> Linha do tempo contendo os pontos de maior destaque durante o desenvolvimento do projeto de Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo murino. 2009 - Atual.....	35
<b>Figura 5:</b> Delineamento experimental da avaliação da eficácia terapêutica de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos infectados com as cepas Y e VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados durante a fase aguda da infecção. ....	42
<b>Figura 6:</b> Delineamento experimental da avaliação da eficácia terapêutica de licnofolida livre administrada por via oral em camundongos infectados com as cepas Y e VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados durante a fase crônica da infecção. ....	43
<b>Figura 7:</b> Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos das cepas Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção. ....	51
<b>Figura 8:</b> Gráfico de sobrevivência de camundongos Swiss experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos de cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.....	54
<b>Figura 9:</b> Curvas de parasitemia média observadas em camundongos Swiss experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção com diferentes formulações contendo licnofolida. ....	56
<b>Figura 10:</b> Gel eletrônico apresentando os produtos amplificados de amostras de DNA extraídas do sangue de camundongos infectados com a cepa VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por 20 dias consecutivos por via oral durante a fase aguda da infecção.....	58

- Figura 11:** Eletrofenograma demonstrativo das primeiras cinco amostras existentes no gel eletrônico de animais experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção, demarcando em vermelho no último quadro o pico de 330 pb, característico do KDNA do *Trypanosoma cruzi*. ..... 59
- Figura 12:** Leitura da densidade ótica (absorbância) e gráficos de dispersão relativa à sorologia convencional (ELISA) em amostras de soro dos animais infectados com a cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção. .... 60
- Figura 13:** Curvas representativas de qPCR: A) Gráfico de amplificação ( $\Delta R_n \times$  ciclo) do *Trypanosoma cruzi* demonstrando a amplificação de DNA nas seis diluições seriadas utilizadas ( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^0$ ) em escala logarítmica para ajustes do *Threshold* (linha azul). Cada conjunto de linhas coloridas refere-se a um ponto da curva. B) Curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação. .... 64

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros físico-químicos de formulações de nanocápsulas de polímero PLAPEG contendo licnofolida na concentração de 2,0 mg/mL produzidas para estudos <i>in vivo</i> .....	50
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros biológicos avaliados por exame de sangue a fresco durante o tratamento e 30 dias após em camundongos experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral durante a fase aguda da infecção durante 20 dias consecutivos. ....	52
<b>Tabela 3:</b> Sobrevida e eficácia terapêutica de camundongos experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral durante 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.....	53
<b>Tabela 4:</b> Sobrevida e eficácia terapêutica de camundongos experimentalmente infectados com 500 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral durante a fase crônica da infecção. ....	55
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros biológicos avaliados por exame de sangue a fresco durante o tratamento e até 30 dias após o tratamento de camundongos experimentalmente infectados com $10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados durante a fase aguda da infecção por via oral com diferentes formulações contendo licnofolida. ....	57
<b>Tabela 6:</b> Resultado da avaliação pós-tratamento dos camundongos experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por 20 dias consecutivos por via oral durante a fase aguda da infecção.....	61
<b>Tabela 7:</b> Resultado do critério de cura aplicada aos camundongos experimentalmente infectados com 500 tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados por 20 dias por via oral durante a fase crônica da infecção, utilizando como parâmetros: hemocultura, PCR e ELISA. ....	62
<b>Tabela 8:</b> Resultados da avaliação pós-tratamento segundo o critério de cura aplicado aos camundongos experimentalmente infectados com $1,0 \times 10^4$ tripomastigotas sanguíneas das cepas de Ye VL-10 de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda e crônica da infecção e avaliados por: hemocultura (HC), PCR (polimerase chain reaction) e ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	63
<b>Tabela 9:</b> Dados laboratoriais de animais infectados de animais infectados pela cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica.....	66
<b>Tabela 10:</b> Dados laboratoriais de animais infectados de animais infectados pela cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase aguda. ....	67
<b>Tabela 11:</b> Dados laboratoriais de animais infectados pela cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica. ....	69



<b>1. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
1.1. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	19
1.2. QUIMIOTERAPIA ANTI - <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	21
1.2.1. <i>Lactonas Sesquiterpênicas no tratamento de doenças parasitárias e anti- T. cruzi</i> .....	25
1.2.2. <i>Nanocarreadores de fármacos: ênfase à doença de Chagas e nanocápsulas</i> .....	29
1.2.3. <i>Nanocápsulas poliméricas contendo Licnofolida – Contextualização do projeto</i> .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL. ....</b>	<b>38</b>
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. LICNOFOLIDA E FORMULAÇÕES .....	39
4.1.1. <i>Isolamento da licnofolida, preparação de nanocápsulas e caracterização físico-química das nanocápsulas</i> .....	39
4.1.2. <i>Preparo da suspensão de benzonidazol para administração por via oral</i> .....	40
4.2. ESTUDO DE EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DA LIC.....	40
4.2.1. <i>Cepas de Trypanosoma cruzi utilizadas</i> .....	40
4.2.2. <i>Modelo Animal utilizado</i> .....	41
4.2.3. <i>Avaliação de parâmetros biológicos na infecção murina</i> .....	44
4.2.4. <i>Análise estatística</i> .....	44
4.2.5. <i>Controle de cura</i> .....	44
4.2.6. <i>Critério de cura</i> .....	47
4.2.7. <i>Avaliação do parasitismo tecidual (coração)</i> .....	47
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1. FORMULAÇÃO DE NC-PLAPEG.....	50
5.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DOS TRATAMENTOS COM LICNOFOLIDA LIVRE OU ENCAPSULADA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS .....	50
5.2.1. <i>Curva de parasitemia, parâmetros biológicos da curva de parasitemia, eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados pela cepa Y e tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase aguda.</i> .....	50
5.2.2. <i>Eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados pela cepa Y tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase crônica</i> .....	54
5.2.3. <i>Curva de parasitemia, parâmetros biológicos da curva de parasitemia, eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados com a cepa VL-10 e tratados com licnofolida livre e formulações de nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida por via oral durante a fase aguda.</i> 55	

5.2.4.	<i>Eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados pela cepa VL-10 tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase crônica.....</i>	<i>61</i>
5.2.5.	<i>Avaliação geral da eficácia terapêutica.....</i>	<i>63</i>
5.2.6.	<i>Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR.....</i>	<i>64</i>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1. Revisão da Literatura

### 1.1. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana constitui uma antropozoonose frequente nas Américas que resulta da infecção de várias espécies de mamíferos pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). A infecção em humanos recebe o nome de doença de Chagas (DCh) em homenagem ao seu descobridor, o médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, que descreveu todo ciclo biológico tanto no hospedeiro vertebrado quanto invertebrado. A infecção humana pelo *T. cruzi* apresenta uma ampla distribuição pelo continente americano, sendo conhecida a existência de vetores da doença do Sul dos Estados Unidos até a Argentina (Miles, 2004). A doença de Chagas (DCh) continua presente na região das Américas, porém segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) houve uma redução no número de indivíduos infectados de aproximadamente de 20 milhões em 1981 para cerca de 6 – 7 milhões atualmente (WHO, 2015). Com a intensa migração da população de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, a DCh se encontra em expansão para países da Europa, EUA, Japão, Canadá, Austrália e alguns países asiáticos, onde hoje residem cerca de 300.000 – 400.000 indivíduos infectados (Coura, 2013, Urbina e Tarleton, 2015). Na Espanha, entre 30.000 - 100.000 imigrantes estão infectados com o *T. cruzi* (Pérez de Ayala, 2009). Ainda se estima que mais de 10.000 mortes anuais sejam causadas pela DCh em todo o mundo (WHO, 2010; Hoetz, 2015).

Os principais mecanismos de transmissão da DCh, ocorrem pelo contágio com excretas de triatomíneos infectados, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita (Brenner & Gazzinelli, 1997; Coura, 2009, Coura & Dias, 2009) e, mais recentemente, descrita transmissão por alimentos contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito e por acidente laboratorial (Dias, 2006; Rassi *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010) têm sido descritas. A transmissão vetorial da DCh pela espécie *Triatoma infestans* foi oficialmente interrompida no Brasil no ano de 2006, porém esta espécie está ainda presente em algumas localidades do Rio Grande do Sul e Bahia (Argolo *et al.*, 2008) e outras espécies de triatomíneos até então consideradas secundárias (*Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus* e *Panstrongylus lignarius*) apresentam potencial para ocupar o mesmo nicho ecológico deixado por esta espécie, que eventualmente podem adquirir a capacidade de transmitir a infecção a humanos no peridomicílio e domicílio (Petherick, 2010). No Brasil, 80% da área considerada endêmica anteriormente está sob vigilância epidemiológica, com taxas de infestação domiciliar por triatomíneos inferior a 5% (Moncayo e Silveira, 2009). Os riscos de transmissão têm progressivamente diminuído, principalmente após a introdução de medidas nacionais baseadas no controle vetorial e transfusional. Estas ações bem-sucedidas

empregadas no Brasil foram adaptadas às condições locais e estendidas para outros países do Cone Sul (WHO, 2010).

Carlos Chagas classificou o curso da doença em duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda dura cerca de dois a quatro meses e é caracterizada pela demonstração do parasito pelo exame a fresco e pela detecção de níveis elevados de anticorpos IgM. Essa fase é, na maioria dos casos, assintomática, podendo apresentar sinais de porta de entrada característicos da fase aguda tais como: o sinal de Romaña que consiste em um edema elástico com conjuntivite, geralmente bpalpebral e unilateral (Romaña, 1935) e o chagoma de inoculação, que se desenvolve no local de penetração do parasito (Mazza e Freire, 1940). Diversas manifestações clínicas inespecíficas são observadas na anamnese, tais como: febre, edema, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiência cardíaca dentre outros sinais inespecíficos. A miocardite e encefalite explicam a mortalidade nesta fase da infecção que ocorre em baixo percentual (cerca de 2%) em crianças de até 4 anos de idade ou em imunossuprimidos (Prata, *et al.*, 2001).

Após a fase aguda, o indivíduo evolui naturalmente para a fase crônica, caracterizada pela dificuldade de detecção do parasito no sangue periférico, desaparecimento progressivo de IgM e sintomas clínicos, e elevação dos anticorpos específicos da classe IgG.

Na fase crônica observa-se parasitemia subpatente, sendo difícil detectar o *T. cruzi* através de métodos parasitológicos diretos. A maioria dos indivíduos nesta fase permanece na forma indeterminada da doença, caracterizada por positividade nos exames sorológicos convencionais, exames parasitológicos positivos ou não, ausência de quadro sintomatológico próprio da doença, ou seja, eletrocardiograma convencional, exame radiológico de tórax, esôfago e cólon normais (I Reunião anual de pesquisa aplicada em doença de Chagas, 1984). Entretanto, mesmo após um longo período assintomático, cerca de 30% dos indivíduos podem desenvolver a forma cardíaca, 10% a forma digestiva, 8% a forma cardio-digestiva ou mista (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010). Atualmente, a existência da forma nervosa da doença foi extinta pelo fato de não haver um quadro anatomopatológico que a sustente.

O diagnóstico da DCh é baseado nos pilares: epidemiológico, clínico e laboratorial. A origem do paciente, presença de sinais de porta de entrada, alterações cardíacas e digestivas, associados a métodos sorológicos positivos para a infecção pelo *T. cruzi*, permitem a confirmação do diagnóstico (MS, 2005). O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* pode ser realizado por métodos parasitológicos (exame a fresco, ‘buffy-coat’, microhematócrito, método de Strout, hemocultura, xenodiagnóstico) ou sorológicos (enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), Hemaglutinação indireta (HAI) e Imunofluorescência indireta (IFI), dependendo da fase da infecção. Em casos de fortes indícios de infecção aguda e

com resultados negativos nos testes parasitológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada como teste complementar associado a realização de testes sorológicos (MS, 2005).

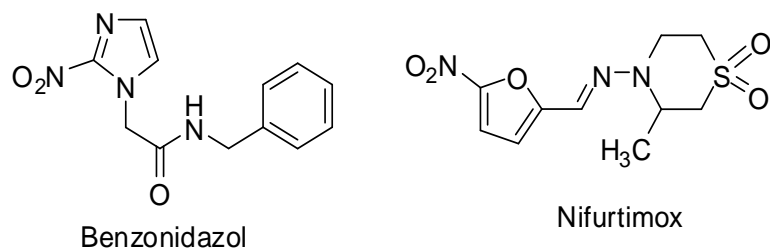
Apesar dos primeiros ensaios clínicos com os dois únicos compostos usados para o tratamento desta doença, o nifurtimox (NFX) e o benznidazol (BZ), terem iniciado na década de 60, muitos fatores levaram ao descrédito no tratamento por parte dos clínicos, tais como a dificuldade de avaliar a cura parasitológica, o critério de cura clássico da doença baseado em dois pilares, negatização dos métodos parasitológicos e da sorologia convencional (Cançado, 2002, WHO, 2002), a dificuldade de evidenciar melhora clínica em indivíduos tratados e ainda a falsa noção de que os fenômenos de autoimunidade presentes na doença poderiam permanecer no paciente mesmo na ausência do parasito pós-tratamento. Por estas razões, até meados da década de 90, o tratamento etiológico era indicado principalmente aos casos agudos e infecção recente (National Health Foudantion of Brazil, 1996). Entretanto, com as crescentes evidências obtidas após o surgimento de métodos mais sensíveis tais como a imunohistoquímica e a PCR (reação da polimerase em cadeia) de que a existência do parasito representa um fator importante na origem da lesão, e conseqüentemente na evolução da doença (Higuchi *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Tarleton, 2003; Nitz *et al.*, 2004), e ainda, que o tratamento pode atuar beneficemente no seu prognóstico, mesmo nos casos não curados (Andrade *et al.*, 1991; Viotti *et al.*, 1994; Segura *et al.*, 1994; Fragata-filho *et al.*, 1995; Suasnábar *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2005; Viotti *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2006; Lana *et al.*, 2009; Machado-de-Assis *et al.*, 2012), grupos de especialistas em quimioterapia da DCh passaram a recomendá-lo a todo paciente soropositivo (exceto para aqueles que apresentam formas clínicas avançadas), em ambas as fases de infecção, com o objetivo de erradicá-la, evitar o agravamento das lesões e interromper ou diminuir a transmissão do parasito (MS, 2005).

## 1.2. Quimioterapia anti - *Trypanosoma cruzi*

Desde a descoberta da DCh uma grande variedade de compostos tem sido investigada para o tratamento etiológico, sempre na busca de obter um agente quimioterápico seguro e eficaz (Bahia *et al.*, 2014). Ao longo da história podem ser observados alguns períodos de grande importância no avanço da busca pela quimioterapia ideal. Até a década de 1930, muitas drogas tripanocidas foram utilizadas em pesquisas clínicas, porém sem apresentar sucesso terapêutico (Chagas & Chagas, 1935). Ao considerar estes resultados, Carlos Chagas afirmou na publicação do “1º Manual de Doenças Infecciosas e Tropicais” (Chagas & Chagas, 1935) que não havia tratamento específico para a DCh. Mesmo assim, entre este período e o ano de 1962, diversos agentes quimioterápicos e extratos de plantas foram avaliados, destacando-se os

derivados de sais de ouro, bismuto, cobre e estanho, iodeto de sódio, violeta de genciana, ácido para-amino-salicílico, anti-histamínicos, sulfonamidas, cortisona, a anfotericina B e vários antibióticos nitrofuranos (Coura & Silva 1961; Brener, 1968; Cançado, 1968). Estas substâncias apresentaram efeito supressivo da infecção experimental pelo *T. cruzi*, porém não foi constatada cura (Brener, 1962).

A década de 1960 iniciou-se com uma grande descoberta: a ação curativa de compostos nitrofuranos em animais experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi* (Packchianian, 1957; Brener, 1961) e a utilização destes no tratamento dos primeiros casos de infecção humana. Apesar dos resultados promissores observados em animais, o tratamento dos casos humanos apresentou baixa taxa de cura e revelou alguns efeitos tóxicos destes compostos (Coura & Silva, 1961; Cançado *et al.*, 1964). Este marco no tratamento etiológico da DCh ocorreu, principalmente, com a introdução de dois compostos: o Nifurtimox® e o Benznidazol®. Nifurtimox® (NFX) é um derivado nitrofurano produzido pela empresa Bayer Health Care (2502) (Figura 1) e o derivado nitroimidazólico Benznidazol (BZ) (Figura 1), produzido pela Roche com os nomes comerciais de Rochagan® e Rodanil®. Em 2003, o BZ teve sua patente cedida ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), responsável pela sua produção no Brasil e ao Laboratório ELEA (S.A.C.I.F.y A na Argentina).



**FIGURA 1:** Estruturas químicas do Benznidazol (BZ) e do nifurtimox (NFX).

Estes medicamentos não estão disponíveis para a comercialização. Apenas o BZ está disponível no Brasil e sua distribuição fica a cargo das Secretarias Estaduais de Saúde e da OMS. Os resultados da utilização em humanos de ambas as fármacos variam de acordo com a fase da doença em que o indivíduo se encontra no início do tratamento, do período de tempo de tratamento, da dose administrada, da idade e da origem geográfica do indivíduo (Coura & Castro, 2002) e possivelmente da variedade genética do parasito uma vez que desde os estudos experimentais iniciais foi demonstrada existência de cepas naturalmente resistentes, posteriormente confirmada em amostras de parasitos de procedências distintas (Filardi e Brener, 1987).

O mecanismo de ação do BZ está relacionado ao estresse oxidativo causado por macromoléculas, provenientes de reações de nitro-redução de radicais intermediários, lipídios, proteínas e, conseqüentemente, componentes celulares do RNA do *T. cruzi* (Docampo, 1990; Maya *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2011). Mais recentemente, Wilkinson e colaboradores (2008) demonstraram que o BZ atua também como pró-fármaco, sofrendo ativação mediada por enzimas celulares do *T. cruzi* que levam a produção de radicais livres citotóxicos ao próprio parasita. Tanto o mecanismo de ação, quanto as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do BZ, causam reações adversas que desencadeiam o 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 & Castro, 2002).

O BZ é eficaz principalmente quando utilizado para tratar a fase aguda da DCh, revelando índices de cura que variam de 40% a 76% (Shikanai Yasuda, 1990; Andrade *et al.*, 1992; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Cançado, 2002). Nas últimas décadas verificou-se que o BZ tem apresentado altas taxas de cura (62 a 87%) em infecções crônicas recentes, tanto no Brasil como em outros países (Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani e segura, 1999; Andrade *et al.*, 2004; Streiger *et al.*, 2004). Além disto, foi demonstrado que o tratamento nesta fase traz benefícios para os indivíduos chagásicos (Segura *et al.*, 1994; Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani e segura, 1999; Andrade *et al.*, 2004; Streiger *et al.*, 2004), bem como melhor prognóstico da doença e retardo de suas complicações clínicas (Andrade *et al.*, 2004). No entanto, o tratamento com BZ quando utilizado na fase crônica tardia, período no qual a maioria dos indivíduos é diagnosticada, é baixa, apresentando reduzida eficácia com taxas de cura variáveis, desde ausência até 19,1% de cura (Ferreira, 1990; Viotti *et al.*, 1994, 2006; Suasnábar *et al.*, 2000; Braga *et al.*, 2000; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Cançado, 2002; Lana *et al.*, 2009; Machado-de-Assis, 2012). Ainda assim, estudos observacionais demonstraram que o tratamento de indivíduos chagásicos crônicos tardios com BZ impediu a evolução clínica da doença, mesmo

quando não foi capaz de eliminar o parasito (Viotti *et al.*, 1994; Fabbro de Suasnabar *et al.*, 2000; Cançado 2002; Lana *et al.* 2009; Machado-de-Assis, 2011).

As razões para diferenças na eficácia do BZ nas fases aguda e crônica ainda não estão totalmente claras, mas alguns pesquisadores sugerem que possivelmente estão relacionadas às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco, como a meia-vida relativamente curta, limitada penetração tecidual (Lamas *et al.*, 2006, Urbina, 2009) e, ainda, a resistência natural de algumas cepas do parasito ao tratamento com BZ e NFX (Filardi & Brener, 1987). Após a introdução do NFX e BZ poucos compostos foram testados até o momento e somente quatro fármacos foram submetidos aos ensaios clínicos, incluindo o cetoconazol, o itraconazol, o alopurinol e o posaconazol. De um modo geral os resultados das triagens clínicas obtidas com estes fármacos foram contraditórios. No Brasil, cetoconazol, itraconazol e o alopurinol não foram capazes de erradicar a infecção em animais e humanos ou de impedir a progressão da doença (Lauria-Pires *et al.*, 1988; Brener *et al.*, 1993). Por outro lado, no Chile, considerável redução na positividade dos testes parasitológicos e regressão ou prevenção das alterações eletrocardiográficas foram observadas após tratamento com esses fármacos (Apt *et al.*, 1998; Apt *et al.*, 2003).

Porém, ao longo dos anos e dadas as limitações apresentadas pelo tratamento etiológico disponível para a DCh, fica evidente a necessidade da busca por novas drogas e/ou estratégias terapêuticas para os milhões de indivíduos na fase crônica da doença. Além da triagem empírica de substâncias, novos alvos para o desenvolvimento de terapias anti-*T. cruzi* foram propostos com base nos estudos acerca das vias fisiológicas, bioquímicas e moleculares do parasito e do hospedeiro (Urbina, 2009). Dessa forma, nas últimas décadas, outros compostos sintéticos e alguns outros naturais têm sido testados por grupos de pesquisas especializados em DCh, mas lamentavelmente ainda há grande desinteresse das indústrias farmacêuticas em explorá-los. Estudos sobre bioquímica básica do *T. cruzi* tem identificado possíveis alvos para quimioterapia incluindo metabólitos esteroides, enzimas como a tripanotiona redutase, cisteína proteinase e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, dentre outros (DoCampo, 2001; Rodriguez, 2001).

Segundo a recomendação da OMS, busca-se uma droga “ideal” para o tratamento da DCh, que deve atender a alguns requisitos: 1) Apresentar cura parasitológica durante a fase aguda e crônica da infecção; 2) Ser eficaz em dose única ou em poucas; 3) Custo acessível para todos os indivíduos (baixo custo); 4) Não apresentar efeitos colaterais e teratogênicos; 5) Não necessitar de hospitalização para a administração e 6) Não induzir resistência (WHO, 2002). Com isso, recentemente novas opções de tratamento para a DCh foram propostas, incluindo os inibidores da síntese do ergosterol, particularmente os inibidores da enzima C14- $\alpha$ -dimetilase (CYP51). Esses compostos, assim como outros derivados azólicos, bloqueiam a biossíntese do



ergosterol, que é o principal esteroide de membrana do *T. cruzi*. A sua atividade farmacológica anti-*T. cruzi* tem sido atribuída à combinação da elevada seletividade dirigida a este parasito e às suas propriedades farmacocinéticas favoráveis, como tempo de meia-vida longo e grande volume de distribuição (Urbina, 2010). Alguns trabalhos demonstraram taxas de cura elevadas e/ou redução das lesões causadas pela infecção experimental de animais com cepas de *T. cruzi* de distintos perfis de resistência/susceptibilidade ao tratamento com BZ (Molina *et al.*, 2000; Urbina *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2010). Estes resultados promissores causaram grande expectativa entre os pesquisadores da área, o que permitiu que estes compostos avançassem para triagem clínica de fase II (Bahia *et al.*, 2014). Alguns estudos de eficácia e segurança de dois derivados azólicos, posaconazol e o pró-fármaco do ravuconazol (E1224) com humanos foram realizados em diferentes regiões geográficas: na Espanha, sob responsabilidade da Merck Sharp & Dohme Corporation, com o ravuconazol (CHAGASAZOL, 2010); e na Bolívia, conduzido pelo DNDi para a avaliação do E1224 (DNDi, 2011). Ambos os fármacos apresentaram boa segurança para utilização em humanos, porém não reproduziram os resultados obtidos durante a fase de avaliação em animais experimentalmente infectados, demonstrando baixa ou nenhuma eficácia no tratamento de pacientes chagásicos crônicos (Molina, 2012; Torrico, 2013). Apesar destes resultados inesperados, retomou-se uma discussão sobre a necessidade de se investigar novos regimes de tratamento de acordo com as propriedades farmacocinéticas de cada fármaco, bem como novas dosagens e estudos de novas substâncias (Torrico, 2013).

### **1.2.1. Lactonas Sesquiterpênicas no tratamento de doenças parasitárias e anti- *T. cruzi***

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.

Desde 1976, estudos sobre o potencial das lactonas sesquiterpênicas (LS) vem revelando a sua utilização em doenças parasitárias (Vichnewsky *et al.*, 1976; Chiari *et al.*, 1991; 1996; *al.*, 1992; Duarte, 1993; Oliveira *et al.*, 1996; François *et al.*, 1996; Jordão *et al.*, 2004; Graef *et al.*, 2005). Os estudos realizados ao longo dos anos permitiram o isolamento e caracterização de diversas substâncias potencialmente eficazes, que apresentaram, por exemplo, ação esquistomicida e tripanocida (Vichnewskit *et al.* 1976; Chiari *et al.* 1991). Preparações a partir de extratos de espécies vegetais brasileiras do gênero *Lychnophora* (família Asteraceae),

também popularmente conhecida como “arnica”, ou “arnica-da-serra”, ou “candeia”, são utilizados na medicina popular no tratamento da dor, inflamação, contusão e picada de insetos (Oliveira *et al.*, 1996).

Em 1980, Bohlmann *et al.* realizaram um estudo sobre a caracterização estrutural de substâncias isoladas de plantas do gênero *Lychnophora* (*L. hakeaefolia*), o que abriu portas para novos estudos sobre este gênero de plantas. Diversas espécies de plantas do gênero *Lychnophora*, como a *L. passerina*, *L. pinaster* e *L. trichocarpha* começaram a ser avaliadas frente a formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (Chiari *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1996).

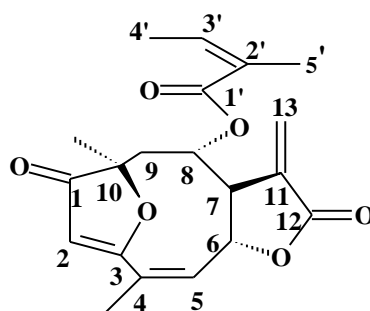
Na busca por compostos tripanocidas uma seleção empírica de produtos naturais isolados de plantas da família Asteraceae de vários tipos estruturais foi realizado levando a descoberta de quatro compostos ativos, sendo três deles LS (Oliveira *et al.* 1996). As três LS apresentaram resultados apreciáveis quanto ao percentual de inibição do crescimento das formas tripomastigotas sanguíneas *in vitro*, sendo duas delas isoladas a partir da *L. trichocarpha*: uma delas a licnofolida (LIC) que inibiu 50% do crescimento da cepa Y do *T. cruzi* em uma concentração de 150 µg/mL; e outra a eremantolida C que inibiu 100% do crescimento em uma concentração de 3600 µg/mL.

As LS contêm grupos funcionais alquilantes responsáveis por suas principais ações biológicas, bem como por seus efeitos tóxicos sendo elas a  $\alpha$ ,  $\beta$ -ciclopentenona insaturada (Uchiyama, 2009) e a  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (Rodriguez *et al.*, 1976; Picman, 1986; Schmidt, 2009, Uchiyama, 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, à inibição da síntese do DNA e, portanto, a multiplicação de microorganismos unicelulares, tais como os protozoários da família Tripanosomatidae. Uchiyama (2009) sugeriu que a atividade tripanocida destes compostos é em grande parte dependente da formação de uma ligação covalente entre a porção  $\gamma$ -lactona e nucleófilos (reação com proteínas que contém grupamento sulfidril) este grupo é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* contra o stress oxidativo. Com base na literatura, o elatol (Brangio *et al.*, 2000), uma LS constituinte de uma alga vermelha *L. dendroidea*, apresentou atividade terapêutica contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*. Estudos revelaram que a atividade terapêutica de elatol envolve mitocôndria, como o principal alvo, levando a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterando a cadeia transportadora de elétrons, o que afeta a membrana celular e integridade do DNA e, finalmente, induz a morte do parasita (Desoti *et al.*, 2012).

Neste trabalho foi estudada a eficácia terapêutica anti-*T. cruzi* da lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC). A eficácia terapêutica da LIC livre e encapsulada já foi em

parte estudada por nosso grupo em animais infectados com cepas CL (sensível) e Y (parcialmente resistente) (Branquinho *et al.*, 2014 b), cepa Colombiana (Branquinho, 2010, Branquinho *et al.*, 2013) do *T. cruzi*, e os resultados obtidos geraram o depósito de **uma patente** no **INPI (número: PI11063025)** também requerida no “World International Patent Office” sob o número PCTBR/2012/000399 passando a receber o nº WO/2013/05989. Empresas públicas nacionais, FARMANGUINHOS-FIOCRUZ-FAPEMIG manifestaram o interesse por sua potencial exploração futura, mas a FARMANGUINHOS apontou o receio do uso dos polímeros constituintes nas nanocápsulas para humanos, apesar de serem eles aprovados pelo FDA.

A LIC (**Figura 2**) é uma LS lipofílica, cujo  $\log P = 5,03 \pm 0,07$  foi determinado pelo programa ACD/LABS. Destacam-se suas atividades: anti-*T. cruzi in vitro* (Oliveira *et al.*, 1996; Graef *et al.*, 2005), anti-*T. cruzi in vivo* (Branquinho *et al.*, 2014 b), antibacteriana (Giesbrescht *et al.*, 1990; Saúde, 2002), antitumoral (Lee *et al.*, 1977; Saúde-Guimarães *et al.*, 2014), anti-inflamatória (Ren *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2013) citotóxica (Ren *et al.*, 2012), anti-hiperucêmica e antiartrite gotosa (de Souza *et al.*, 2013). A LIC apresenta potencial anticarcinogênico e segundo estudo realizado por Saúde-Guimarães *et al.* (2014), esta substância apresentou atividade antitumoral frente a 30 linhagens de células tumorais. Segundo Canalle *et al.* (2001) a LIC induziu citotoxicidade em cultura de linfócitos humanos na concentração acima de 0,2 µg/mL, e clastogenicidade nas células de medula óssea de camundongos Swiss tratados por via intraperitoneal na dose única de 26,67 mg/kg *in vivo*.



**Figura 2:** Estrutura química da licnofolida.

As atividades terapêuticas da LIC bem como seus efeitos tóxicos gerais têm sido atribuídos à presença de dois grupos funcionais alquilantes presentes  $\alpha$ -metileno-  $\gamma$  -lactona;  $\alpha,\beta$ -ciclopentenona insaturada.

Não são raros os casos onde substâncias com potente ação citotóxica como é o caso da LIC (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, semelhante 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).

A LIC de fato apresenta uma potente ação citotóxica (Ren *et al.*, 2012) e clastogênica (Canalle *et al.*, 2001). Recentemente, numa parceria desenvolvida entre nosso grupo com a Universidade de Montpellier I-France, no Laboratório de Physiologie & Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles - INSERM - U1046 (Equipe I- Coordenada pelo Dr. Sylvain Richard), foi avaliada a citotoxicidade da LIC *in vitro*, utilizando como modelo cardiomiócitos isolados de camundongos. Foi possível detectar na concentração de 0,5 µg/mL de LIC (0,14 nM), 50% de células arritmicas, e esta arritmia celular chegou a 100% na concentração de 5,0 µg/mL (14 nM); ou seja, foram observados efeitos arritmogênicos pela observação de ondas de Ca<sup>2+</sup> ectópicas e modificações de correntes iônicas com a dose mais alta testada (14 nM). Assim a LIC mostrou-se segura no tocante à cardiotoxicidade em concentrações inferiores a 0,14 nM.

Na Universidade de Montpellier I-France, foi conduzido ainda, um experimento de administração da LIC carregada em NC em camundongos por via intravenosa, durante 20 dias consecutivos, empregando-se os mesmos parâmetros avaliados *in vitro*. Verificou-se que as NC protegem os animais contra a arritmia observada em cardiomiócitos isolados (dados não mostrados). Assim, fica mais uma vez comprovado que o emprego da nanotecnologia viabiliza a utilização *in vivo* da LIC, impedindo seus potenciais efeitos tóxicos. A NC é, portanto, promissora e proporciona uma opção terapêutica com menor risco de arritmias ventriculares que ameaçam a vida, aliada ainda ao fato que as NC direcionam sua distribuição dentro do organismo, aumentando a sua eficácia terapêutica e permitindo uma ação mais sustentada mediante a liberação controlada da substância ativa LIC quando comparada com aquela produzida pela administração da LIC livre (Branquinho *et al.*, 2014 a, b). Além disso, as lactonas sesquiterpênicas, bem como a LIC, são eletrófilos altamente reativos e as NC podem eventualmente proteger a molécula ativa da degradação enzimática ou química em condições fisiológicas, o que merece ser investigado em estudos posteriores.

Recentemente, Lachi-Silva *et al.* (2015) demonstraram propriedades farmacocinéticas favoráveis da LIC, tanto por via intravenosa (I.V.) quanto por via oral (V.O.), quando administrada em ratos Wistar nas doses de 1,65 mg/kg e 3,33 mg/kg, respectivamente. Foi preparada uma solução de LIC diluída em DMSO:Tween 80:água (6,7:13,3:80). Os autores

mostraram boa biodisponibilidade oral (cerca de 68%), rápida absorção, distribuição e eliminação, sugerindo sua utilização como agente farmacológico oral favorável.

Apesar do seu potencial farmacológico, a aplicação terapêutica da LIC torna-se limitada, devido a elevada lipoficidade ( $\log P = 5,03$ ) e baixa solubilidade em meio PBS pH 7,4 ( $33,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ ) (Branquinho *et al.*, 2014 a). Já foi demonstrado por nosso grupo que a associação da LIC com sistemas de liberação modificada, tais como nanocápsulas poliméricas (NC) pode ser usada para aumentar o tempo de sua ação, bem como propriedades de liberação controlada (Branquinho *et al.*, 2014 a, Branquinho *et al.*, 2014 b).

### **1.2.2. Nanocarreadores de fármacos: ênfase à doença de Chagas e nanocápsulas**

O fármaco ideal para a DCh deve apresentar elevado volume de distribuição e longo tempo de retenção na corrente sanguínea, devendo apresentar atividade tanto durante a fase aguda da infecção quanto na crônica (Strosberg *et al.*, 2007). Assim, a habilidade de modificar a entrega de fármacos às células e aos tecidos confere aos sistemas nanoestruturados a capacidade de transpor as barreiras intracelulares e aumentar a entrega de fármacos que apresentam reduzido volume de distribuição aos sítios desejados (Romero & Morila, 2010). A capacidade de penetrar mais facilmente as barreiras anatômicas é observada para diversos polímeros sugeridos em testes *in vivo*, que são biodegradáveis quando administrados por via oral (Romero & Morila, 2015). A definição física para nanocarreadores de fármacos limita o tamanho das partículas superior à 100 nm, porém considerando o contexto biológico estes sistemas são classificados como nanopartículas que apresentam tamanho entre 200 – 300 nm (Romero & Morila, 2010). Dessa forma, a capacidade das nanopartículas de superar barreiras anatômicas como TGI as existentes no , pele, sangue e cérebro tem sido atribuída à relação área/volume destas partículas (Oberdörster *et al.*, 2005). Além disso, sistemas de entrega de fármacos maiores que 400 nm são rapidamente capturados por células do sistema fagocitário e não conseguem circular na corrente sanguínea por tempo suficiente para entregar quantidades de fármaco eficazes aos alvos terapêuticos (Espuelas *et al.*, 2012)

Segundo Romero & Morila (2015) a toxicidade e a reduzida permeabilidade que o BZ apresenta *in vivo* são as principais limitações para seu uso na DCh crônica, pois ele não consegue atingir as formas amastigotas intracelulares que aí se multiplicam sendo então responsáveis pela manutenção da infecção no hospedeiro. A utilização de sistemas de liberação controlada, ou sistemas vetorizados no tratamento da DCh tem aumentado ao longo dos últimos anos, apresentando resultados promissores que demonstram o seu potencial quando utilizados associados aos fármacos de referência BZ e NFX (Romero & Morila, 2010), derivados azólicos, como Miconazol, Cetoconazol e Itraconazol (Barros, 2007) e, ainda, com substâncias naturais

(Dorim, 2010; Branquinho *et al.*, 2014 a e b). O aumento da associação de fármacos como o BZ a sistemas vetorizados na terapêutica da DCh se deve ao aumento das taxas de cura observadas frente ao tratamento clássico por via oral, bem como já foi demonstrado que esta associação tem reduzido os efeitos tóxicos. Estes fatos se devem à seletividade tecidual proporcionada por estes nanocarreadores além do aumento da concentração plasmática do BZ, o que permite reduzir as doses administradas (Romero & Morila, 2015).

Mais recentemente, o BZ foi associado a sistemas de distribuição auto-emulsionáveis (SNEDDS) por via oral, que proporcionam um aumento na taxa de cura dos camundongos Swiss infectados com a cepa Y (parcialmente resistente) com um quarto da dose geralmente utilizada para o tratamento murino clássico, num regime posológico mais confortável de 10 doses durante 20 dias (Mosqueira, dados não publicados). Esta formulação foi capaz de modificar o perfil plasmático do BZ, retardando a taxa de absorção e elevando a área sob a curva com um perfil de concentração plasmática sustentada após uma única dose oral (Mosqueira *et al.*, 2013). Molina *et al.* (2010) demonstraram que a administração do fármaco D0870 (5,0 mg/kg/dia) por via I.V. durante 20 dias consecutivos associado à partículas poliméricas de PLAPPEG proporcionou percentual de cura mais elevado (60,0%) em animais infectados com a cepa Y (parcialmente resistente), quando comparado ao tratamento clássico com BZ (47,0%). Este tratamento proposto por Molina *et al.* (2010) ainda proporcionou 100,0% de sobrevivência dos animais. Taxas de cura de 90,0% foram também alcançadas ao utilizar o mesmo protocolo de tratamento com cepa susceptível ao tratamento clássico com BZ (100,0 mg/kg/dia).

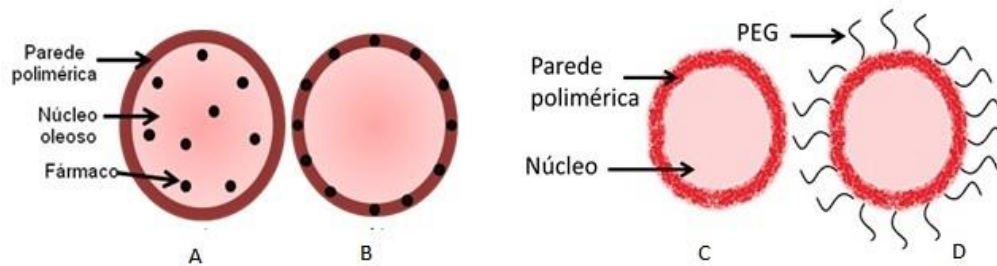
Após a administração extra vascular de fármacos, quatro processos são responsáveis por modular o comportamento de uma substância ativa no organismo humano: 1) Absorção, onde a molécula ativa é liberada da forma farmacêutica, alcançando a circulação sistêmica; 2) Distribuição, responsável por entregar a substância ativa ao sítio de ação, distribuindo-a, nos diferentes tecidos ou órgãos; 3) Metabolização, em que a molécula sofre biotransformação no organismo e, por fim, 4) Eliminação, na qual a molécula é eliminada do organismo na forma intacta ou modificada após sofrer metabolização (Puisieux *et al.*, 1988). Com este entendimento, a pesquisa galênica atual, baseada nas características das formas farmacêuticas e da interação das mesmas com alvos celulares, busca modular o comportamento de fármacos no organismo, como a utilização de sistemas cognominados de liberação modificada, o qual possibilita manipular os processos de absorção e distribuição dos medicamentos no organismo do paciente (Puisieux *et al.*, 1988).

A vetorização é, geralmente, sugerida para aqueles fármacos que não apresentam propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas favoráveis em formulações farmacêuticas

tradicionais (Ex. cápsulas, comprimidos, emulsão), com o objetivo de tornar suas propriedades mais aceitáveis para a utilização desses fármacos na população em geral. Por isso, atualmente, tem-se dado considerável atenção para o desenvolvimento de novos sistemas de entrega para substâncias naturais ativas. Na pesquisa de formulações fitoterápicas, o desenvolvimento de nanocarreadores (lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoemulsões) apresentam diversas vantagens, como: aumento da solubilidade e biodisponibilidade, redução da citotoxicidade, aumento da atividade farmacêutica e da estabilidade, entrega controlada, proteção da degradação física e química das moléculas bioativas (Saraf, 2009). Assim, os nanosistemas de entrega de medicamentos à base de fitoterápicos têm um futuro potencial para melhorar a atividade e superar problemas farmacocinéticos associados às plantas medicinais.

A utilização de nanocápsulas poliméricas (NC) como sistema vetorizado na DCh tem aumentado ao longo dos últimos anos, mas ainda tem sido limitada, mesmo demonstrando resultados promissores (Sánchez *et al.*, 2002; Barros, 2007; Branquinho *et al.*, 2014).

A produção de NC pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado leva a obtenção de partículas de 50-200 nm (Fessi *et al.*, 1989), constituídas por uma “membrana” polimérica e um núcleo oleoso, além de tensoativos na interface núcleo-polímero. Diversos óleos podem ser utilizados para preenchimento do núcleo, mais comumente, de origem natural, tanto animal quanto vegetal, que devem apresentar a capacidade de dissolver o fármaco pretendido (Legrand *et al.*, 1999). Diversos polímeros foram propostos e apresentam como característica comum, causar aumento da concentração plasmática  $\times$  tempo de seus fármacos carregados quando comparados a substâncias sob sua forma livre (Mosqueira *et al.*, 2004, Branquinho, 2014). Dentre eles, o poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), o ácido poli-lático (PLA) e o ácido poli-lático associado ao polietilenoglicol (PLAPEG) têm sido utilizados por serem de fácil manipulação, estáveis nos fluidos biológicos e por apresentarem propriedades intrínsecas que tornam sua utilização *in vivo* desejável sendo ainda considerados biocompatíveis e biodegradáveis, e degradados em fragmentos menores excretáveis, ou até mesmo, degradados à metabólitos naturais que podem ser reutilizados pelo organismo (Domb, 1994; Kreuter *et al.*, 1994). Em alguns casos, dependendo das características do fármaco utilizado nestas formulações, ele pode ser adsorvido à matriz polimérica, ao invés de ficar retido no núcleo oleoso (Schaffazick *et al.*, 2003). A **Figura 3** representa os principais tipos de interação fármaco-formulação observados na produção de nanocápsulas poliméricas que podem ser classificadas como convencionais ou furtivas (Mosqueira *et al.*, 2001), de acordo com o polímero utilizado em sua superfície.



**Figura 3:** Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: A) fármaco dissolvido ao núcleo oleoso; B) fármaco adsorvido à parede polimérica; C) nanocápsulas com polímero convencional; D) nanocápsulas com polímero furtivo.

As NC são carreadores de fármacos lipofílicos que podem ser administradas por via intravenosa (I.V.) e por via oral, pois apresentam boa absorção, são constituídas de polímeros estáveis e apresentam baixa toxicidade e degradação no organismo humano (Mosqueira *et al.*, 2001).

Muitas moléculas ativas pequenas são administradas com sucesso pela via oral, devido à elevada capacidade de absorção do TGI. No entanto, muitos fármacos não são adequados para administração oral, devido à baixa solubilidade, estabilidade e/ou biodisponibilidade (Ensign *et al.*, 2011). Logo, é sugerido que o encapsulamento destes fármacos em nanopartículas pode superar estas limitações, bem como permitir sua liberação prolongada no TGI (Ensign *et al.*, 2011).

Existem barreiras significativas no trato gastrointestinal (TGI) para formulações de nanopartículas, que devem suportar o ambiente ácido do estômago, bem como a degradação por enzimas digestivas (Ensign *et al.*, 2011). Além disso, as nanopartículas no trato gastrointestinal tem que penetrar a barreira do epitélio intestinal. Tobío *et al.* (2000) demonstraram que a administração de nanopartículas de PLA (~ 160 nm) revestidas com PEG conferiram proteção adicional à agregação induzida por enzimas dos fluídos gastrointestinais, bem como reduziu a degradação destas *in vitro*. Segundo Ensign *et al.* (2011), é importante notar que este revestimento provavelmente não seria adequado para permitir a penetração das partículas pelo epitélio intestinal (Ensign *et al.*, 2011), porém Wang *et al.* (2008) demonstraram elevação da circulação sanguínea de partículas radiomarcadas após a administração por via oral, atribuindo este aumento às partículas formadas de PLAPEG que permitiriam a sua captação através do epitélio intestinal. Zabaleta *et al.* (2012) também demonstraram que a administração de Paclitaxel carreada em nanopartículas de PLAPEG por via oral à animais elevou a concentração plasmática e seu tempo de circulação sanguínea, quando comparado à administração da substância sob sua forma livre. Este aumento foi atribuído à presença das cadeias de PEG nas



nanopartículas, que alteram a permeabilidade destas partículas nas células do TGI (Zabaleta *et al.*, 2012).

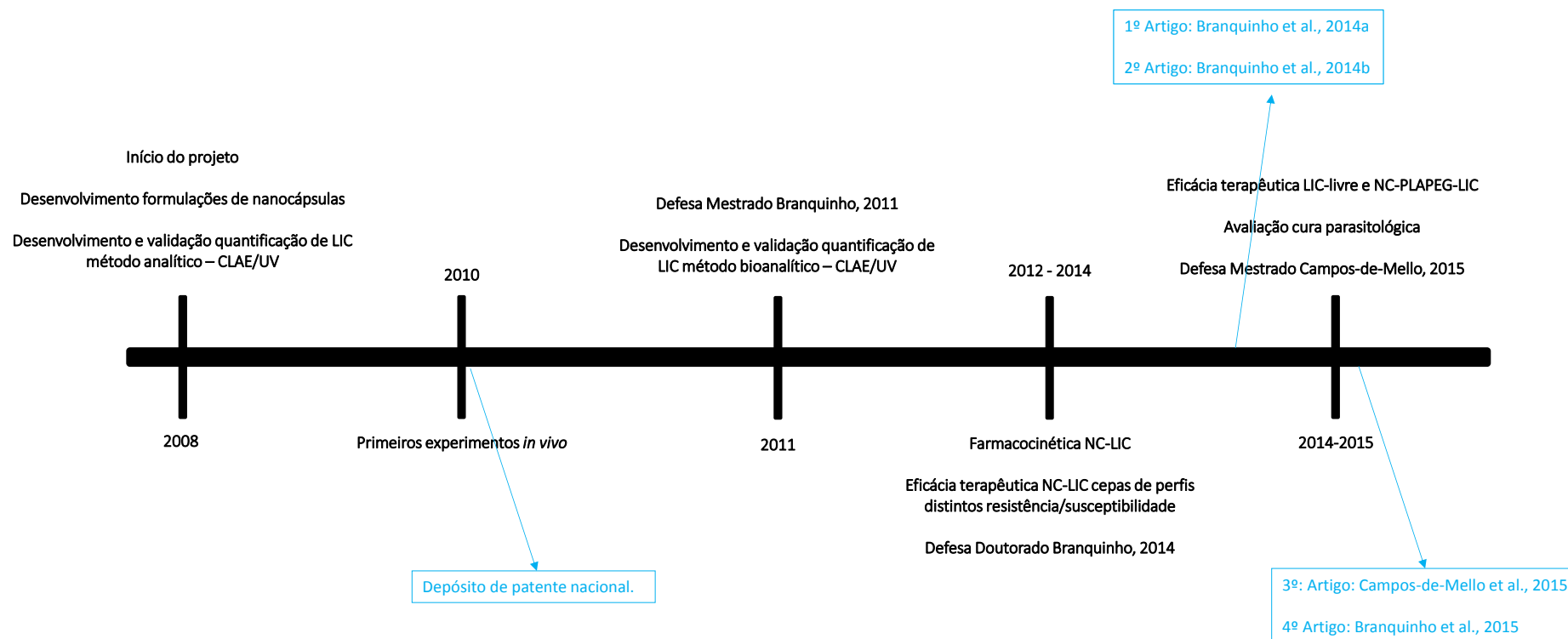
Mais recentemente, trabalhos apresentados por nosso grupo (Branquinho *et al.*, 2014) demonstraram resultados promissores com a utilização de formulações nanoencapsuladas contendo LIC, administradas por via I.V. e por via oral no tratamento da DCh experimental em modelo murino. Foram utilizados polímeros de PCL e de PLAPEG, que levam a obtenção de sistemas convencional e furtivo, respectivamente, em estudos *in vivo* com animais experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi* de perfis distintos de susceptibilidade/resistência ao tratamento com BZ. Desta forma, pela primeira vez foi proposta a utilização de nanocápsulas contendo uma substância natural por via oral. Além disso, ficou comprovado que a utilização destas formulações melhorou diversas características farmacocinéticas da LIC, e que a utilização de sistemas poliméricos furtivos foi melhor que os convencionais (Branquinho, 2014).

A avaliação da eficácia do tratamento por via I.V. com formulações de NC furtivas obtidas por Branquinho (2014) demonstrou taxas de cura de 100,0% e de 62,5% dos animais experimentalmente infectados com as cepas de *T. cruzi* Y (parcialmente resistente) e Colombiana (resistente ao BZ e NFX) durante a fase aguda da infecção. Foram observadas taxas de cura de 62,5% e de 55,0% dos animais experimentalmente infectados com a cepa Y, tratados durante a fase aguda e fase crônica, respectivamente, por via oral. Quando utilizadas em dose mais elevada (12,0 mg/kg/dia), durante a fase crônica da infecção, foi demonstrado cura em 87,5% dos animais infectados experimentalmente com a cepa VL-10 (resistente) do *T. cruzi* (Branquinho, 2014). Estes resultados comprovaram que a utilização de formulações de NC melhoraram diversas características farmacocinéticas da LIC que, sob sua forma livre, apresentam características desfavoráveis. Além disso, foi demonstrada que a administração destas formulações de NC furtivas por via oral, durante a fase aguda e fase crônica da infecção, também trouxeram benefícios para os animais experimentalmente infectados, como aumento de sobrevivência e aumento da eficácia. Assim como sugerido por Romero & Morila (2010), Espuelas *et al.* (2012) e Bahia *et al.* (2014), o trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa reforça a capacidade que algumas nanopartículas (como as formadas de PLAPEG) apresentam em transpor barreiras anatômicas pela via oral. A associação da LIC com carreadores de fármacos, no caso NC descritas por Branquinho (2014 a, b) pode aumentar a interação dessa substância com os tecidos alvos, ou seja, infectados com parasitas *T. cruzi* que se multiplicam intracelularmente. Sendo assim, o desenvolvimento tecnológico de formulações adequadas para encapsulamento da lactona torna-se primordial para melhoria da atividade biológica geral desse composto. Vale enfatizar que, existem limitadas opções para administração de substâncias altamente lipofílicas, como é o caso da LIC, tanto por via oral, quanto por via parenteral, devido

à baixa solubilidade aquosa desse composto, os quais reduzem sua biodisponibilidade e muitas vezes mascaram a atividade deste tipo de substâncias *in vivo*.

### 1.2.3. Nanocápsulas poliméricas contendo Licnofolida – Contextualização do projeto

A **Figura 4** representa a linha do tempo dos estudos realizados com a LIC pelo nosso grupo com o objetivo de contextualizar o trabalho desenvolvido nesta dissertação.



**Figura 4:** Linha do tempo contendo os pontos de maior destaque durante o desenvolvimento do projeto de Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo murino. 2008 - Atual

A partir dos estudos pioneiros de Oliveira *et al.* (1996) que demonstraram atividade anti- *T. cruzi in vitro* de algumas LS, dentre elas a LIC, surgiu a ideia de avaliar esta lactona em modelo murino experimentalmente infectado com cepas de *T. cruzi* na Universidade Federal de Ouro Preto. Diante dos bons resultados obtidos idealizou-se a vetorização da licnofolida em nanocápsulas poliméricas e deu-se início ao projeto de Mestrado (Branquinho, 2010). Na primeira fase do projeto (2008 – 2010) objetivou-se o isolamento da LIC a partir da *Lychnophora trichocarpha*, desenvolvimento de formulações poliméricas nanoestruturadas carreadoras de LIC (NC-PCL-LIC) que foram avaliadas juntamente com LIC livre e BZ. Foi desenvolvido a seguir um método analítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector de arranjo diodos (DAD). Os dados obtidos permitiram a defesa de dissertação de mestrado (Branquinho, 2010).

Em 2010, o projeto configurou a tese de doutorado (Branquinho, 2014) durante a qual foram desenvolvidas e caracterizadas formulações de NC furtivas, avaliação da estabilidade das formulações de NC-PCL-LIC e NC-PLAPEG-LIC por diferentes parâmetros e realizada pela primeira vez a avaliação do seu perfil farmacocinético.

Avançou-se nos testes de eficácia terapêutica *in vivo* das formulações de LIC nanoencapsulada (NC-PCL-LIC, NC-PLAPEG-LIC) em modelo murino utilizando cepas de *T. cruzi* de perfis de resistência/susceptibilidade distintos em paralelo ao tratamento clássico com BZ. Em paralelo foi feita a farmacocinética das formulações NC-LIC e LIC livre. Os importantes resultados obtidos no tratamento de cepas de *T. cruzi* de perfis distintos de resistência ao tratamento com os fármacos usuais na fase aguda e crônica pelas vias I.V. e via oral, principalmente com as NC furtivas, incentivaram novos testes com as mesmas formulações de NC-LIC administradas em camundongos infectados e tratados por via oral (em ambas as fase de infecção) por via intravenosa de animais na fase crônica da infecção. Entretanto, devido a dificuldade de isolamento da LIC, a avaliação desta substância sob sua forma livre não foi completamente realizada.

Neste sentido, esse estudo buscou complementar os estudos anteriores e avaliação da eficácia terapêutica *in vivo* da LIC na forma livre (LIC-livre), comparada aos seus respectivos controles, e avançar utilizando LIC em formulações de nanocápsulas poliméricas administradas por via oral nas fases aguda e crônica da infecção. Além disso, foi realizada a avaliação tecidual para quantificação do parasitismo pela PCR quantitativa (qPCR) em animais experimentalmente infectados com cepas de *T. cruzi* de perfis distintos de susceptibilidade/resistência aos tratamentos usuais por BZ e NFX, tratados com as formulações de NC utilizadas por Branquinho (2014), comparada aos tratados com a LIC-livre.

## 2. Justificativa

Considerando os importantes resultados obtidos por Branquinho (Branquinho, 2010, 2014; Branquinho *et al.*, 2014a, b) no tratamento com Licnofolida em nanocápsulas com polímero convencional e , em camundongos infectados por cepas de *T. cruzi* de perfis distintos de resistência a os fármacos usuais, nas fase aguda e crônica da infecção, principalmente pela via intravenosa e oral (parcialmente); a avaliação complementar comparada do uso da licnofolida (LIC) na sua forma livre e em nanocápsulas no tratamento da infecção por *T. cruzi* em camundongos por via oral (fases aguda e crônica) **se justifica** por ter a LIC encapsulada se apresentado promissora no tratamentoda doença de Chagas experimental.

Este trabalho se justifica ainda por complementar a avaliação pós-tratamento dos trabalhos anteriores pela técnica de PCR quatitativa (qPCR) em tecido cardíaco.

### 3. Objetivo Geral

Determinar a eficácia terapêutica da licnofolida livre e nanoencapsulada em modelo murino experimentalmente infectado com cepas de *T. cruzi* de distintos perfis de resistência ao tratamento nas fases aguda e crônica da infecção, e avaliar o real benefício de formulações nanoestruturadas na evolução da infecção e eliminação tecidual do *T. cruzi*.

#### 3.1. Objetivos Específicos:

- Avaliar a eficácia *in vivo* da LIC-livre e NC-PLAPEG-LIC em modelo murino experimentalmente infectado com as cepas Y e VL-10 de *T. cruzi* de diferentes perfis de resistência tratados por via oral na fase aguda da infecção.
- Avaliar a eficácia *in vivo* da LIC-livre em modelo murino experimentalmente infectado com cepas Y e VL-10 de *T. cruzi* de diferentes perfis de resistência tratados por via oral na fase crônica da infecção.
- Determinar o parasitismo tecidual (coração) de camundongos experimentalmente infectados com as cepas Y e VL-10 de *T. cruzi* após o tratamento, com LIC-livre e em nanocápsulas pela via oral comparados ao BZ administrado nas fases aguda e crônica da infecção.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Licnofolida e Formulações

#### 4.1.1. *Isolamento da licnofolida, preparação de nanocápsulas e caracterização físico-química das nanocápsulas*

A coleta da *Lychnophora trichocarpa*, o isolamento e a caracterização da licnofolida estão descritos em Saúde *et al.* (1998), Ferrari *et al.* (2012), Branquinho *et al.* (2014 a), Saúde-Guimarães *et al.* (2014) e no depósito da patente no INPI (número: PI11063025) e também requerida no “World International Patent Office” sob o número PCTBR/2012/000399 patente nº WO/2013/05989 (Branquinho *et al.*, 2013).

A LIC isolada e purificada de *L. trichocarpa* foi utilizada para a produção da formulação nanoestruturada NC-PLAPEG-LIC [PLA-PEG [poli (D,L-láctico)-co-polietilenoglicol, Mn 49.000 g/mol] com PEG de Mn 5.000 g/mol foi obtido da Alkermes (Cambridge, USA) utilizado sem purificação, PLA [poli (D,L-láctico)] Resomer 203<sup>®</sup> R 203H PM 18.000 g/mol foi comprado da Boehringer Ingerlheim, (Alemanha). Esta formulação foi utilizada na realização de testes *in vivo* em modelo murinho experimentalmente infectado com *T. cruzi*.

As NC e soluções de LIC utilizadas na experimentação *in vivo* foram produzidas segundo descrito por Branquinho *et al.* (2014 a). Após a produção da formulação nanoestruturada, mediu-se o diâmetro médio, o índice de polidispersão das partículas e o potencial Zeta ( $\zeta$ ).

##### 4.1.1.1. Tamanho médio e Índice de polidispersão

O tamanho médio das partículas de NC obtidas e sua dispersão (índice de polidispersão) foram determinados pelo método de espectroscopia de correlação de fótons (ECF) (Zili *et al.* 2005). A técnica de EFC baseia-se no princípio da análise do movimento browniano das partículas que se traduz na capacidade de deslocamento de partículas presentes em determinada sistema monoou polidisperso. O diâmetro médio das partículas é avaliado pela dispersão da luz, causado pelo movimento padrão das partículas; aquelas que apresentam maior diâmetro movem-se mais lentamente em comparação àquelas menores (Manual do Malvern Instruments, 1996). Esta técnica é adequada para monitorização da estabilidade de coloides e avaliação de precipitação de partículas e agregação das NC.

Para esta análise as amostras em triplicatas foram diluídas em água ultra-pura na proporção de 1:1000. Tanto a análise do tamanho médio, quanto o índice de polidispersão (I.P.) das NC foram definidos utilizando o Nanosizer N5 Plus (Beckman Coluter, EUA).

#### 4.1.1.2. Potencial Zeta ( $\zeta$ )

Para caracterização da carga superficial das NC foi utilizada a técnica da Anemometria do Laser Doppler (ALD) que mede a mobilidade eletroforética das partículas que, por meio de uma equação matemática é convertida em potencial  $\zeta$ . O potencial  $\zeta$  reflete a carga superficial das partículas, que é influenciada por mudanças que ocorrem na interface com o meio externo decorrentes da dissociação ou associação de grupos funcionais presentes na sua superfície ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso ou na dispersão (Legrand *et al.* 1999). Essa determinação foi realizada utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments, Inglaterra), empregando-se a técnica de microeletroforese acoplada à Anemometria do Laser Doppler (ALD). Para esta análise as amostras em triplicatas foram diluídas em solução salina 1,0 mM na proporção de 1:500.

#### 4.1.2. *Preparo da suspensão de benzonidazol para administração por via oral*

Para o tratamento por via oral foi utilizado como fármaco referência o BZ em doses diárias de 100,0 mg/kg de peso corporal por dia, durante 20 dias consecutivos segundo Filardi & Brener (1987).

O fármaco foi ressuspensa em água e utilizando a goma arábica como agente suspensivo, de tal maneira que um volume 0,200 mL foi administrado a cada animal, como descrito por Marretto e Andrade (1994).

## 4.2. **Estudo de eficácia *in vivo* da LIC**

### 4.2.1. *Cepas de Trypanosoma cruzi utilizadas*

Inicialmente as cepas Y e VL-10 de *T. cruzi* que estavam criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em meio LIT (Camargo, 1964). Os tripomastigotas metacíclicos obtidos destas culturas foram inoculados em camundongos para a obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas que serviram de inóculo para os grupos experimentais aqui avaliados.



A cepa Y pertence à “discrete typing unit” (DTU) DTU 2 de *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 2009) foi isolada de um paciente chagásico na fase aguda da infecção, proveniente do município de Marília, São Paulo (Freitas *et al.*, 1953), posteriormente estudada e descrita por Silva e Nussensweig (1953) e considerada parcialmente resistente ao tratamento com BZ e NF (Filardi & Brener, 1987).

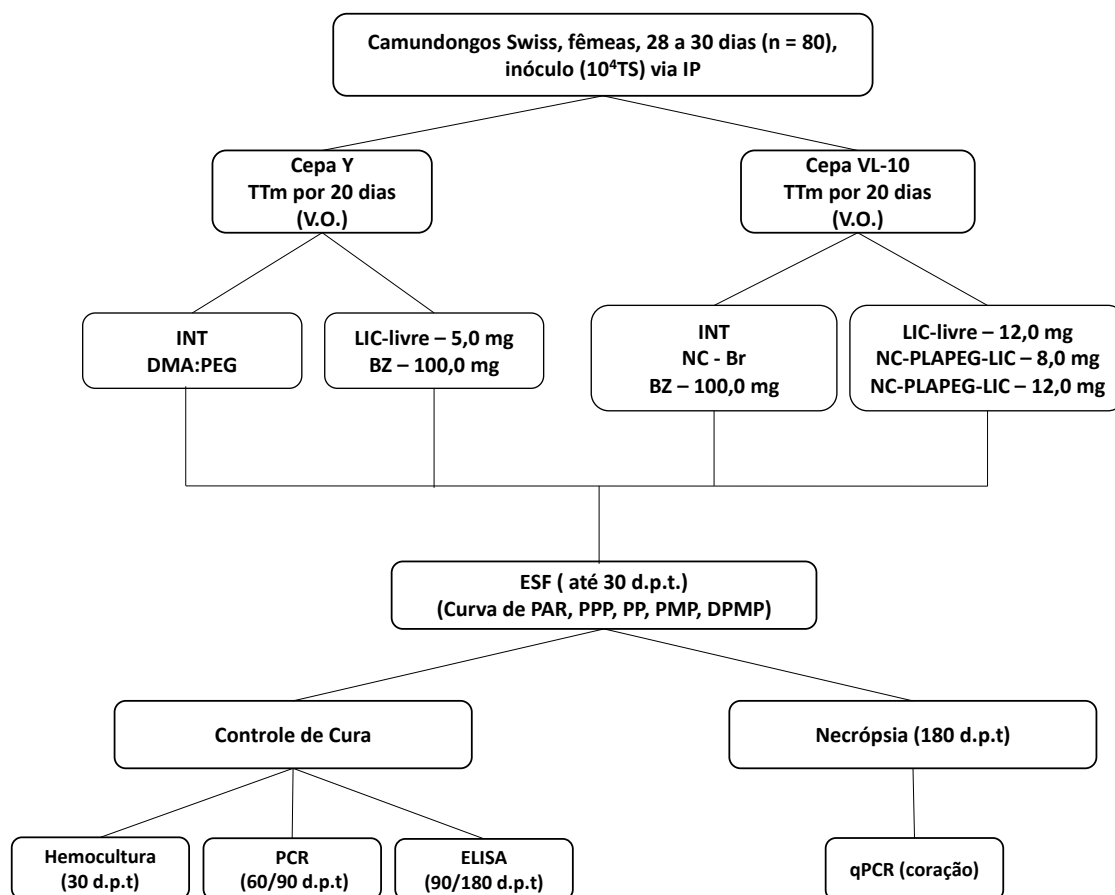
A cepa VL-10 pertence à DTU 2 (Zingales *et al.*, 2009) foi isolada de paciente na forma indeterminada da doença de Chagas no estado de Minas Gerais. Esta cepa é considerada resistente ao tratamento com BZ (Filardi & Brener, 1987).

#### **4.2.2. Modelo Animal utilizado**

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com 28-30 dias de idade, provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP), MG, Brasil. Esses animais foram mantidos no CCA-UFOP segundo as diretrizes estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), receberam água filtrada e foram alimentados com ração comercial balanceada “ad libidum”. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), MG, Brasil, protocolo nº **2009/13**.

#### **4.3. Tratamento da Fase Aguda**

Dez grupos de oito animais foram inoculados por via intraperitoneal com 10.000 formas tripomastigotas sanguíneos/animal de cada cepa de *T. cruzi*, quantificados segundo Brener (1962). Quatro grupos foram inoculados com a cepa Y e, os outros seis grupos com a Cepa VL-10. O tratamento durante a fase aguda foi iniciado no primeiro dia de parasitemia patente, sendo 4º dia pós-infecção para a cepa Y e 9º dia pós-infecção para a cepa VL-10, e realizado diariamente durante 20 dias consecutivos. Os animais tratados foram avaliados comparativamente aos seus respectivos grupos controle infectados e não tratados, conforme demonstrado no **Delineamento Experimental 1 (Figura 5)**.



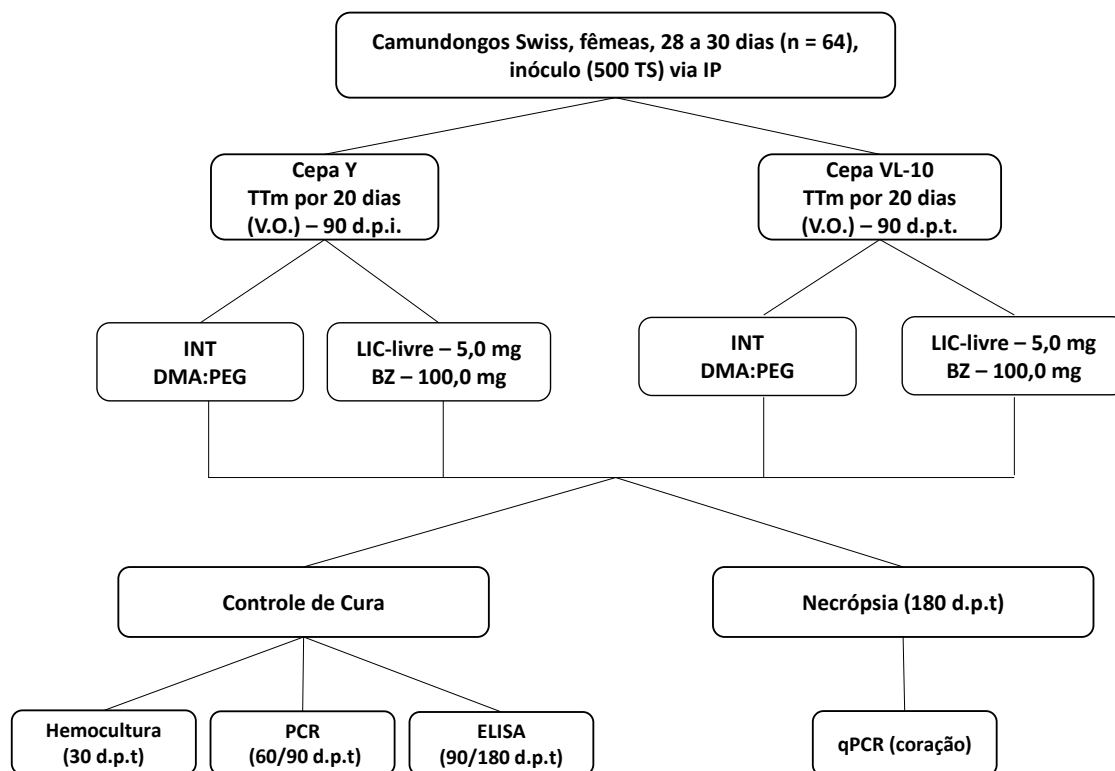
**Figura 5:** Delineamento experimental da avaliação da eficácia terapêutica de diferentes formulações farmacêuticas contendo licnofolida administradas por via oral em camundongos infectados com as cepas Y e VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados durante a fase aguda da infecção com: LIC-livre (Licnofolida não encapsulada) nas doses de 5,0 mg/kg/dia (Cepa Y) e 12,0 mg/kg/dia (Cepa VL-10), NC-PLAPEG-LIC (nanocápsula de PLA-PEG contendo licnofolida) nas doses de 5,0 mg/kg/dia (Cepa Y), 8,0 e 12,0 mg/kg/dia (Cepa VL-10), BZ (benznidazol) na dose 100,0 mg/kg/dia, Grupos controles: INT (controle infectado não tratado), NC-Br (nanocápsula branca, sem licnofolida), DMA:PEG (controle dos solventes dimetilacetamida: polietilenoglicol 300).

TS: tripomastigota sanguíneo, IP: intraperitoneal, TTm: tratamento, V.O.: via oral, ESF: exame de sangue a fresco, PCR: reação em cadeia da polimerase, ELISA: “enzyme-linked-immunosorbent-assay”, qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa, d.p.t: dia pós-tratamento, PAR: parasitemia, PPP: período pré-patente, PP: período patente, PMP: pico máximo de parasitemia, DPMP: dia do pico máximo de parasitemia. Volume de administração de 0,2 mL.

#### 4.4. Tratamento da Fase Crônica

Oito grupos de 10 animais foram inoculados por via intraperitoneal com 500 formas tripomastigotas sanguíneas/animal de cada cepa de *T. cruzi*, quantificados segundo Brener (1962). Quatro grupos foram inoculados com a cepa Y e, os outros quatro grupos com a cepa

VL-10. O tratamento foi iniciado 90 dias pós-infecção em animais infectados com ambas as cepas de *T. cruzi* e realizado diariamente durante 20 dias consecutivos. Os grupos tratados foram avaliados comparativamente aos seus respectivos grupos infectados não tratados, conforme demonstrado no **Delineamento Experimental 2 (Figura 6)**.



**Figura 6:** Delineamento experimental da avaliação da eficácia terapêutica de licnofolida livre administrada por via oral em camundongos infectados com as cepas Y e VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados durante a fase crônica da infecção com: LIC-livre (Licnofolida não encapsulada) nas doses de 5,0 mg/kg/dia (Cepa Y) e 12,0 mg/kg/dia (Cepa VL-10), BZ (benznidazol) na dose 100,0 mg/kg/dia, Grupos controles: INT (controle infectado não tratado), DMA:PEG (controle dos solventes dimetilacetamida: polietilenoglicol 300).

TS: tripomastigota sanguíneo, IP: intraperitoneal, TTm: tratamento, V.O.: via oral, d.p.i.: dias pós infecção, ESF: exame de sangue a fresco, PCR: reação em cadeia da polimerase, ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”, qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa, d.p.t: dia pós-tratamento, PAR: parasitemia, PPP: período pré-patente, PP: período patente, PMP: pico máximo de parasitemia, DPMP: dia do pico máximo de parasitemia. Volume de administração de 0,2 mL.

#### **4.2.3. Avaliação de parâmetros biológicos na infecção murina**

A avaliação 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 de acordo com a metodologia de Brener (1962). A contagem dos parasitos nos camundongos inoculados com as cepas Y e VL-10 do *T. cruzi* na fase aguda foi feita a partir do 4º e 9º dias, respectivamente. O ESF foi realizado por todo o período patente e até não serem mais observados parasitos no sangue circulante por pelo menos cinco dias consecutivos o que aconteceu até 30 dias pós-tratamento, ou até a morte dos camundongos. A curva de PAR foi plotada utilizando a média diária da PAR dos animais de cada grupo experimental. A partir da curva de parasitemia os parâmetros período pré-patente (PPP), período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PM) e dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) foram também determinados.

##### **4.2.3.1. Sobrevida dos animais:**

A sobrevida dos animais foi avaliada diariamente até 180º dias após infecção e expressa em porcentagem cumulativa.

#### **4.2.4. Análise estatística**

A PAR foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O período pré-patente (PPP), pico máximo de parasitemia (PM) e dia do pico máximo de parasitemia (DPMP) foram analisados pelo teste ANOVA Oneway, seguido do teste de Newman-Keuls. Em alguns casos, quando a variância foi heterogênea, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A sobrevida dos animais foi expressa em porcentagem cumulativa. A análise de sobrevida dos grupos experimentais foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier log rank. As diferenças foram consideradas como significativas quando  $P < 0,05$ .

#### **4.2.5. Controle de cura:**

O controle de cura dos animais tratados foi realizado no Laboratório de doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), empregando os seguintes testes:

#### 4.2.5.1. Exame de Sangue a Fresco (ESF)

O exame de sangue a fresco foi empregado para a confirmação da infecção a partir do 4º dia pós-inoculação (cepa Y) e do 7º dia pós-inoculação (VL-10) na fase aguda da infecção. Já na fase crônica da infecção a avaliação para confirmação da infecção iniciou-se no 20º dia (cepa Y) e ocorreu até o 30º dia pós-infecção (cepa VL-10).

#### 4.2.5.2. Método parasitológico - Hemocultura (HC).

No 30º dia pós-tratamento foi coletada uma amostra de sangue do plexo orbital dos animais que apresentaram exame de sangue a fresco (ESF) negativo, segundo a técnica descrita por Filardi & Brener (1987). Para isso, foram coletados aproximadamente 0,5 ml de sangue e adicionados à 3,0 ml de meio LIT (*Liver Infusion Triptose*), homogeneizados e incubados à 28 °C. Diariamente, os tubos foram homogeneizados e 30, 60, 90 e 120 dias após a coleta foi feita uma lâmina contendo uma gota da hemocultura para verificar a presença de parasitos em microscópio ótico.

#### 4.2.5.3. Método Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Esta técnica foi realizada em amostra de 0,2 ml de sangue coletado do plexo orbital dos animais 60 e 90 dias após o tratamento e, imediatamente adicionados à 0,4 ml de solução de guanidina (Guanidina-HCl) 6M/ácido etilenodietilnitritotetracético (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 1,5 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 10,0 mM cloridrato de hidroximetilaminometano (Tris-HCl)/pH 9,0, 0,1% de Triton X-100 (Tampão PCR 10x, Invitrogen São Paulo, SP, Brasil), 75,0 mM de cloreto de potássio (KCl - Tampão PCR 10x , Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 3,5 mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub> – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP – Sigma, St. Louis, MO, EUA ), 0,5 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 10,0 pmoles de cada iniciador #121 (AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA) e #122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) descritos por Degraeve *et al.*, (1988). A hipótese de contaminação foi eliminada através da

utilização de um controle negativo da reação e da extração, bem como um controle de reagentes da extração e da PCR.

A amplificação 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 min, seguida pelo anelamento a 65 °C por 1 min e etapa final de extensão a 72 °C por 1 min; seguidos de 33 ciclos com temperatura de extensão de 95 °C por 1 min, uma etapa de anelamento de 65°C por 1 min e uma etapa final de extensão a 72 °C, 1 min; um último ciclo com temperatura de extensão de 95 °C por 1 min, uma etapa de anelamento a 65 °C por 1 min e uma etapa final de extensão por 10 min. 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 (as amostras negativas foram submetidas à amplificação do gene TNF- $\alpha$ ).

#### 4.2.5.4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

A reação de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* foi realizada segundo a metodologia de Voller *et al.* (1975) modificada e padronizada no Laboratório de Doença de Chagas da UFOP segundo Santos *et al.* (2012). Para a realização da reação foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com 100,0  $\mu$ l/poço de antígeno (5,0  $\mu$ g/mL) diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas “overnight” em geladeira (4° C).

Após o período de incubação as placas foram lavadas quatro vezes com solução salina contendo Tween-20 a 0,05% (solução de lavagem) para eliminação da solução diluente do antígeno e de seu excesso. As placas foram bloqueadas com 100,0  $\mu$ L/poço de solução salina tamponada (PBS) com soro fetal bovino (SFB) na diluição 1:20 e incubadas a 37 °C, por 30 minutos. Após esta etapa elas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem. A seguir as placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C com 100,0  $\mu$ L/poço das amostras de soros diluídas a 1:80. Após a incubação elas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos a 37 °C com 100,0  $\mu$ L/poço do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase diluído a 1:2000 (SIGMA, St. Louis, EUA) e diluído em solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween). Após a incubação as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem e adicionadas de 100,0  $\mu$ L/poço de solução substrato constituída por 2,0 mg de

orto-fenileno-diamino (OPD), 2,0  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (volume 30) e 15,0 mL tampão citrato-fosfato e a seguir incubadas a 37 °C durante 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 100,0  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M.

A leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (Bio-Rad Model 680 - microplate manager 5.2.1) com filtro a 490 nm. Amostras contendo valores de absorbância superiores ao ponto de corte (média das absorbâncias de 10 soros padrões não reativos + 2 vezes o desvio padrão) foram consideradas reativas, e as que apresentaram valores de absorbância abaixo do ponto de corte foram consideradas não reativas. Todas as amostras foram testadas em duplicata, sendo o valor final da absorbância a média da leitura das duplicatas.

#### **4.2.6. Critério de cura**

Seguindo o critério de cura clássico empregado para humanos (MS, 2005) a susceptibilidade ou resistência aos tratamentos foi definida de acordo com os resultados obtidos pelo conjunto de métodos parasitológicos e sorológicos. Foram considerados curados aqueles animais que apresentaram simultaneamente negatividade em todos os testes parasitológicos (ESF, HC), moleculares (PCR, qPCR tecidual) e sorológico (ELISA).

Um índice de cura parasitológica foi calculado para cada grupo de infecção experimental e em cada esquema de tratamento empregado, considerando a porcentagem dos animais tratados curados. Uma vez determinados os índices de cura, as cepas de *T. cruzi* estudados foram classificados segundo o critério de Filardi & Brener (1987) modificado por Toledo *et al.* (2003) em: resistentes (índice de cura  $\leq 33$  %), parcialmente resistentes ( $33$  % < índice de cura <  $66$  %) e susceptíveis (índice de cura  $\geq 66$  %) ao esquema de tratamento empregado.

#### **4.2.7. Avaliação do parasitismo tecidual (coração)**

Para a quantificação do parasitismo tecidual no coração de animais infectados com cepas de *T. cruzi* de distintos perfis de resistência ao tratamento (Cepas Y e VL-10) nas fases aguda e crônica da infecção a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi utilizada. Todos os animais que sobreviveram até seis meses pós-tratamento foram necropsiados e os órgãos retirados para esta avaliação. Além destes materiais colhidos, também foram analisados corações de animais infectados com cepas de *T. cruzi* de distintos perfis de resistência ao tratamento tratados nas fases aguda e crônica da infecção com formulações de nanocápsulas poliméricas de PCL e PLAPEG contendo LIC originárias da tese

de doutorado (Branquinho, 2014) cedidas pela Dra. Renata Tupinambá Branquinho devidamente conservados à -80 °C.

#### 4.2.7.1. Método Molecular - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

O protocolo padronizado por Caldas (2011) 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, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 25-30 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 Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e com a adição de 20,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20,0 mg/ml. Para realizar a quantificação do parasitismo tecidual em coração de camundongos por qPCR, fez-se necessário construir uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito existente na amostra a ser analisada. Utilizou-se formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura (LIT), até atingir o número total de  $1,0 \times 10^8$  parasitos contados em câmara de Neubauer, os quais foram submetidos ao protocolo de extração de DNA utilizando o kit Wizard™ Genomic DNA Purification (Promega) seguindo todas as recomendações do fabricante, com a adição de 20,0 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA na concentração de 20,0 mg/ml (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). Cada amostra foi analisada 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 7,0 µL de “SYBR Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems). 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'; amplificando um produto de 182 pb (Cummings e Tarleton, 2006). Separadamente para cada amostra, foi também realizada uma reação para dosar o fator alfa de necrose tumoral murino-específico (TNF- $\alpha$ ), utilizado como controle endógeno contendo 3,0 µL da amostra extraída, 30,0 ng de DNA genômico e 7,0 µL de “SYBR Green PCR Mastermix” (Applied Biosystems). Os iniciadores para o TNF- $\alpha$  foram: TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3', e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCATAGCACTTAGACCCC-3' - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; amplificando um produto de 170 pb (Cummings e Tarleton, 2006). Cada placa de reação de 96 poços continha a curva padrão, 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 ultra-pura autoclada (1:10) para obter os pontos da curva, que foi medida a partir de DNA equivalente a  $1,0 \times 10^6$  até de um parasito. A placa continha controles negativos que foram submetidos à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* e TNF- $\alpha$  de camundongo. Também foram utilizados como controle negativo da reação poços com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata (duplicata para *T. cruzi* e unicata para TNF- $\alpha$ ). As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml, MicroAmp™). O programa de termociclagem consistiu em aquecimento a 95 °C por 10min, 40 ciclos: 94 °C por 15 segundos e 64,0 °C por 1 minuto. A amplificação foi seguida por um programa de “melting” com desnaturação inicial a 95 °C por 15 segundos, resfriamento a 60 °C por 1 minuto e aumento gradual da temperatura de 0,3 °C/s até 95 °C.

## 5. Resultados

### 5.1. Formulação de NC-PLAPEG

Foram produzidas três (1 – 3) formulações de NC com o polímero PLAPEG sem LIC (nanocápsula branca –NC-Br) e três (4 – 6) formulações de NC com o polímero PLAPEG contendo LIC (NC-PLAPEG-LIC) 2,0 mg/mL, uma a cada sete dias. Os parâmetros físico-químicos de tamanho médio de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram avaliados no dia em cada uma destas formulações foram produzidas. A determinação dos valores destes parâmetros foi realizada em triplicatas e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Parâmetros físico-químicos de formulações de nanocápsulas de polímero PLAPEG contendo licnofolida na concentração de 2,0 mg/mL produzidas para estudos *in vivo*.

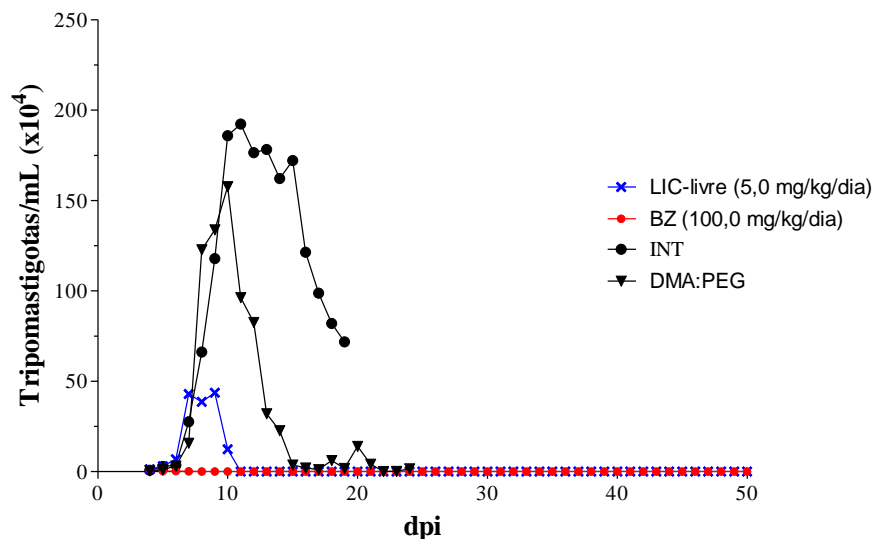
Formulação	Concentração LIC (g/mL)	Tamanho médio ± DP (nm)	Índice de polidispersão ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP
1	0,0	109,4 ± 7,1	0,080 ± 0,01	-30,3 ± 4,1
2	0,0	110,2 ± 6,3	0,099 ± 0,09	-33,1 ± 5,9
3	0,0	102,8 ± 8,0	0,101 ± 0,03	-31,7 ± 4,6
4	2,0	100,9 ± 7,4	0,112 ± 0,08	-40,2 ± 4,3
5	2,0	106,1 ± 6,3	0,105 ± 0,05	-41,6 ± 5,7
6	2,0	107,3 ± 5,2	0,109 ± 0,04	-36,1 ± 6,2

DP: Desvio padrão (n=3); Potencial Zeta medido após diluição em solução 1,0 mM de NaCl.

### 5.2. Avaliação da eficácia terapêutica dos tratamentos com licnofolida livre ou encapsulada em camundongos infectados

#### 5.2.1. Curva de parasitemia, parâmetros biológicos da curva de parasitemia, eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados pela cepa Y e tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase aguda.

A comparação da área sob a curva da parasitemia (ASC) entre o grupo de camundongos infectados com a cepa Y tratados com LIC-livre administrada na dose de 5,0 mg/kg/dia apresentaram ASC significativamente maior ( $2,41 \pm 0,33$ ) que o observado no grupo tratado com BZ administrado na dose de 100,0 mg/kg/dia [ $(0,03 \pm 0,01)$  ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7**)] e significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em comparação aos grupos controles INT e DMA:PEG ( $101,4 \pm 38,32$  e  $42,87 \pm 6,43$ , respectivamente).



**Figura 7:** Curvas de parasitemia média de camundongos Swiss experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneas das cepas Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

LIC-livre (5,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com licnofolida na forma livre na dose de 5,0 mg por quilograma de peso por dia; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com Benznidazol na dose de 100,0 mg por quilograma de peso por dia. INT: grupo controle infectado não tratado; DMA:PEG: grupo controle infectado tratado com dimetilacetamida + polietilenoglicol (solventes); dpi: dia pós-infecção.

O PP do grupo de animais infectados com a cepa Y e tratados com LIC-livre ( $14,13 \pm 3,99$ ) e controles INT e DMA:PEG ( $13,25 \pm 2,50$  e  $15,0 \pm 2,39$ , respectivamente) foram semelhantes, sendo observada redução significativa do PP no grupo tratado com BZ ( $1,87 \pm 0,35$ ) em relação ao observado com LIC-livre [( $p < 0,05$ ) (**Tabela 2**)]. Quando o PMP foi avaliado foi observada redução significativa do PMP no grupo tratado com LIC-livre ( $56,0 \pm 2,83$ ) quando comparado com os grupos controles INT e DMA:PEG ( $249,3 \pm 67,93$  e  $168,5 \pm 33,08$ , respectivamente), porém os valores de parasitemia foram estatisticamente mais elevados do que o observado no grupo tratado com BZ [( $p < 0,05$ ) (**Tabela 2**)]. Ainda foi observada redução significativa no DPMP no grupo de animais tratados com BZ ( $4,87 \pm 1,13$ ), em comparação aos demais grupos experimentais. O tratamento com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) alterou os parâmetros biológicos da infecção pela cepa Y durante a fase aguda, sendo significativa a redução dos valores das variáveis mencionadas (PP, PMP e DPMP) quando comparados aos grupos controles (INT e DMA:PEG). A LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) apresentou valores de parasitemia e dos parâmetros PP, PMP e DPMP semelhantes ou estatisticamente maiores do que os observados nos grupos de animais tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia).

**Tabela 2:** Parâmetros biológicos avaliados por exame de sangue a fresco durante o tratamento e 30 dias após em camundongos experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral durante a fase aguda da infecção durante 20 dias consecutivos.

Infeção	Via administração	Grupos experimentais	Doses (mg/kg/dia)	ASC ( $\times 10^4$ ) ± DP	PP (dias) ± DP	PMP ( $\times 10^4$ ) ± DP	DPMP (dias) ± DP
Aguda (Cepa Y)	Oral	LIC-livre	5,0	2,41 ± 0,33*	14,13 ± 3,99	56,0 ± 2,83*	7,87 ± 0,99
		BZ	100,0	0,03 ± 0,01* <sup>+</sup>	1,87 ± 0,35	1,12 ± 0,52* <sup>+</sup>	4,87 ± 1,13
		INT	-	101,4 ± 38,32	13,25 ± 2,50	249,3 ± 67,93	13,13 ± 2,85
		DMA:PEG	ø	42,87 ± 6,43	15,0 ± 2,39	168,5 ± 33,08	10,0 ± 2,26

ASC: área sob a curva; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; DP: desvio padrão; LIC-livre: grupo de animais infectados tratados com licnofolida na forma livre; BZ: grupo de animais infectados tratados com Benznidazol; INT: grupo controle de animais infectado não tratado; DMA-PEG: grupo controle de animais infectado tratado com dimetilacetamida + polietilenoglicol (solventes); \*, <sup>+</sup>: diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

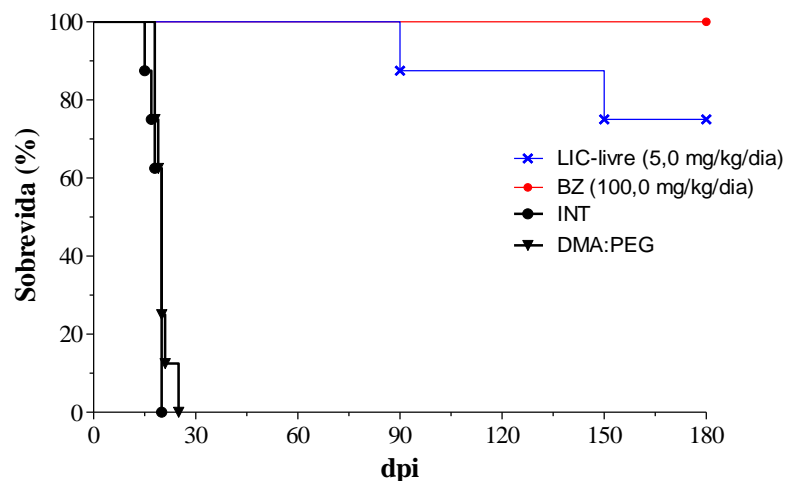
A HC revelou a taxa de negatificação em 68,8% (11/16) dos camundongos. A negatificação foi menor no grupo de animais tratados com LIC-livre (18,8% - 3/16) do que no grupo tratado com BZ (50,0% - 8/16) e sendo esta diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 3**). A avaliação do tratamento pela técnica de PCR revelou negatificação global em 71,5% (10/14) dos animais, menos acentuada no grupo tratado com LIC-livre (28,6% - 4/14) do que no grupo tratado com BZ (42,9 - 6/14) (**Tabela 3**). O teste de ELISA revelou 35,8% (5/14) de amostras não reativas, sendo todas observadas em camundongos do grupo tratado com BZ (**Tabela 3**). O conjunto dos resultados obtidos com as três técnicas revelou cura em 35,8% (5/14) dos camundongos que sobreviveram à fase aguda, porém nenhum (0,0% - 0/6) camundongo tratado com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) e dos grupos controle curou. A cura só foi observada em camundongos tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) numa taxa de 62,5% (5/8) dos animais (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Sobrevida e eficácia terapêutica de camundongos experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral durante 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

Infecção	Via de administração	Grupos Experimentais	Doses (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)				Cura (%)
					ESF	HC <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	ELISA <sup>3</sup>	
Aguda (Cepa Y)	Oral	LIC-livre	5,0	75,0 (6/8)	75,0 (6/8)	37,5 (3/8)	66,7 (4/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
		BZ	100,0	100,0 (8/8)	87,5 (7/8)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	62,5 (5/8)	62,5 (5/8)
		INT	-	0 (0/8)	0 (0/8)	-	-	-	0 (0/8)
		DMA:PEG	0	0 (0/8)	0 (0/8)	-	-	-	0 (0/8)

ESF: exame de sangue a fresco; HC: hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; LIC-livre grupo infectado tratado com licnofolida na forma livre; BZ: grupo de animais infectados tratados com Benznidazol; INT: grupo controle de animais infectados não tratados; DMA:PEG: grupo controle de animais tratados com solventes utilizados para solubilização de licnofolida.

A sobrevida dos animais infectados com a cepa Y apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados (LIC-livre 5,0 mg/kg/dia e BZ 100,0 mg/kg/dia) e controles (INT e DMA:PEG) (**Tabela 3**). Os animais infectados e tratados com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) apresentaram 75,0% (6/8) de sobrevida enquanto todos os animais (100,0% - 8/8) tratados com BZ (100,0mg/kg/dia) sobreviveram. Nenhum animal dos grupos controles (INT e DMA:PEG) sobreviveu à fase aguda da infecção e apresentaram tempo médio de sobrevida de apenas 19 dias (**Figura 8**).



**Figura 8:** Gráfico de sobrevivência de camundongos Swiss experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

LIC-livre (5,0 mg/kg/dia): grupo infectado tratado com licnofolida na forma livre na dose de 5,0mg por quilograma de peso por dia; 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; DMA-PEG: grupo controle infectado tratado com dimetilacetamida + polietilenoglicol (solventes); dpi: dia pós-infecção

O tratamento de camundongos experimentalmente infectados com a cepa Y com LIC-livre por via oral durante a fase aguda da infecção foi capaz de apresentar redução da parasitemia e aumentar a sobrevivência em comparação aos grupos controles, porém não foi capaz de promover a cura dos animais.

### 5.2.2. Eficácia terapêutica e sobrevivência de animais infectados pela cepa Y tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase crônica.

A percentagem global de negatividade na hemocultura em todos os animais tratados foi de 13,3% (4/30) e mais acentuada no grupo de animais tratados com LIC-livre (37,5% - 3/8). A técnica de PCR revelou negatividade em 20,0% (3/15) das amostras de animais tratados avaliadas, sendo também mais negativa no grupo tratado com LIC-livre (28,6% - 2/7) (**Tabela 4**). O teste de ELISA revelou que todos os animais apresentaram amostra de soro reativa (**Tabela 4**). A partir dos dados obtidos com os três testes realizados para avaliação da eficácia terapêutica (HC, PCR e ELISA) foi observada redução da parasitemia nos animais tratados com LIC-livre, mesmo não sendo observada cura em nenhum grupo quando o critério de cura clássico foi adotado (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Sobrevida e eficácia terapêutica de camundongos experimentalmente infectados com 500 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral durante a fase crônica da infecção.

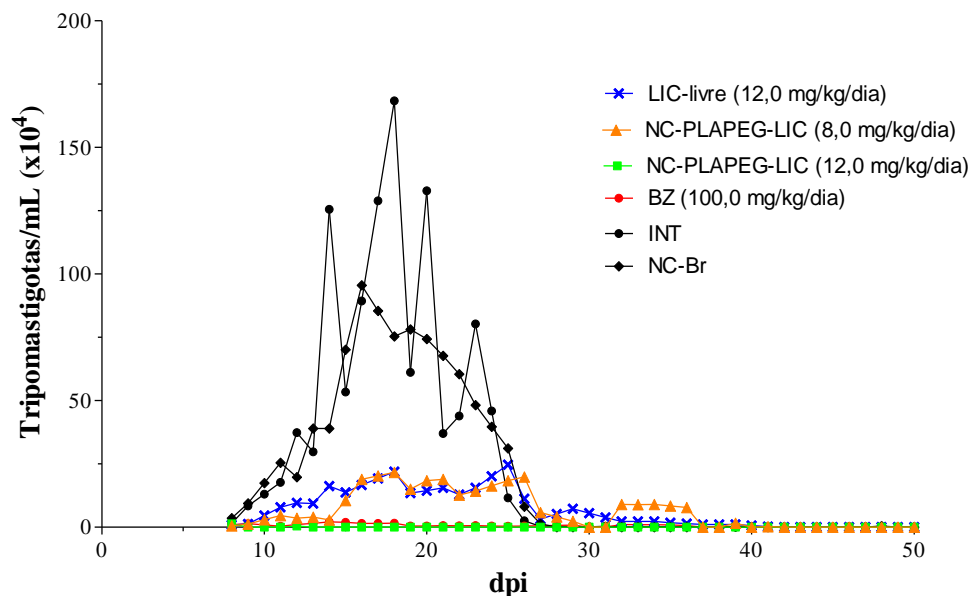
Infecção	Via de administração	Grupos Experimentais	Doses (mg/kg/day)	Sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)			Cura (%)
					HC <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	ELISA <sup>3</sup>	
Crônica (Cepa Y)	Oral	LIC-livre	5,0	70,0 (7/10)	37,5 (3/8)	28,6 (2/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
		BZ	100,0	80,0 (8/10)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
		INT	-	70,0 (7/10)	0 (0/7)	-	0 (0/7)	0 (0/7)
		DMA:PEG	0	70,0 (8/10)	0 (0/7)	-	0 (0/7)	0 (0/7)

HC: hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; LIC-livre: grupo infectado tratado com licnofolida na forma livre; BZ: grupo de animais infectados tratados com Benznidazol; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; DMA:PEG: grupo de animais controle tratados com solventes utilizados para solubilização de licnofolida; .

As taxas de sobrevida dos animais tratados foram as seguintes: 70,0% (7/10) no grupo de animais tratados com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia), 80,0% (8/10) nos tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) e 70,0% (7/10) nos grupos controle INT e DMA:PEG (**Tabela 4**).

### 5.2.3. Curva de parasitemia, parâmetros biológicos da curva de parasitemia, eficácia terapêutica e sobrevida de animais infectados com a cepa VL-10 e tratados com licnofolida livre e formulações de nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida por via oral durante a fase aguda.

Os animais dos grupos infectados e tratados com LIC-livre na dose de 12,0 mg/kg/dia, NC-PLAPEG-LIC na dose de 8,0 mg/kg/dia e BZ na dose de 100,0 mg/kg/dia apresentaram área sob a curva de parasitemia semelhantes entre si ( $5,66 \pm 3,11$ ,  $5,54 \pm 6,81$  e  $0,55 \pm 0,26$ , respectivamente), com redução significativa da parasitemia em relação aos grupos controles INT e NC-Br [ $(21,83 \pm 13,04$  e  $17,45 \pm 3,73$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 9**)]. O grupo tratado com NC-PLAPEG-LIC na dose de 12,0 mg/kg/dia apresentou redução significativa da área sob curva da parasitemia ( $0,04 \pm 0,02$ ) média em comparação a todos os demais grupos infectados [(LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC, BZ, INT e NC-Br) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 9**)].



**Figura 9:** Curvas de parasitemia média observadas em camundongos Swiss experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneas da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção com diferentes formulações contendo licnofolida.

LIC-livre (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com licnofolida na forma livre, dose de 12,0 mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 8,0 mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratado com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 12,0 mg por quilograma de peso por dia; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com Benznidazol na dose de 100,0 mg por quilograma de peso por dia; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; NC-Br: grupo de animais controle infectados e tratados com nanocápsulas brancas (sem licnofolida); dpi: dias pós infecção.

A avaliação do parâmetro PMP mostrou uma redução significativa nos animais tratados com LIC-livre ( $34,34 \pm 24,74$ ) em comparação aos grupos controles INT e NC-Br ( $287,0 \pm 96,19$  e  $126,7 \pm 41,69$ , respectivamente). Os animais tratados com LIC-livre mostraram PMP ( $34,34 \pm 24,74$ ) semelhante ao grupo de animais tratado com NC-PLAPEG-LIC 8,0 mg/kg/dia ( $40,68 \pm 14,67$ ), porém significativamente maior ao observado nos grupos tratados com NC-PLAPEG-LIC 12,0 mg/kg/dia e BZ [ $1,15 \pm 1,18$  e  $3,02 \pm 2,31$ , respectivamente] ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5)]. A avaliação dos parâmetros biológicos a partir da curva de parasitemia obtida mostrou que os grupos infectados e tratados com NC-PLAPEG-LIC nas doses de 8,0 mg/kg/dia e 12 mg/kg/dia apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) do PP ( $20,13 \pm 2,62$  e  $1,0 \pm 0,00$ ,



respectivamente) em relação aos demais grupos LIC-livre, BZ e INT e NC-Br ( $29,88 \pm 4,99$ ,  $31,0 \pm 8,81$ ,  $25,57 \pm 3,05$  e  $25,38 \pm 8,12$ , respectivamente) sendo estes semelhantes entre si (**Tabela 5**). Os animais infectados e tratados com NC-PLAPEG-LIC na dose de 12,0 mg/kg/dia apresentaram PP ( $1,0 \pm 0,00$ ) estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao observado no grupo tratado com NC-PLAPEG-LIC na dose de 8,0 mg/kg/dia [ $(20,13 \pm 2,62)$  (**Tabela 5**)]. Os resultados de PMP obtidos no grupo tratado com NC-PLAPEG-LIC 12,0 mg/kg/dia ( $1,15 \pm 1,18$ ) foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que os demais grupos LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia) BZ, INT e NC-Br ( $34,34 \pm 24,74$ ,  $40,68 \pm 14,67$ ,  $3,02 \pm 2,31$ ,  $287,9 \pm 96,19$  e  $126,7 \pm 41,69$ , respectivamente), o que também foi observado na avaliação do parâmetro de DPMP [ $(p < 0,05)$  (**Tabela 5**)]. O tratamento com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) promoveu redução significativa dos parâmetros biológicos (ASC e PMP) em comparação aos observados com os grupos controles (INT e NC-Br), porém seus valores foram semelhantes ao observado no grupo de animais tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) e com NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia). A administração da formulação NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) aos animais infectados apresentou maior redução dos mesmos parâmetros biológicos comparados a todos os grupos tratados com as demais formulações e controles.

**Tabela 5:** Parâmetros biológicos avaliados por exame de sangue a fresco durante o tratamento e até 30 dias após o tratamento de camundongos experimentalmente infectados com  $10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados durante a fase aguda da infecção por via oral com diferentes formulações contendo licnofolida.

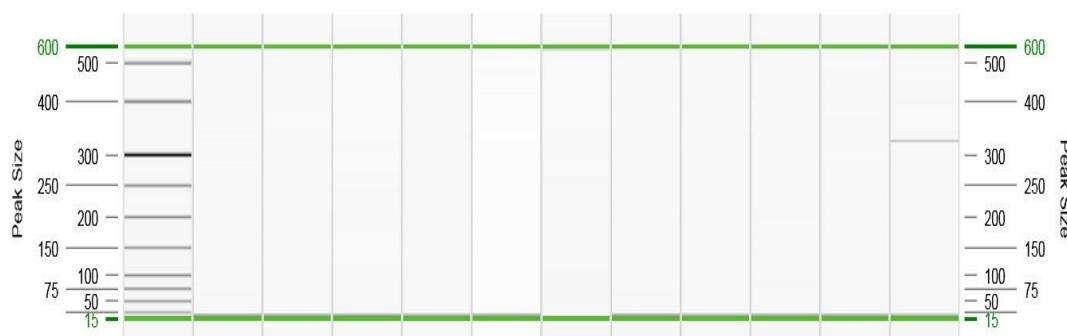
Infeção	Via administração	Grupos experimentais	Doses (mg/kg/dia)	ASC ( $\times 10^4$ ) $\pm$ DP	PP (dias) $\pm$ DP	PMP ( $\times 10^4$ ) $\pm$ DP	DPMP (dias) $\pm$ DP
Aguda (Cepa VL-10)	Oral	LIC-livre	12,0	$5,66 \pm 3,11^*$	$29,88 \pm 4,99$	$34,34 \pm 24,74^*$	$20,38 \pm 5,85$
		NC-PLAPEG-LIC	8,0	$5,54 \pm 6,81^*$	$20,13 \pm 2,62^*$	$40,68 \pm 14,67^*$	$21,74 \pm 7,37$
		NC-PLAPEG-LIC	12,0	$0,04 \pm 0,02^{*+}$	$1,0 \pm 0,00^{*+}$	$1,15 \pm 1,18^{*+}$	$8,00 \pm 0,00^*$
		BZ	100,0	$0,55 \pm 0,26^*$	$31,0 \pm 8,81$	$3,02 \pm 2,31^*$	$22,5 \pm 10,38$
		INT	-	$21,83 \pm 13,04$	$25,57 \pm 3,05$	$287,9 \pm 96,19$	$18,57 \pm 2,76$
		NC-Br	0	$17,45 \pm 3,73$	$25,38 \pm 8,12$	$126,7 \pm 41,69$	$18,63 \pm 3,06$

ASC: área sob a curva; PP: período patente; PMP: pico máximo de parasitemia; DPMP: dia do pico máximo de parasitemia; DP: desvio padrão; diferença estatística ( $p < 0,05$ ); LIC-livre (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com licnofolida na forma livre na dose de 12,0 mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 8,0 mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 12,0 mg por quilograma de peso por dia; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com Benznidazol na dose de 100,0 mg por quilograma de peso por dia; INT:

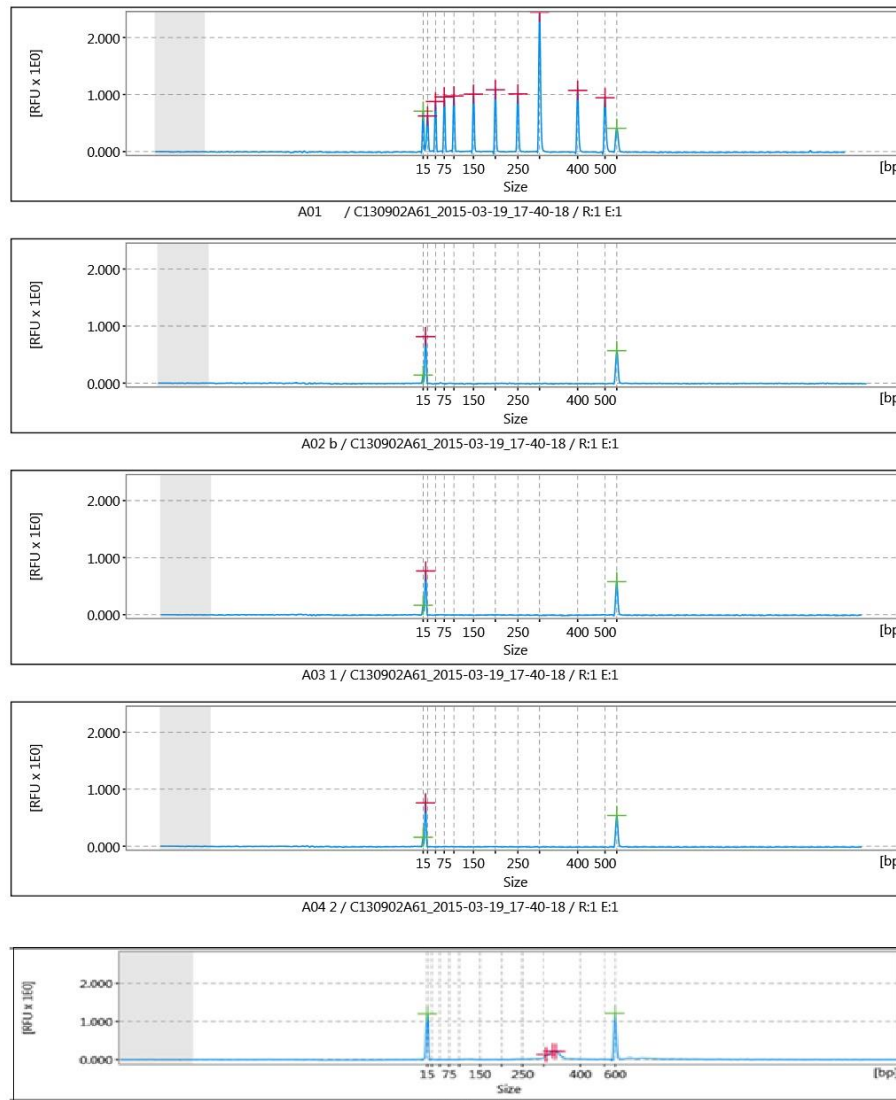
grupo de animais controle infectados não tratados; NC-Br: grupo de animais controle infectados e tratados com nanocápsulas brancas (sem licnofolida) .

Apenas os animais que apresentaram exame de sangue a fresco negativo tiveram amostras coletadas para a realização das técnicas de HC e PCR, sendo então três animais do grupo NC-PLAPEG-LIC 8,0 mg/kg/dia e todos (8/8) do grupo NC-PLAPEG-LIC 12,0 mg/kg/dia.

Todos (100,0% - 11/11) os animais avaliados pela técnica de HC apresentaram resultados negativos nas quatro leituras realizadas (30, 60, 90 e 120 dias pós coleta) (**Tabela 6**). A PCR foi realizada apenas nos animais experimentalmente infectados com a cepa VL-10 que apresentaram exame de sangue a fresco negativo entre 20-30 dias pós-tratamento e HC negativa. Todos (100,0% - 11/11) os animais apresentaram resultados negativos nas avaliações realizadas nas duas amostras coletadas para PCR (60 e 90 dias pós tratamento) (**Tabela 6**). A **Figura 10** representa um gel eletrônico com os resultados obtidos e a **Figura 11** o eletrofenograma da separação do material amplificado.



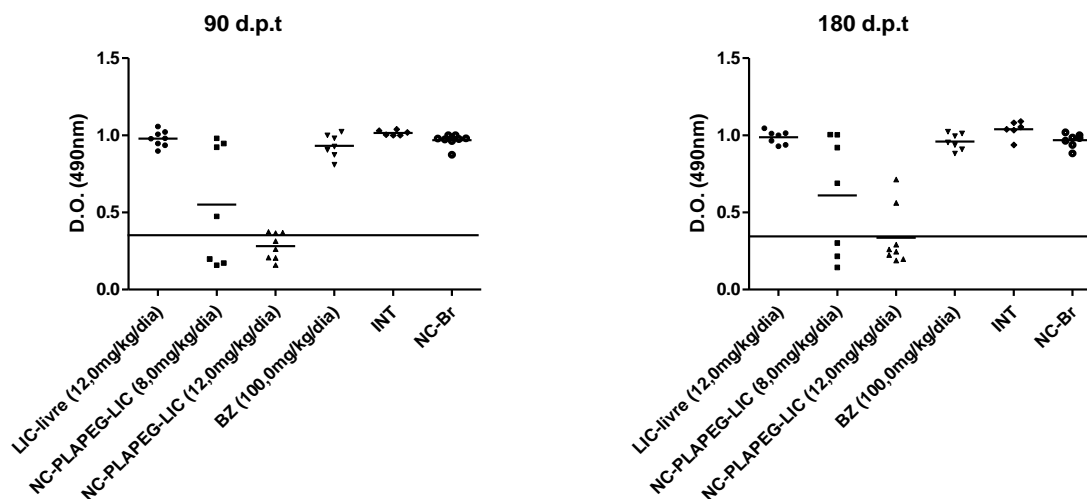
**Figura 10:** Gel eletrônico apresentando os produtos amplificados de amostras de DNA extraídas do sangue de camundongos infectados com a cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados por 20 dias consecutivos por via oral durante a fase aguda da infecção.



**Figura 11:** Eletrofenograma demonstrativo das primeiras cinco amostras existentes no gel eletrônico de animais experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral durante a fase aguda da infecção, demarcando em vermelho no último quadro o pico de 330 pb, característico do KDNA do *Trypanosoma cruzi*.

A densidade ótica medida relacionada à concentração de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* nas amostras coletadas 90 e 180 dias pós-tratamento (d.p.t) dos animais infectados com a cepa VL-10 de *T. cruzi* tratados por via oral durante a fase aguda estão demonstradas na (**Figura 12**). Todas as amostras dos animais dos grupos tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e BZ (100,0 mg/kg/dia) e dos animais dos grupos controles INT e NC-Br e foram reativas (**Figura 12**). As amostras de três animais do grupo NC-PLAPEG-LIC 8,0 mg/kg/dia foram não reativas em ambas as coletas (**Figura 12**). Em relação ao grupo NC-PLAPEG-LIC 12,0 mg/kg/dia, as

amostras de cinco animais foram não reativas na coleta de 90 d.p.t, e seis amostras passaram a ser não reativas na coleta de 180 d.p.t. (**Figura 12**).



**Figura 12:** Leitura da densidade ótica (absorbância) e gráficos de dispersão relativa à sorologia convencional (ELISA) em amostras de soro dos animais infectados com a cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda da infecção.

LIC-livre (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com licnofolida na forma livre na dose de 12,0mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 8,0 mg por quilograma de peso por dia; NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida na dose de 12,0 mg por quilograma de peso por dia; BZ (100,0 mg/kg/dia): grupo de animais infectados e tratados com Benznidazol na dose de 100,0 mg por quilograma de peso por dia; INT: grupo de animais controle infectados não tratados; NC-Br: grupo de animais controle infectados e tratado com nanocápsulas brancas (sem licnofolida); dpt: dias pós tratamento; D.O.: densidade ótica.

A avaliação dos resultados obtidos no ESF, HC, PCR e ELISA do tratamento com as diferentes formulações revelou cura global de 19,2% (9/47). Foram obtidas taxas de cura de 37,5% (3/8) e 75,0% (6/8) nos grupos de animais infectados com a cepa VL-10 e tratados por via oral com as formulações NC-PLAPEG-LIC nas doses de 8,0 mg/kg/dia e 12,0 mg/kg/dia, respectivamente (**Tabela 6**), revelando resultado dose efeito. Nenhum animal (0%) tratado com BZ (100,0 mg/kg/dia), LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e controles (INT e NC-Br) apresentou cura considerando o resultado conjunto de todas as avaliações acima mencionadas (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Resultado da avaliação pós-tratamento dos camundongos experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por 20 dias consecutivos por via oral durante a fase aguda da infecção.

Infecção	Via de administração	Grupos Experimentais	Doses (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)				Cura (%)
					ESF	HC <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	ELISA <sup>3</sup>	
Aguda (Cepa VL-10)	Oral	LIC-livre	12,0	87,5 (7/8)	0 (0/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)
		NC-PLAPEG-LIC	8,0	87,5 (7/8)	62,5 (5/8)	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	42,8 (3/7)	37,5 (3/8)
		NC-PLAPEG-LIC	12,0	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	75,0 (6/8)
		BZ	100,0	87,5 (7/8)	0 (0/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)
		INT	-	85,7 (6/7)	0 (0/7)	-	-	0 (0/7)	0 (0/7)
		NC-Br	0	87,5 (7/8)	0 (0/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)

ESF: exame de sangue a fresco; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; LIC-livre: grupo de animais infectados e tratados com licnofolida na forma livre; NC-PLAPEG-LIC: grupo de animais infectados e tratados com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida; BZ: grupo de animais infectados e tratados com Benznidazol; INT: grupo de animais controle infectados não tratado; NC-Br: grupo de animais controle infectados e tratado com nanocápsulas brancas (sem licnofolida).

A sobrevida dos animais experimentalmente infectados com a cepa VL-10 e tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia), BZ (100,0 mg/kg/dia) e controles (INT e DMA-PEG) administrados por via oral foi de 87,2% (34/39) até a realização da necropsia (180 d.p.t), sendo observada a morte de um camundongo em cada grupo experimental (**Tabela 6**) Todos (100,0% - 8/8) os animais do grupos tratado com NC-PLAPEG-LIC (12,0mg/kg/dia) sobreviveram até a realização da necropsia (180d.p.t.) (**Tabela 6**).

#### 5.2.4. Eficácia terapêutica e sobrevida de animais infectados pela cepa VL-10 tratados com licnofolida livre por via oral durante a fase crônica

Todas as amostras de HC coletadas foram negativas em todas as leituras realizadas, exceto as do grupo de animais tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) que apresentou negatividade de 14,3% (1/8) (**Tabela 7**). Os resultados obtidos com a técnica de PCR demonstrou negatividade em 62,1% (18/29) das amostras avaliadas, com negatividade de 57,1% (4/7) nos animais tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), de 75,0% (6/8) nos animais tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) e de 50,0% (3/6) e 71,0% (5/7) nos animais dos grupos controles INT e DMA:PEG, respectivamente (**Tabela 7**). O teste de ELISA revelou que todos os animais

apresentaram amostra de soro reativa (**Tabela 7**). A partir dos dados obtidos com os três testes realizados para avaliação de eficácia terapêutica (HC, PCR e ELISA) não foi observada cura em nenhum (0%) animal dos grupos deste experimento (**Tabela 7**).

**Tabela 7:** Resultado do critério de cura aplicada aos camundongos experimentalmente infectados com 500 tripomastigotas sanguíneos da cepa VL-10 de *Trypanosoma cruzi* e tratados por 20 dias por via oral durante a fase crônica da infecção, utilizando como parâmetros: hemocultura, PCR e ELISA.

Infecção	Via de administração	Grupos Experimentais	Doses (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)			Cura (%)
					HC <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	ELISA <sup>3</sup>	
Crônica (Cepa VL-10)	Oral	BZ	100,0	80,0 (8/10)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
		LIC-livre	12,0	70,0 (7/10)	14,3 (1/8)	57,1 (4/7)	0 (0/7)	0 (0/8)
		INT	-	60,0 (6/10)	100,0 (6/6)	50,0 (3/6)	0 (0/6)	0 (0/7)
		DMA:PEG	0	60,0 (6/10)	100,0 (7/7)	71,0 (5/7)	0 (0/7)	0 (0/8)

HC: hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; LIC-livre: grupo infectado tratado com licnofolida na forma livre; BZ: grupo de animais infectados tratados com Benznidazol; INT: grupo de animais infectados não tratado; DMA:PEG: grupo de animais tratados com solventes utilizados para solubilização de licnofolida.

As taxas de sobrevivência dos animais foram: 70,0% (7/10) de sobrevivência no grupo de animais tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia); 80,0% (8/10) no grupo de animais tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) e 60,0% (6/10) nos grupos de animais controles [(INT e DMA:PEG) (**Tabela 7**)].

### 5.2.5. Avaliação geral da eficácia terapêutica

A **Tabela 8** representa o conjunto de todos resultados obtidos de controle de cura clássico e apresentados nesta dissertação.

**Tabela 8:** Resultados da avaliação pós-tratamento segundo o critério de cura aplicado aos camundongos experimentalmente infectados com  $1,0 \times 10^4$  tripomastigotas sanguíneos das cepas de Ye VL-10 de *Trypanosoma cruzi* tratados por via oral por 20 dias consecutivos durante a fase aguda e crônica da infecção e avaliados por: hemocultura (HC), PCR (polimerase chain reaction) e ELISA (enzyme linked immunosorbent assay);

Cepa	Infecção	Via de administração	Grupos Experimentais	Doses (mg/kg/dia)	Sobrevida (%)	Negativação dos testes laboratoriais (%)			Cura (%)
						HC <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	ELISA <sup>3</sup>	
Y (Tc II)	Aguda	Oral	LIC-livre	5,0	75,0 (6/8)	37,5 (3/8)	66,7 (4/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
			BZ	100,0	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	62,5 (5/8)	62,5 (5/8)
			INT	-	0 (0/8)	-	-	-	0 (0/8)
			DMA:PEG	ø	0 (0/8)	-	-	-	0 (0/8)
	Crônica	Oral	LIC-livre	5,0	70,0 (7/10)	37,5 (3/8)	28,6 (2/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
			BZ	100,0	80,0 (8/10)	12,5 (1/8)	12,5 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
			INT	-	70,0 (7/10)	0 (0/7)	-	0 (0/7)	0 (0/7)
			DMA:PEG	ø	70,0 (8/10)	0 (0/7)	-	0 (0/7)	0 (0/7)
VL-10 (Tc II)	Aguda	Oral	LIC-livre	12,0	87,5 (7/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)
			NC-PLAPEG-LIC	8,0	87,5 (7/8)	100,0 (3/3)	100,0 (3/3)	42,8 (3/7)	37,5 (3/8)
			NC-PLAPEG-LIC	12,0	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	75,0 (6/8)
			BZ	100,0	87,5 (7/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)
			INT	-	85,7 (6/7)	-	-	0 (0/7)	0 (0/7)
	Crônica	Oral	NC-Br	ø	87,5 (7/8)	-	-	0 (0/8)	0 (0/8)
			LIC-livre	12,0	70,0 (7/10)	14,3 (1/8)	57,1 (4/7)	0 (0/7)	0 (0/8)
			BZ	100,0	80,0 (8/10)	100,0 (8/8)	75,0 (6/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
			INT	-	60,0 (6/10)	100,0 (6/6)	50,0 (3/6)	0 (0/6)	0 (0/7)
			NC-Br	ø	60,0 (6/10)	100,0 (7/7)	71,0 (5/7)	0 (0/7)	0 (0/8)

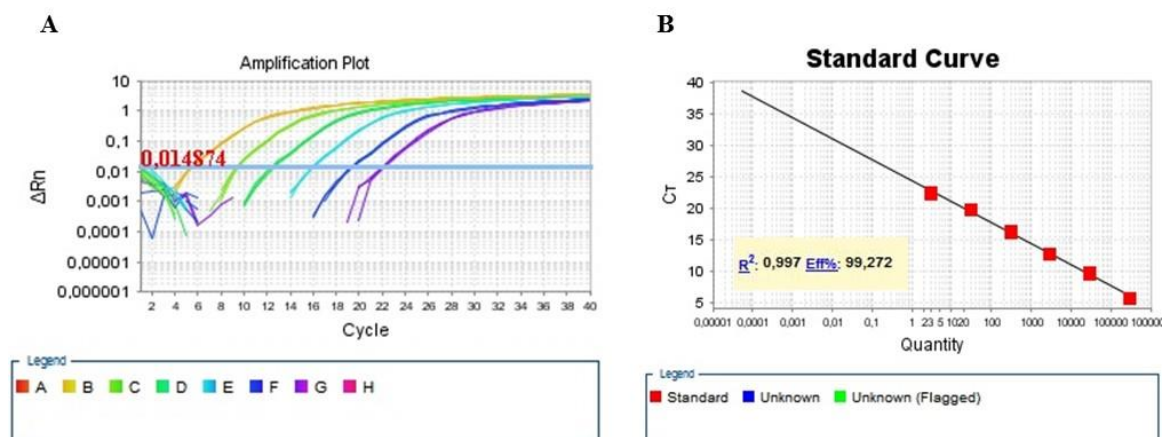
LIC-livre: grupo de animais controle infectado e tratado com licnofolida na forma livre; NC-PLAPEG-LIC: grupo de animais infectada e tratado com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida; BZ: grupo de animais infectado e tratados com Benznidazol; INT: grupo de animais controle infectados e não tratados; DMA:PEG: grupo de animais controle tratados com solventes utilizados para solubilização de licnofolida; NC-Br: grupo de animais controle infectados e tratado com nanocápsulas brancas (sem licnofolida).

### 5.2.6. Avaliação do parasitismo tecidual (coração) por qPCR

#### 5.2.6.1. Curvas padrão

Para a realização da estratégia de PCR para quantificação do parasitismo em tecido cardíaco de animais infectados com as cepas Y e VL-10 e tratados com diferentes formulações contendo LIC gerou-se as curvas padrão para cada placa. A **Figura 13A** ilustra um gráfico de amplificação “ $\Delta Rn$ ” x Ciclo na apresentação logarítmica das seis diluições seriadas utilizadas para determinação da curva padrão. As linhas coloridas representam as curvas de amplificação de DNA do *T. cruzi*. A magnitude do sinal de fluorescência normalizada ( $\Delta Rn$ ) foi calculada a cada ciclo, obtida pela razão entre o “Syber® Green”/ROX (corante) subtraída do baseline - “ $\Delta Rn$ ” =  $Rn$  (ciclo) - *baseline*. O “ $Rn$ ” ou repórter normalizado corresponde ao sinal de fluorescência do corante “Syber® Green” normalizado pelo sinal de fluorescência da referência passiva (corante ROX) existente na mistura da reação de PCR. A *baseline* é ajustada em cada amostra automaticamente durante os estágios iniciais da PCR, quando há poucas variações no sinal. A linha azul claro na horizontal corresponde ao *threshold*, que é ajustado automaticamente ou manualmente, mas quando necessário, para ser considerada a região de crescimento exponencial da amplificação localizada acima do *baseline*.

A **Figura 13B** apresenta uma curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação das seis diluições utilizadas. Os valores da eficiência (E) foram maiores que 97,5% e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foram todos maiores que 0,99 (**Figura 13B**).



**Figura 13:** Curvas representativas de qPCR: A) Gráfico de amplificação ( $\Delta Rn$  x ciclo) do *Trypanosoma cruzi* demonstrando a amplificação de DNA nas seis diluições seriadas utilizadas ( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^0$ ) em escala logarítmica para ajustes do *Threshold* (linha azul). Cada conjunto de linhas coloridas refere-se a um ponto da curva. B) Curva padrão gerada a partir da região linear da curva de amplificação.



5.2.6.2. Avaliação do parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa Y e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase aguda.

Foram avaliadas amostras de coração apenas dos animais dos grupos tratados com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia), NC-PCL-LIC (5,0 mg/kg/dia) e NC-PLAPEG-LIC (5,0 mg/kg/dia) e BZ (100,0 mg/kg/dia). Amostras de animais dos grupos infectados não tratados (controles) não foram coletadas devido à ausência de sobrevivência dos animais.

O nível de parasitismo foi não detectável, não sendo possível determinar o parasitismo nas amostras de coração avaliadas, sendo todas (100,0%) consideradas negativas. Apesar deste fato, todas as amostras amplificaram corretamente o gene endógeno (TNF- $\alpha$ ), o que confirma a correta realização da técnica e permite a afirmação dos dados.

5.2.6.3. Avaliação do parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa Y e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica.

A **Tabela 9** apresenta os resultados obtidos por qPCR nas amostras de coração dos animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados durante a fase crônica da infecção por via oral durante 20 dias consecutivos com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia), NC-PCL-LIC (5,0 mg/kg/dia) e NC-PLAPEG-LIC (5,0 mg/kg/dia) BZ (100,0 mg/kg/dia) e do grupo controle não tratado (INT). Todos os animais dos grupos LIC-livre (5,0mg/kg/dia – 9/9) e NC-PLAPEG-LIC (5,0 mg/kg/dia – (8/8) apresentaram amostras negativas (**Tabela 9**). No grupo de animais tratados com NC-PCL-LIC (5,0 mg/kg/dia) 90,0 (9/10) das amostras foram negativas com média de 1,6 parasitos/mg de tecido (par/mgT) (**Tabela 9**). No grupo tratado com BZ (100,0 mg/kg/dia) 50,0% (4/8) dos animais foram negativos, com média de 178,0 par/mgT (**Tabela 9**). Todos os animais do grupo INT foram positivos, com média de 1496,6 par/mgT, valor estatisticamente superior aos demais grupos (LIC-livre 5.0 mg/kg/dia, NC-PCL-LIC 5,0 mg/kg/dia, NC-PLAPEG-LIC 5,0 mg/kg/dia e BZ 100,0 mg/kg/dia) (**Tabela 9**).

Os dados revelam que mesmo que o tratamento com LIC-livre (5,0mg/kg/dia) não tenha proporcionado cura aos animais infectados com a cepa Y e tratados durante a fase crônica da infecção, levaram à redução do parasitismo no coração. A técnica de qPCR para a avaliação do parasitismo no coração de animais infectados com a cepa Y e tratados durante a fase crônica da infecção com NC-PLAPEG-LIC (5,0 mg/kg/dia) demonstrou ausência do parasito, mesmo naqueles animais considerados não curados pelo critério clássico. Resultado também observado

nos grupos NC-PCL-LIC (5,0 mg/kg/dia) e BZ (100,0 mg/kg/dia), quando comparados com os controles (INT).

**Tabela 9:** Dados laboratoriais de animais infectados de animais infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica.

Cepa	Infecção	Grupo experimental	Dose (mg/kg/dia)	%Cura (critério clássico)	Negativação qPCR (%)	Média Parasitos/mg
Y (TC II)	Crônica	LIC-livre	5,0	0,0 (0/8)	100,0 (8/8)	0,0
		NC-PCL-LIC	5,0	30,0 (3/10)	90,0 (9/10)	1,6
		NC-PLAPEG-LIC	5,0	55,0 (5/9)	100,0 (9/9)	0,0
		BZ	100,0	0,0 (0/8)	50,0 (4/8)	178,0
		Controles	ø	0,0 (0/7)	0,0 (0/7)	1496,6

qPCR: “polymerase chain reaction” quantitativo; LIC-livre: grupo de animais infectado tratado com licnofolida na forma livre; NC-PCL-LIC: grupo de animais infectado tratado com nanocápsulas de PCL contendo licnofolida; NC-PLAPEG-LIC: grupo de animais infectado tratado com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida; BZ: grupo de animais infectado tratado com Benznidazol.

5.2.6.4. Avaliação do parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa VL-10 e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase aguda.

A **Tabela 10** apresenta os resultados obtidos por qPCR nas amostras de coração dos animais infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados durante a fase aguda da infecção por via oral durante 20 dias consecutivos com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia e 12,0 mg/kg/dia), BZ (100,0 mg/kg/dia) e do grupo controle não tratado (INT). Nenhum animal infectado tratado com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), BZ (100,0 mg/kg/dia) e não tratados (INT) foram negativos (**Tabela 10**). Todos os animais do grupo NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia – (8/8) apresentaram amostras negativas, enquanto que 57,1% (4/7) dos animais tratados com NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia) foram negativos (**Tabela 10**).

A avaliação dos resultados dos testes laboratoriais utilizados como parâmetros para definição clássica de cura (HC, PCR e ELISA) frente aos resultados de qPCR demonstraram ausência do parasito nos corações dos animais tratados com NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) frente a cura de 75,0% (6/8) pelo critério clássico (**Tabela 10**). Fato também observado em animais do grupo tratado com NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia), no qual a qPCR demonstrou ausência do parasito no coração de 50,0% (4/8) dos animais frente ao percentual de cura de 37,5% (3/8) pelo critério clássico (**Tabela 10**). Vale ressaltar que os dois animais do grupo NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) e um dos cinco animais do grupo NC-PLAPEG-LIC (8,0

mg/kg/dia) considerados não curados pelo critério clássico apresentaram resultados negativos para HC e PCR, sendo a falha terapêutica confirmada apenas pela ELISA (**Tabela 10**).

**Tabela 10:** Dados laboratoriais de animais infectados de animais infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase aguda.

Cepa	Infecção	Grupo experimental	Dose (mg/kg/dia)	Resultados dos testes laboratoriais			Cura (critério clássico)	Parasitas/ mg tecido	Negativação qPCR	
				HC	PCR	ELISA				
VL-10 (TC II)	Aguda	LIC-livre	12,0	+	+	+	NC	3071	0,0% (0/7)	
				-	+	+	NC	29		
				+	+	+	NC	3116		
				+	+	+	NC	163		
				-	-	+	NC	50		
				+	+	+	NC	801		
				+	+	+	NC	4058		
				-	-	-	C	0		
				+	+	+	NC	4482		
				-	-	-	C	0		
				-	-	-	C	0		
				+	+	+	NC	7642		
				-	-	+	NC	0		
				+	+	+	NC	7283		
		NC-PLAPEG-LIC	-	-	-	C	0			
			-	-	-	C	0			
			-	-	+	NC	0			
			-	-	-	C	0			
			-	-	-	C	0			
			-	-	-	C	0			
			-	-	-	C	0			
			-	-	-	C	0			
		BZ	100,0	+	+	+	NC	145	0,0% (0/7)	
				+	+	+	NC	6788		
				+	+	+	NC	2559		
				-	-	+	NC	10		
				+	+	+	NC	1751		
				+	+	+	NC	10610		
+	+			+	NC	6279				
+	+			+	NC	7283				
+	+			+	NC	2993				
+	+			+	NC	2055				
+	+			+	NC	3276				
Controles	e			+	+	+	NC	0,0% (0/4)		0,0% (0/4)
				+	+	+	NC			
				+	+	+	NC			
		+	+	+	NC					

HC: hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; qPCR: “polymerase chain reaction” quantitativo; LIC-livre: grupo de animais infectado tratado com licnofolida na forma livre; NC-PLAPEG-LIC: grupo de animais infectado tratado com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida; BZ: grupo de animais infectado tratado com Benznidazol; NC: não curado; C: curado

5.2.6.5. Avaliação do parasitismo tecidual de animais infectados pela cepa VL-10 e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica.

A **Tabela 11** apresenta os resultados obtidos por qPCR nas amostras de coração dos animais infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* e tratados durante a fase crônica da infecção por via oral durante 20 dias consecutivos com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia e 12,0 mg/kg/dia), BZ (100,0 mg/kg/dia) e do grupo controle não tratado (INT). Apenas um animal (16,7% - 1/6) do grupo tratado com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) foi negativo (**Tabela 11**). Todos os animais do grupo NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia - 8/8) apresentaram amostras negativas, enquanto que 42,8% (3/8) dos animais tratados com NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia) foram negativos (**Tabela 11**). Nenhum animal dos grupos BZ (100,0 mg/kg/dia) e INT foram negativos na avaliação tecidual por qPCR (**Tabela 11**).

A avaliação dos resultados dos testes laboratoriais utilizados como parâmetros para definição clássica de cura (HC, PCR e ELISA) frente aos resultados de qPCR demonstraram ausência do parasito no coração de um animal do grupo tratado com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), no qual a qPCR demonstrou ausência do parasito no coração frente a ausência de cura (0% - 0/6) pelo critério clássico (**Tabela 11**). Fato também observado em todos (100,0% - 8/8) animais tratados com NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) frente a cura de 87,5% (7/8) pelo critério clássico (**Tabela 11**). Vale ressaltar que estes dois animais (um do grupo LIC-livre e um do grupo NC-PLAPEG-LIC) negativos na qPCR, mas que são considerados não curados pelo critério clássico apresentaram resultados negativos para HC e PCR, sendo a falha terapêutica confirmada apenas pela ELISA (**Tabela 11**).

**Tabela 11:** Dados laboratoriais de animais infectados pela cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com licnofolida livre e em nanocápsulas poliméricas por via oral durante a fase crônica.

Cepa	Infecção	Grupo experimental	Dose (mg/kg/dia)	Resultados dos testes laboratoriais			Cura (critério clássico)	Parasitas/ mg tecido	Negativação qPCR
				HC	PCR	ELISA			
VL-10 (TC II)	Crônica	LIC-Livre	12,0	+	+	+	NC	637	16,7% (1/6)
				-	-	+	NC	385	
				-	-	+	NC	15	
				-	-	+	NC	0	
				-	+	+	NC	2219	
				-	+	+	NC	3948	
		NC-PLAPEG-LIC	8,0	-	-	-	C	0	42,8% (3/7)
				-	-	+	NC	529	
				+	+	+	NC	19350	
				-	+	+	NC	6075	
				-	-	-	C	0	
				-	-	-	C	0	
		NC-PLAPEG-LIC	12,0	-	-	-	C	0	87,5% (7/8)
				-	-	-	C	0	
				-	-	-	C	0	
				-	-	-	C	0	
				-	-	-	C	0	
				-	-	+	NC	0	
		BZ	100,0	-	-	-	C	0	0,0% (0/4)
				+	+	+	NC	38	
				+	+	+	NC	2235	
				+	-	+	NC	450	
				+	-	+	NC	1123	
				+	-	+	NC	541	
Controles	e	+	+	+	NC	1404	0,0% (0/8)		
		+	+	+	NC	238			
		+	+	+	NC	14596			
		+	-	+	NC	1892			
		+	+	+	NC	4283			
		+	+	+	NC	662			

HC: hemocultura; PCR: “polymerase chain reaction”; ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”; qPCR: “polymerase chain reaction” quantitativo; LIC-livre: grupo de animais infectado tratado com licnofolida na forma livre; NC-PLAPEG-LIC: grupo de animais infectado tratado com nanocápsulas de PLAPEG contendo licnofolida; BZ: grupo de animais infectado tratado com Benznidazol; NC: não curado; C: curado.

## 6. Discussão

Decorridos mais de 100 anos da sua descoberta, a busca por um tratamento seguro e eficaz para a doença de Chagas continua um desafio. Embora muitos avanços tenham sido alcançados, as opções terapêuticas disponíveis continuam sendo ainda o benznidazol e o nifurtimox. Estes compostos, apesar de serem eficazes no tratamento das fases aguda e crônica recente, são pouco ativos quando utilizados na fase crônica da infecção, além de apresentarem perfis inadequados de segurança e tolerabilidade por parte do paciente (Coura & Castro, 2002). 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*, particularmente na fase crônica da doença (Urbina et al, 2009).

Este trabalho teve como objetivo central avaliar a eficácia terapêutica da lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC) em modelo murino experimentalmente infectado com cepas de *T. cruzi* parcialmente resistente ou resistente aos tratamentos etiológicos clássicos disponíveis. O Brasil tem uma das maiores biodiversidades vegetais do mundo sendo a LIC uma substância isolada da *Lychnophora trichocarpha*, planta originária de nossa flora encontrada no cerrado das regiões de Minas Gerais, Bahia e Goiás, com atividade anti-*T. cruzi* comprovada em ensaios *in vitro* (Oliveira et al., 1996, Chiari et al., 1996, Graef et al., 2005) e *in vivo* (Branquinho et al., 2014b) demonstrada recentemente pela nossa equipe. Ao longo da última década, alguns grupos de pesquisa têm avaliado algumas lactonas sesquiterpênicas demonstrando sua atividade tripanocida (Sulsen et al., 2008; da Silva et al., 2013). Mais recentemente, foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa trabalhos que associaram a LIC com formulações farmacêuticas nanoestruturadas (Branquinho et al., 2014a,b), que foram testadas *in vivo* em modelo murino infectado com o *T. cruzi*, comprovando que estas formulações apresentam não só atividade anti-*T. cruzi*, pois sua eficácia terapêutica foi superior ao tratamento clássico com benznidazol. Apesar deste fato, devido à dificuldade de obtenção da planta que deve ser realizada em campo na Serra do Cipó, há dificuldades no isolamento da LIC, baixo rendimento em sua extração frente à quantidade necessária para desenvolvimento de projetos mais extensos *in vivo*. Consequentemente, ao longo dos seis anos de desenvolvimento dos projetos já realizados, a avaliação da atividade anti-*T. cruzi in vivo* de LIC na sua forma livre não foi suficientemente realizada paralelamente às formulações nanoestruturadas como desejado e necessário. Sendo assim, um dos objetivos deste trabalho foi cobrir esta lacuna cujos resultados consistirão em importante comparação com os resultados anteriormente obtidos com a LIC nanoestruturada.

O isolamento e caracterização da LIC foram descritos por Branquinho et al. (2012, 2014 a), Saúde-Guimarães et al. (2014). Todos os dados de caracterização da substância isolada estão

de acordo com os dados da literatura, descritos inicialmente por Bohlmann *et al.* (1980) e Vichnewski *et al.* (1989).

Neste trabalho foram realizados testes *in vivo* com a LIC na sua forma livre (LIC-livre), utilizando as mesmas doses já utilizadas anteriormente por Branquinho (2014) com as formulações nanoestruturadas. Apesar de não levar a cura, a LIC-livre administrada na dose de 5,0 mg/kg/dia durante 20 dias consecutivos por via oral na **fase aguda** da infecção pela cepa Y de *T. cruzi* (parcialmente resistente) em camundongos Swiss reduziu a parasitemia (ASC e PMP) e aumentou a sobrevida dos animais significativamente. Foram alcançados índices de sobrevida de 75,0% dos animais tratados com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia), por todo o período de observação dos animais (6 meses pós-tratamento). Estes resultados são semelhantes aos únicos obtidos por Branquinho *et al.* (2014), que também demonstrou redução significativa da parasitemia em relação aos animais infectados não tratados sem demonstração de cura, administrando doses de apenas 2,0 mg/kg/dia de LIC-livre por 10 dias consecutivos em animais infectados a cepa Y, porém com tratamento por via I.V. iniciado 24h após infecção. Da Silva *et al.* (2013) avaliaram a eficácia terapêutica da lactona sesquiterpênica Psilostacin A administrada por via intraperitoneal nas doses de 0,5, 5,0 e 50,0 mg/kg/dia durante a fase aguda da infecção e por 5 dias consecutivos em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, obtendo redução significativa da parasitemia em relação aos animais não tratados, porém o tratamento não impediu a morte dos animais. Vale ressaltar que Da Silva *et al.* (2013) utilizaram uma dose de cinco a dez vezes maior do que a utilizada em nosso estudo, além de incluirmos a HC e PCR para realizar o acompanhamento da parasitemia pós-tratamento (critério mais robusto na avaliação pós- tratamento). Utilizando o mesmo modelo experimental, Sulsen *et al.*, (2013) avaliaram outra lactona sesquiterpênica, Cumanin, na dose de 1,0 mg/kg/dia e obtiveram resultados similares aos encontrados em nosso estudo, com redução da parasitemia, manutenção da sobrevida à níveis semelhantes ao tratamento clássico com BZ, mas sem demonstrar cura. Estes resultados indicam a alta atividade terapêutica da LIC no modelo murino.

Os resultados obtidos com a administração de LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) durante a fase crônica da infecção pela cepa Y por 20 dias consecutivos, via oral, também relevaram que apesar do tratamento não ter proporcionado cura ele foi também capaz de reduzir a parasitemia. Este achado foi comprovado pela taxa de negatificação dos testes laboratoriais parasitológico de HC (37,5%) e molecular, PCR (28,6%), e não foi observado nos grupos controles. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos com o tratamento clássico utilizando BZ (100,0 mg/kg/dia) sob o mesmo regime terapêutico que também foi capaz de reduzir a parasitemia sem proporcionar cura.

Nossos resultados obtidos durante ensaios *in vivo* utilizando a cepa VL-10 (resistente aos tratamentos clássicos) em modelo murino, utilizando a LIC-livre na dose de 12,0 mg/kg/dia administrada durante 20 dias por via oral durante a fase aguda, demonstraram alteração significativa dos parâmetros biológicos da cepa, reduzindo a área sobre curva e o pico máximo de parasitemia. Apesar dessas alterações observadas, os resultados foram semelhantes ao obtido com o tratamento clássico com BZ (100,0 mg/kg/dia) que também não proporcionou a cura. Mais uma vez, observamos que LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir a parasitemia de camundongos infectados com *T. cruzi* sem proporcionar cura. No entanto, é importante ressaltar que estes resultados foram obtidos com tratamento administrado por via oral em animais infectados com uma cepa 100% resistente ao tratamento clássico com BZ.

O tratamento da DCh durante a fase crônica constitui um dos maiores desafios da terapêutica anti-*T. cruzi*, pois diversas substâncias se demonstram ativas quando administradas durante a fase aguda, mas sem resultados promissores em infecções crônicas ou tardias. Em nosso estudo foi demonstrado que LIC administrada sob sua forma livre apresentou resultados semelhantes aos do tratamento clássico, com redução da parasitemia, manutenção da sobrevivência dos animais, porém sem proporcionar cura. Dessa forma, os resultados obtidos comprovam a resistência das cepas Y e VL-10 do *T. cruzi* ao tratamento com LIC administrada sob sua forma livre por via oral durante a fase aguda e crônica da infecção, mas reforçam o potencial desta substância como agente farmacológico, necessitando uma abordagem terapêutica mais específica como alteração do regime terapêutico. Além disto, vale comentar que um agente terapêutico que reduz a parasitemia e aumenta a sobrevivência do hospedeiro é considerado muito importante se estes efeitos forem extrapolados para o ser humano, pois estas ações resultariam para um paciente um melhor prognóstico da doença. Atualmente, um importante estudo está sendo feito em pacientes chagásicos com cardiopatia no sentido de verificar se o benznidazol interfere ou melhora o prognóstico de pacientes tratados em comparação com os não tratados (Marin-Neto *et al.*, 2009).

A literatura registra ainda poucos estudos sobre a utilização de lactonas sesquiterpênicas no tratamento *in vivo* de animais infectados pelo *T. cruzi*. Os que existem, em sua maioria, utilizaram cepas susceptíveis ou parcialmente resistentes ao tratamento com os fármacos usuais. Por outro lado, Da Silva *et al.* (2013) avaliando duas lactonas sesquiterpênicas em modelo murino infectado com a cepa Colombiana (resistente ao tratamento com BZ) durante a fase aguda da infecção, não observaram redução na parasitemia dos animais, nem manutenção da sobrevivência. Portanto, este trabalho foi pioneiro na avaliação *in vivo* de uma lactona sesquiterpênica na sua forma livre isolada a partir de planta nativa do território brasileiro em infecção com uma cepa altamente resistente ao tratamento clássico com BZ.



A LIC é classificada como uma lactona sesquiterpênica pela presença do grupo lactona em sua cadeia principal. Essa classe de moléculas contém grupos funcionais alquilantes responsáveis por suas ações farmacológicas e tóxicas, como o  $\alpha$ - $\beta$ -ciclopentanona insaturada (Uchiyama, 2009) e a  $\alpha$ -metileno-gama-lactona (Rodriguez *et al.*, 1976). O mecanismo de ação mais aceito para as lactonas sesquiterpênicas está associado à inibição de enzimas lisossomais que conduzem à inibição da síntese do DNA e, conseqüentemente, a multiplicação de microorganismos unicelulares como os protozoários da família Tripanosomatidae. Uchiyama (2009) sugeriu em seu trabalho que a atividade tripanocida destes compostos está associada ao estresse oxidativo dependente da porção  $\gamma$ -lactona da estrutura.

Branquinho (2014) realizou a farmacocinética da LIC sob sua forma livre administrada por via I.V. e demonstrou baixo tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) com elevado volume de distribuição e clearance. Apesar do seu potencial farmacológico demonstrado em nosso estudo, a aplicação terapêutica de LIC apresenta alguns inconvenientes, como o fato de algumas entidades ativas como ela sofrerem degradação em pH elevado, além de suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis como a baixa solubilidade em meio aquoso ( $\log P = 5.03$ ) (Branquinho *et al.*, 2014). Mais recentemente Lachi-Silva *et al.* (2015) publicaram a farmacocinética de LIC sob sua forma livre administrada por via oral em uma dose de 3,3 mg/kg utilizando ratos “Wistar” como modelo experimental. Os autores mostraram que LIC apresenta boa biodisponibilidade oral (aproximadamente 68,0%), rápida absorção, distribuição e eliminação, sugerindo então sua utilização como agente farmacológico pela via oral. Apesar dos dados de farmacocinética indicarem o uso de LIC por via oral, e que os dados obtidos neste trabalho com a administração de LIC sob sua forma livre demonstrarem efeito anti-*T. cruzi in vivo*, não foi possível alcançar cura em nenhum animal tratado. Esta limitação sugere a necessidade de uma abordagem farmacológica diferenciada para esta substância.

Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa estimularam a busca por formas farmacêuticas que permitissem a alteração dos parâmetros farmacocinéticos da LIC, que demonstrou atividade *in vivo*. Nos últimos anos, tem sido sugerido por alguns grupos de pesquisa, uma abordagem farmacêutica para aperfeiçoar a ação farmacológica de fármacos, pela associação da molécula ativa a um sistema de liberação nanoestruturado. Os sistemas nanoestruturados ou nanocarreadores de fármacos apresentam dimensões em torno de 10 – 1000 nm e são aplicáveis ao tratamento do câncer, doenças parasitárias, dentre outras aplicações (Mohanraj & Chen, 2006). Estes sistemas representam uma abordagem promissora, pois permitem a alteração dos parâmetros farmacocinéticos tais como aumento do tempo de circulação da substância carregada no sangue e aumento da seletividade, reduzindo doses e efeitos colaterais (Owens & Peppas, 2006). Estas características permitem algumas vezes otimizar a velocidade de liberação da substância ativa, aumentando, conseqüentemente, a

solubilização de alguns fármacos e a sua biodisponibilidade oral (Rao *et al.*, 2004), o que seria desejável para a LIC. Na DCh, a utilização de nanocarreadores de fármacos ou vetores, especialmente os nanométricos, tem sido aos poucos utilizados (Romero & Morilla, 2010; 2015), mas em sua maioria, buscando a vetorização de fármacos disponíveis no mercado. Dentre as várias estratégias de busca por alternativas para o tratamento da DCh, a avaliação racional da atividade anti-*T.cruzi* de fármacos consagrados no tratamento de outras etiologias empregando a vetorização têm sido amplamente realizada (Gallerano, 1990; Moreira, 1992; Molina *et al.*, 2000; Apt *et al.*, 1998, 2003; Urbina 2009; Bahia *et al.*, 2012; Buckner *et al.*, 2012), pelo fato destes medicamentos já possuírem perfis toxicológicos e de biodisponibilidade conhecidos em humanos. Branquinho *et al.* (2014a) também desenvolveram nanocápsulas poliméricas para encapsular a LIC, obtida da espécie *L. trichocarpa*, com o intuito de melhorar a sua dispersibilidade em meios aquosos e melhorar a absorção e o perfil farmacocinético. A escolha de nanocápsula (NC) como carreador da LIC foi realizada com o propósito de se obter uma formulação capaz de encapsular esta substância lipofílica, LIC, no núcleo oleoso das NC, tendo em vista sua elevada lipofilicidade ( $\log P=5,03$ ) e sua baixa solubilidade em meio PBS, pH 7,4 ( $33 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ ). Neste sentido os autores empregaram a técnica de nanoprecipitação, também conhecida como deposição de um polímero pré-formado seguida da evaporação do solvente, por ser de simples realização e reprodutível permitindo a produção de partículas de 50 – 500 nm, dependendo do polímero utilizado (Couvreur *et al.*, 2002; Fessii *et al.*, 1989; Legrand *et al.*, 1999; Mora-Huertas *et al.*, 2010). A nanoencapsulação foi feita utilizando polímero que leva à obtenção de sistemas furtivos, formando assim, as nanocápsulas de NC-PLAPEG-LIC agora utilizadas neste estudo, a partir dos protocolos desenvolvidos por Branquinho *et al.* (2014 a e b).

Dentre os vários requisitos para a avaliação físico-química das nanocápsulas devem ser considerados o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, para garantir sua estabilidade ao longo do tempo. Chunbai He *et al.* (2010) demonstraram que tanto o tamanho de partícula quanto a carga superficial (potencial zeta) influenciam na biodistribuição da substância carregada, correlacionando as concentrações da entidade ativa em determinados órgãos de acordo com suas características físico-químicas. O tamanho e a carga superficial também estão então relacionados às características de seletividade tecidual, direcionando a entidade ativa a determinados tipos celulares (Owens & Peppas, 2006; Chunbai He *et al.*, 2010). Além disso, o tamanho e o índice de polidispersão das nanopartículas indicam o grau de uniformidade de tamanho e da dispersão de uma amostra (Schaffazick *et al.*, 2003). Alguns autores, utilizaram abordagens nanotecnológicas para escapar da captação fagocitária e demonstraram que a manutenção do tamanho das partículas em torno de 150 nm são essenciais neste sentido (Chunbai He *et al.*, 2010).

Neste trabalho foram produzidas formulações de nanocápsulas de PLAPEG contendo LIC na concentração de 2,0 mg/ml para realização dos testes *in vivo*, segundo o protocolo descrito por Branquinho *et al.* (2014a). As formulações apresentaram tamanho médio entre  $100,9 \pm 7,4$  a  $107,3 \pm 5,2$  nm, sendo estes valores comparáveis com os previamente descritos na literatura, com valores entre 100 – 300 nm (Legrand *et al.*, 1999; Mosqueira *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Assis *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2011) e dentro dos valores de referência apresentados e validados por Branquinho *et al.* (2014a). As nanocápsulas apresentaram-se com aspecto leitoso característico de suspensões coloidais nanométricas, com aspecto visual homogêneo. Este aspecto foi confirmado pelos resultados do índice de polidispersão (IP), que variou entre  $0,105 \pm 0,05$  -  $0,112 \pm 0,08$ . Essa formulação é considerada homogênea em relação ao tamanho das partículas, uma vez que apresenta ID menor que 0,300 (Leite *et al.*, 2007). O potencial zeta avaliado neste estudo revelou valores entre  $-36,1 \pm 6,2$  e  $-41,6 \pm 5,7$  mV. Já está descrito na literatura que valores absolutos de potencial zeta acima de 30 mV causam repulsão entre as partículas, evitando sua agregação e, conseqüentemente, levam a maior estabilidade das dispersões de nanocápsulas. No caso da utilização do dibloco PLAPEG, alguns trabalhos sugerem a ocorrência da redução da carga superficial induzida pela presença das cadeias de PEG (Tobío *et al.*, 2000; Mosqueira *et al.*, 2001).

Estas formulações produzidas foram administradas em duas doses diferentes por via oral a animais infectados com a cepa VL-10 (resistente aos tratamentos clássicos) durante a fase aguda da infecção. Aqueles animais que receberam a maior dose (12,0 mg/kg/dia) apresentaram os melhores resultados, sendo necessária a administração de apenas duas doses para a supressão da parasitemia de 100,0% dos animais. Além disso, os animais tratados com a maior dose (12,0 mg/kg/dia) apresentaram porcentagem de cura superior aos animais que receberam a formulação de NC-PLAPEG-LIC na menor dose (8,0 mg/kg/dia), com índices de 75,0% e 37,5%, respectivamente, enquanto os animais que foram tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), com BZ (100,0 mg/kg/dia) e os controles não curaram. Em relação à sobrevida, apenas o grupo de animais que recebeu a maior dose da formulação de circulação prolongada (12,0 mg/kg/dia) apresentou 100,0% de sobrevida, enquanto nos grupos NC-PLAPEG-LIC 8,0 mg/kg/dia, LIC-livre 12,0 mg/kg/dia, BZ 100,0 mg/kg/dia e NC-Br a sobrevida foi de 87,5%. Constatou-se assim que a administração de duas doses diferentes da formulação de NC-PLAPEG-LIC permitiu verificar o efeito dose *versus* eficácia durante a infecção de fase aguda utilizando uma cepa resistente e revelando índice de cura e de sobrevida diretamente relacionados à dose administrada. Este efeito dose resposta terapêutica já havia sido relatada por Branquinho (2014) com estas mesmas formulações, sendo demonstrada cura de 87,5% utilizando a mesma formulação na dose de 12,0 mg/kg/dia e 43,0% com a dose de 8,0 mg/kg/dia, administradas por via oral à camundongos infectados com a cepa VL-10 durante a fase crônica da infecção. Estes

resultados são os únicos disponíveis na literatura que podem ser diretamente comparados a este trabalho, pois ainda é limitado o número de publicações que utilizaram a vetorização de fármacos como alternativa para o tratamento da DCh.

Ao compararmos nossos resultados com os trabalhos mais promissores observamos que Molina *et al.* (2000) mostraram cura de 50,0% e sobrevida de 80,0% de animais infectados com a cepa Colombiana (resistente aos tratamentos usuais) e tratados durante a fase aguda da infecção com a administração do derivado triazolico posaconazol (20,0 mg/kg/dia). No ano seguinte, Molina *et al.* (2001) obtiveram cura de 60 – 90% dos animais tratados com nanoesferas de PLAPEG contendo o mesmo derivado triazolico posaconazol na dose de 3,0 mg/kg/dia, mas utilizando cepas parcialmente resistente ou sensível, respectivamente, e regime terapêutico mais prolongado (30 dias de tratamento). Bahia *et al.* (2012) alcançaram cura de 88,7% de animais infectados com a cepa VL-10 e tratados durante a fase aguda da infecção pelo fármaco fexinidazol, porém utilizando doses bem mais elevadas (300,0 mg/kg/dia).

Foi observado que a LIC livre reduziu a parasitemia, aumentou a sobrevida dos camundongos em relação aos grupos controles, porém nenhum animal infectado tratado foi curado, o que evidencia a vantagem da eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas (Branquinho *et al.*, 2014 b) que promoveu a cura de 87,5% dos animais infectados por uma cepa resistente ao tratamento quando tratados por via oral. O perfil de dissolução de LIC-livre e de liberação da NC-LIC estão descritos em Branquinho *et al.* (2014 a). Após 24 horas, cerca de 100,0% da LIC foram completamente dissolvidos, ao passo que, aproximadamente 60,0% foram liberados das NC. A análise do perfil de dissolução indica que a difusão através de membranas (diálise) ocorre lentamente, e que a completa dissolução da LIC ocorreu somente após 24 horas de contato com o meio. A liberação da LIC da NC foi lenta, mas completa, resultando na liberação de 97,0% desta substância em 48 horas. O tempo necessário para 50,0% de liberação da LIC NC ( $T_{50}$ ) foi de 20,7 h e de somente 7,3 h para dissolução da LIC-livre (Branquinho *et al.*, 2014 a). Esta é uma hipótese que pode justificar a eficácia terapêutica de NC contendo LIC frente à falha na terapêutica de animais infectados tratados com a LIC-livre (Branquinho *et al.*, 2014 b).

Apesar da via oral ser a mais utilizada e prontamente aceita para administração de fármacos e a utilização da LIC por via oral ter sido sugerida por Lachi-Silva *et al.* (2015) as diferenças obtidas com a utilização NC-PLAPEG-LIC frente LIC-livre por via oral durante a fase aguda da infecção pela cepa VL-10 indicam que as alterações dos parâmetros farmacocinéticos causaram diferenças nos resultados de eficácia *in vivo*. Portanto, é provável que as NC desenvolvidas neste estudo tenham melhorado a estabilidade da LIC durante o trânsito intestinal, pois o efeito terapêutico da entidade ativa foi preservado resultando na cura

de animais infectados com cepa de *T. cruzi* resistente ao tratamento com LIC-livre e com o tratamento com clássico com aos fármacos usuais, BZ e NFX.

Na monitorização dos resultados da eficácia terapêutica uma grande quantidade de testes laboratoriais está disponível e estes devem ser empregados conjuntamente para uma correta avaliação. Segundo recomendação divulgada pelo Ministério da Saúde em 2005 (Consenso brasileiro em doença de Chagas) o acompanhamento pós-terapêutico de indivíduos chagásicos deve ser realizado utilizando um conjunto de métodos parasitológico, molecular e sorológico. Neste sentido, os grupos de pesquisas em DCh experimental utilizam essa recomendação como norteador para suas avaliações. O critério de cura é baseado principalmente na negatificação da sorologia convencional associada à negatificação de todos os métodos parasitológicos empregados em paralelo. No entanto, mesmo quando o tratamento é eficaz, a sororeversão pode ocorrer a longo prazo, principalmente em infecções crônicas antigas necessitando de um longo tempo de acompanhamento pós-tratamento (Viotti *et al.*, 1994). Além disso, a avaliação da resposta parasitológica ao tratamento é monitorada pela realização de métodos tradicionais, como hemocultura e xenodiagnóstico que apresentam baixa sensibilidade, especialmente durante a fase crônica da infecção (Moser *et al.*, 1989; Junqueira *et al.*, 1996; Kirshhoff *et al.*, 1996; Marcon *et al.*, 2002). Em laboratórios de pesquisa, dispõem-se de técnicas de avaliação parasitológica alternativas mais sensíveis, como a realização de ensaios baseados em PCR. Dentre as desvantagens da PCR tradicional estão: o longo tempo necessário para sua realização e o risco de resultados falso positivos em decorrência da intensa manipulação do produto amplificado para visualização em géis de poliacrilamida e agarose produzidos de forma manual ou de géis de agarose manipulados por equipamentos automatizados (gel eletrônico), além da impossibilidade de realizar análises quantitativas. Assim, a qPCR (PCR quantitativa ou PCR em tempo real) emergiu nos últimos anos como uma ferramenta molecular mais segura e apropriada para monitorar a carga parasitária em infecções experimentais (Caldas, 2011), pois apresenta dados da amplificação do DNA alvo a cada ciclo da reação, permitindo calcular a quantidade de DNA na região log-linear da curva de amplificação (Cummings & Tarleton, 2003).

Na busca por esclarecimentos sob o real benefício dos tratamentos por via oral utilizando LIC sob sua forma livre e carreada em nanocápsulas poliméricas durante a fase aguda e crônica da infecção de animais infectados com as cepas Y (parcialmente resistente) e VL-10 (resistente), este estudo utilizou a técnica de qPCR para quantificação do parasitismo tecidual, empregada no sentido de verificar o impacto do tratamento na infecção. O protocolo da qPCR utilizado neste estudo foi o mesmo padronizado por Caldas (2011), tendo como alvo de amplificação o DNA satélite do *T. cruzi*, altamente conservado e presente em  $10^4$  a  $10^5$  cópias no genoma do parasito (Elias *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2005). Os iniciadores utilizados para

amplificação do DNA do *T. cruzi* são capazes de amplificar uma sequência de 195 pares de base (Moser *et al.*, 1989). Além disso, foi utilizado o gene que codifica o TNF- $\alpha$  como controle interno para normalizar a quantidade de DNA detectada e evitar a ocorrência de resultados falso negativos.

As curvas padrão geradas neste trabalho para a quantificação de parasitos no tecido mostraram eficiências de amplificação acima de 97,0%, o que demonstra altas eficiências de amplificação do DNA do parasito. A análise das curvas padrão demonstrou altos valores de  $R^2$  ( $>0,99$ ) em todas as curvas. O valor de  $R^2$  corresponde ao coeficiente de regressão linear calculado a partir da regressão linear da curva padrão e indica a precisão na distribuição dos pontos da curva. O valor máximo de  $R^2$  é 1, o que indica uma perfeita correlação entre os dados do parasitismo e a intensidade da fluorescência (sinal) detectada. Dessa forma, os resultados obtidos em nossas curvas padrão revelaram a eficiência da técnica usada, permitindo sua utilização para a quantificação do parasitismo tecidual (coração).

Sabe-se que durante a fase aguda da infecção, ninhos de amastigotas de *T. cruzi* são encontrados em abundância em uma ampla variedade de tecidos (Lenzi *et al.*, 1996; Monteon *et al.*, 1996). Em contraste, durante a fase crônica da infecção, a parasitemia é muito baixa e os parasitos são em grande parte restritos ao tecido muscular, de acordo com as características intrínsecas da cepa do *T. cruzi* (Postan *et al.*, 1983; Reis *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). Tarleton & Cummings confirmam que ensaios baseados em qPCR (PCR em tempo real) podem detectar baixos níveis de *T. cruzi* em tecidos de camundongos crônicos experimentalmente infectados. Diversos protocolos consideram como limite de detecção a quantidade de 0,1 parasitos (Caldas *et al.*, 2012; Tarleton & Cummings, 2013), porém esta quantidade é contraditória e questionável, uma vez que outros trabalhos indicam que o DNA de *T. cruzi* detectado em tecidos não é devido à sua persistência a longo prazo, mas sim devido a presença do parasito nos tecidos (Zhang *et al.*, 1999; Tarleton & Cummings, 2013) Dessa forma, foi utilizado como limiar de detecção a quantificação de pelo menos 1 (um) parasito por miligrama de tecido, sendo valores menores considerados como negativos. O protocolo de qPCR seguido neste estudo foi capaz de detectar o DNA do *T. cruzi* no coração de todos os animais pertencentes aos grupos controles infectados com as cepas Y ou VI-10 e não tratados.

A maior parte dos estudos que utilizaram a técnica de qPCR para a avaliação da eficácia terapêutica na DCh foram realizadas com a utilização de sangue como amostra clínica, sendo a avaliação do parasitismo tecidual limitada à poucos trabalhos. Dessa forma, este trabalho se destaca por utilizar um método atual na avaliação da eficácia terapêutica experimental, proporcionando maior robustez aos resultados encontrados por nosso grupo de pesquisa. A avaliação do parasitismo tecidual de amostras de coração provenientes de camundongos

infectados com a cepa Y (parcialmente resistente ao BZ) e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase aguda da infecção** com as formulações LIC (LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC e NC-PCL-LIC) nas doses de 5,0 mg/kg/dia e com BZ (100,0 mg/kg/dia) não detectou parasitos, sendo todas as amostras consideradas negativas. Não foi possível realizar a avaliação de amostras dos animais dos grupos controles, pois nenhum animal sobreviveu à fase aguda e a necropsia não foi realizada. Mesmo assim, avaliando-se os parâmetros de controle da reação de qPCR podemos afirmar que essas amostras foram negativas nas análises realizadas. Dentre os parâmetros analisados a amplificação do gene endógeno TNF- $\alpha$ , foi utilizado como parâmetro normalizador da reação, garantindo a correta realização da técnica, e análise da curva de dissociação (ou curva de “melting”) que apresentou a temperatura específica de amplificação de cada par de iniciadores (“primers”) (Caldas *et al.*, 2012).

Apesar de não termos resultados comparativos na literatura, é bem descrito que o tratamento clássico com BZ durante a fase aguda da infecção de camundongos Swiss infectados com a cepa Y apesar de não apresentar cura em todos os animais (apenas 50% em média) permite a redução de ninhos de amastigotas intracelulares e consequentemente a inflamação local do parasitismo, fatores que estão relacionados com as alterações cardíacas (Zhang & Tarleton, 1999; Perez-Fuentes *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2005; Benvenuti *et al.*, 2008). Dessa forma, pode-se sugerir que tanto o tratamento com BZ (100,0 mg/kg/dia) quanto os tratamentos realizados por nós utilizando as formulações contendo LIC (LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC e NC-PCL-LIC) nas doses de 5,0 mg/kg/dia foram capazes de reduzir a quantidade de ninhos de amastigotas intracelulares no tecido cardíaco. Para melhor avaliação destes resultados, já esta sendo realizada a análise histopatológica de cortes histológicos cardíacos destes mesmos animais, que embora apresente baixa sensibilidade poderá auxiliar na interpretação de nossos resultados de qPCR, inclusive pela avaliação dos processos inflamatórios resultantes da presença do parasito.

A avaliação do parasitismo tecidual de amostras provenientes de camundongos infectados com a cepa Y e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase crônica da infecção** com formulações farmacêuticas contendo LIC (LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC e NC-PCL-LIC) nas doses de 5,0 mg/kg/dia demonstrou ausência do parasito em todas as amostras analisadas dos animais tratados com as formulações contendo LIC, exceto um animal do grupo tratado com NC-PCL-LIC (5,0 mg/kg/dia) que foi positivo. Dentre os animais tratados com BZ (100,0 mg/kg/dia) 50,0% (4/8) apresentaram resultados negativos na qPCR, sendo a média de parasitos por mg/tecido significativamente menor do que observado nos animais do grupo controle (não tratados). Todos os animais dos grupos controles (infectados e não tratados) foram positivos, apresentando elevada quantidade de parasitos/mg de tecido. Estes resultados de fase crônica reforçam os obtidos durante a fase aguda, que indicam que as formulações

contendo LIC (LIC-livre, NC-PLAPEG-LIC e NC-PCL-LIC) administradas nas doses de 5,0 mg/kg/dia são capazes de reduzir o parasitismo cardíaco. Apesar de o tratamento com LIC-livre (5,0 mg/kg/dia) não proporcionar cura assim como a administração de BZ (100,0 mg/kg/dia), ambos tratamentos permitiram também a redução do parasitismo cardíaco.

A avaliação do parasitismo tecidual de amostras provenientes de camundongos infectados com a cepa VL-10 (resistente ao BZ) e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase aguda** da infecção com formulações farmacêuticas contendo LIC - LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e NC-PLAPEG-LIC (8,0 e 12,0 mg/kg/dia) – e com BZ (100,0 mg/kg/dia) demonstraram resultados similares ao observado com o controle de cura clássico. Todos os animais dos grupos tratados com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e BZ (100,0 mg/kg/dia) apresentaram resultados positivos para qPCR do tecido cardíaco, assim como os animais dos grupos controles. Aqueles animais tratados com NC-PLAPEG-LIC na menor dose, de 8,0 mg/kg/dia, apresentaram negatividade de 57,1% na avaliação tecidual por qPCR. Porém, quando se elevou a dose administrada de NC-PLAPEG-LIC para 12,0 mg/kg/dia, observou-se 100,0% de negatividade nas amostras. Estes dados de qPCR reforçam os dados obtidos por Branquinho (2014) avaliando os mesmos camundongos com o critério clássico de cura, demonstrando que a dose de 12,0 mg/kg/dia de NC-PLAPEG-LIC proporcionou elevadas taxas de cura, revelando o efeito dependente entre a dose administrada *versus* cura obtida. Além disso, agora podemos afirmar que a administração de NC-PLAPEG-LIC levou à cura parasitológica de 57,1% e 75,0% dos camundongos infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi*, uma vez que foi demonstrada a ausência de parasitismo tecidual aliada à negatificação dos testes clássicos empregados no critério de cura clássico (ESF, HC, PCR e ELISA).

Caldas *et al.* (2012) avaliaram as influências do tratamento com BZ, itraconazol (ITR), posaconazol (PZ) e fexinidazol (FX) em camundongos infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, avaliando-se o parasitismo tecidual pela técnica de qPCR. O nosso tratamento com BZ (100,0 mg/kg/dia) demonstrou resultados semelhantes aos obtidos por aqueles autores revelando redução da parasitemia avaliada por ESF durante o tratamento, e elevação da mesma após o término do tratamento. Além disso, a avaliação do parasitismo tecidual realizado por Caldas *et al.* (2012) revelou 0% de negatividade, resultado idêntico ao obtido neste trabalho. A administração de LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) mostrou perfil semelhante ao observado com BZ e ITR (100,0 mg/kg/dia) obtidos por Caldas *et al.* (2012), com redução da parasitemia durante o tratamento, mas sem demonstrar negatificação da qPCR tecidual. Quando estes autores administraram o PZ (20,0 mg/kg/dia) à camundongos infectados com a cepa VL-10 tratados durante a fase aguda da infecção durante 20 dias consecutivos demonstraram que o tratamento foi capaz de suprimir a parasitemia após a 4ª dose administrada, porém apresentou apenas 50,0% de negatividade na qPCR com amostras coletadas 120 d.p.t. Os melhores



resultados descritos na literatura foram obtidos por estes autores com a administração de Fex (300,0 mg/kg/dia), que levou à 100,0% de negatificação na avaliação dos parasitismo tecidual em coração por qPCR.

Nossos resultados obtidos com a administração de NC-PLAPEG-LIC na dose de 12,0 mg/kg/dia são melhores que estes obtidos por Caldas *et al.* (2012) com a administração de ITR e PZ, pois em nosso caso a parasitemia foi suprimida em todos os animais a partir da 2ª dose administrada acompanhada de 100,0% de negatificação da qPCR no coração após 180 d.p.t., e similares ao tratamento com FEX (Caldas *et al.*, 2012). Porém, vale enfatizar que o inóculo utilizada por nós foi 10x maior ( $1,0 \times 10^4$  parasitos) e que o utilizado por aqueles autores foi de  $1,0 \times 10^3$  parasitos, e o tratamento administrado em doses elevadas de FX (300,0 mg/kg/dia).

A avaliação do parasitismo tecidual de amostras provenientes de camundongos infectados com a cepa VL-10 e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase crônica da infecção** com formulações farmacêuticas contendo LIC - LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e NC-PLAPEG-LIC (8,0 e 12,0 mg/kg/dia) –e com BZ (100,0 mg/kg/dia) demonstraram resultados similares ao observado com o tratamento realizado **durante a fase aguda da infecção** utilizando a mesma cepa e protocolo de tratamento. Os resultados obtidos foram semelhantes ao obtido por Branquinho (2014) com a avaliação clássica de cura (negatificação simultânea de HC, PCR convencional de sangue e ELISA). Foi observada negatificação na qPCR de coração de 16,7% (1/6) dos animais do grupo tratado com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia). Aqueles animais tratados com NC-PLAPEG-LIC na menor dose, de 8,0 mg/kg/dia, apresentaram negatividade de 42,8% na avaliação tecidual por qPCR, resultados concordantes ao obtido por Branquinho (2014) com a utilização do critério clássico de cura. Porém, quando se elevou a dose administrada de NC-PLAPEG-LIC para 12,0 mg/kg/dia, observou-se 100,0% de negatividade nas amostras. Estes dados de qPCR reforçam os dados obtidos por Branquinho (2014), demonstrando que a dose de 12,0 mg/kg/dia de NC-PLAPEG-LIC proporcionou elevadas taxas de cura, revelando o efeito dependente entre a dose admistrada *versus* cura obtida. Além disso, agora podemos afirmar que a administração de NC-PLAPEG-LIC levou à cura parasitológica 37,5% e 87,5% dos camundongos infectados com a cepa VL-10 do *T. cruzi*, uma vez que foi demonstrada a ausência de parasitismo tecidual aliada à negatificação dos testes clássicos (ESF, HC, PCR e ELISA).

Ao analisar os resultados de qPCR do tecido cardíaco dos animais infectados com a cepa VL-10 e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase aguda da infecção** com formulações de nanocápsulas poliméricas de PLAPEG contendo LIC (NC-PLAPEG-LIC) algumas discordâncias foram observadas. Pelo critério clássico, apenas 75,0 (6/8) dos animais que receberam a maior dose de NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) foram

considerados curados, frente à negatificação de 100,0% (8/8) observada pela avaliação por qPCR. Resultado similar foi observado nos animais do grupo tratado com a menor dose de NC-PLAPEG-LIC (8,0 mg/kg/dia), em que 42,8% (3/7) foram considerados curados pelo critério clássico, frente à negatificação de 57,1% (4/7) observada na qPCR. Vale ressaltar que os animais que foram considerados não curados pelo critério clássico de cura, mas que apresentaram amostras negativas na qPCR, tiveram resultados de ESF, HC e PCR convencional NEGATIVOS, sendo considerados não curados apenas pelo resultado de ELISA.

Resultado similar foi observado na avaliação do parasitismo tecidual de amostras provenientes de camundongos infectados com a cepa VL-10 e tratados por via oral durante 20 dias consecutivos **durante a fase crônica da infecção** com formulações farmacêuticas de LIC-livre (12,0 mg/kg/dia) e NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia). Pelo critério clássico, 87,5 (7/8) dos animais que receberam a maior dose de NC-PLAPEG-LIC (12,0 mg/kg/dia) foram considerados curados, frente à negatificação de 100,0% (8/8) observada pela avaliação por qPCR. Resultado discordante também foi observado nos animais do grupo tratado com LIC-livre (12,0 mg/kg/dia), em que nenhum animal foi considerado curado pelo critério clássico, frente à negatificação de 16,7% (1/6) observada na qPCR. Vale ressaltar que novamente os animais que foram considerados não curados pelo critério clássico de cura, mas que apresentaram amostras negativas na qPCR, tiveram resultados de ESF, HC e PCR convencional NEGATIVOS, sendo considerados não curados apenas pelo resultado de ELISA.

Assim como descrito por Lana & Martins-Filho (2015) e considerando os conceitos de anticorpos da sorologia convencional e anticorpos líticos (Krettli, 2009) uma das questões mais relevantes na avaliação da eficácia terapêutica da DCh é a falta de ferramentas para identificar e certificar a cura parasitológica definitiva. Além disso, a utilização de testes de princípios diferentes leva a controvérsias de interpretação entre pesquisadores e clínicos, ainda mais quando diferentes espécimes ou amostras laboratoriais (sangue/tecido) são avaliados, o que podem gerar novas perguntas devido à natureza e a sensibilidade de cada teste empregado nas avaliações. No entanto, alguns trabalhos que utilizaram modelos experimentais demonstraram boa correlação entre métodos baseados em PCR com outros resultados parasitológicos e sorológicos empregados na avaliação pós-tratamento (Guedes *et al.*, 2004), o que também tem sido observado em humanos (Galvão *et al.*, 2003). Porém, ainda hoje o critério clássico de cura é baseado na negatificação dos testes sorológicos convencionais, que sabidamente necessitam de longo período de avaliação para se negativar em humanos devido à longa persistência dos anticorpos da sorologia convencional deferentemente dos anticorpos líticos (Galvão *et al.*, 1993) que desaparecem mais precocemente e pesquisados pelas técnicas de Lise Mediada por Complemento (LMC<sup>o</sup>) ou sua análoga, pesquisa de anticorpos anti tripomastigota vivo pela citometria de fluxo (CF-AATV) descrita por Martins-Filho (1995) e aperfeiçoada por Cordeiro

*et al.* (2001). Esta persistência prolongada de anticorpos da sorologia convencional se deve a alguns fatores intrínsecos do sistema imunológico humano, tais como: mecanismos auto-imunes, antígenos do parasito em células dendríticas e cardíacas, anticorpos anti epítomos de resíduos de açúcares e a presença de outros microrganismos como bactérias e protozoários que induzem a persistente reatividade da sorologia convencional (Gazzinelli *et al.*, 1987, 1988; Krettli *et al.*, 2009; Lana & Martins-Filho, 2009).

Segundo Lana & Martins-Filho (2015), tomando em conjunto todas as metodologias disponíveis para o monitoramento pos terapia na DCh em humanos e em modelos experimentais, constata-se uma ordem decrescente natural de negatificação: xenodiagnóstico/hemocultura > PCR (sangue > tecidos) > qPCR (sangue > tecidos) > sorologia não convencional > sorologia convencional.

Com este entendimento de critério de cura aliado aos resultados de qPCR de tecido cardíaco comparado ao critério clássico de cura obtidos neste trabalho ainda não podemos responder à pergunta de Lana & Martins-Filho (2015): "É realmente necessário considerar a negatificação da sorologia convencional como a única forma de discriminação entre pacientes ou animais curados e não curados?". Por isso, nas últimas décadas tem sido sugerido outras abordagens para avaliação de cura experimental, como a utilização de protocolos de imunossupressão (Romanha *et al.*, 2010), utilização de sorologia não convencional (LMC<sup>o</sup> e-CF-AATV) citadas anteriormente, avaliação do parasitismo tecidual por qPCR (Caldas *et al.*, 2012), além de outras avaliações empregando diversos outros marcadores, inclusive imunológicos que revelam um nítico "switch" do perfil imunológico em pacientes que negativam os parâmetros avaliados no critério de cura clássico (Lauella *et al.*, 2009; Pinazzo *et al.*, 2014). As considerações de novas abordagens na interpretação da cura na doença de Chagas talvez permitiriam avançar mais rapidamente nos estudos de quimioterapia experimental na DCh, visto que por diversas vezes ficamos atrelados ao critério clássico de cura, que com o passar do tempo e com a disponibilidade de novas metodologias podem cair em desuso e serem questionados.

## 7. Conclusões

A administração de LIC-livre á camundongos infectados com as cepas Y e VL-10 do *T. cruzi* durante as fases aguda e crônica por via oral levou á redução da parasitemia com manutenção da sobrevivência, sem serem observados sinais de toxicidade aguda após o tratamento. Porém, a LIC administrada sob sua forma livre não foi capaz de curar nenhum animal.

A eficácia terapêutica das formulações nanoestruturadas contendo LIC em animais infectados com cepa VL-10 de *T. cruzi* (100% resistente ao tratamento pelo BZ) e tratados durante a fase aguda da infecção foi de 75,0% nos tratados com LIC-PLAPEG-NC na dose de 12,0 mg/kg/dia e de 37,5% nos tratados com LIC-PLAPEG-NC na dose de 8,0 mg/kg/dia. Foi verificada uma relação direta entre as doses administradas e as taxas de cura obtidas. Além disso, as formulações contendo LIC em NC curaram os animais, diferentemente dos tratados com LIC-livre e BZ, nos quais não houve cura.

A utilização da técnica de qPCR para avaliação do parasitismo tecidual de animais infectados com as cepas Y e VL-10 de *T. cruzi* e tratados com formulações contendo LIC (LIC-livre, NC-PCL-LIC e NC-PLAPEG-LIC) se mostrou como sensível e confiável. Além de nos permitir afirmar a cura parasitológica de animais tratados com as formulações desenvolvidas por Branquinho *et al.* (2014), seus resultados foram na maioria (97%) concordantes com o critério de cura clássico. No entanto, raros resultados encontrados foram contraditórios, ampliando ainda mais a discussão em torno da avaliação terapêutica na doença de Chagas.

## **8. Perspectivas**

No seguimento deste trabalho propomos continuar a avaliação pós terapêutica dos mesmos animais avaliados nesta dissertação, com a realização de técnicas histopatológicas (Giemsa e Tricrômio de Mason) para confirmar/discordar dos resultados aqui obtidos com a técnica de qPCR; além da avaliação sorológica não-convencional com a técnica de CF-AATV em colaboração com o pesquisador Olindo Assis Martins-Filho (UFMG).

Além desses métodos, propomos ainda avançar na utilização da LIC sob sua forma livre ou em NC, sugerindo alterações nos regimes terapêuticos, como aumento do tempo de tratamento, alternância entre os dias de administração e alteração de doses.

## 9. Referências

1ª Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas (Relatório Oficial). Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Araxá, MG, 13-15 de dezembro de 1984. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 46, 1985.

Andrade, SG, Rassi, A, Magalhães, JB, Ferriolli-Filho, F, Luquetti, AO. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86 624 – 626, 1992.

Andrade, ALSS, Martelli, CMT, Oliveira, RM, Silva, SA, Aires, AIS, Soussumi, LMT, Covas, DT, Silva, LS, Andrade, JG, Travassos, LR, Almeida, IC. Short Report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six years follow-up. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 71: 594 – 597, 2004.

Andrade, ALSS, Zicker F, Oliveira RM, Silva SA, Luquetti AO, Travassos LR, Andrade SS, Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet*, 348: 1407-1413, 1996.

Argolo, AM, Felix, M, Pacheco, RS, Costa, J. Doença de chagas e seus principais vetores no Brasil. - Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio : Fundação Oswaldo Cruz : Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

Bahia, MT, Diniz, LF, Mosqueira, VCF. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. *Expert Opinion Investigation Drugs*, Downloaded from informahealthcare.com by 200.239.163.63 on 05/27/14. 2014.

Bahia-Oliveira, LMC, Gomes, JAS, Caçado, JR, Ferrari, TC, Lemos, EM, Luz, ZP, Moreira, MC, Gazzinelli, G, Correa-Oliveira, R. Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection 14–30 Years Ago. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 634 – 638, 2000.

Barros, CM. Desenvolvimento e avaliação biológica de formulações de nanocápsulas para tratamento da doença de Chagas em modelo murinho. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. 122p, 2007.

Bohlmann, F, Zdero, C, Robinson, H and King, RM. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*, **19**, 2381-2385, 1980.

Bohlmann, F. AND Jakupovic, J.; Progress in the chemistry of the Vernoniae (Compositae), *Plant Systematics and Evolution*, 4, 3-43, 1990

Braga, MS, Lauria-Pires, L, Argañaraz, ER, Nascimento, RJ, Teixeira, ARL. Persistent infection in chronic Chagas disease patient treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42: 157 – 161, 2000.

Branquinho, R.T; Mosqueira, VC; Jacqueline, S.; Kano, E.; Dorim, E; Saúde-Guimarães, D; Lana, M. HPLC-DAD and UV-Spectrophotometry for Lychnopholide determination in nanocapsule dosage form: validation and application to release kinetic study. *Journal of Chromatography Science* (2012).

Branquinho, RT. Farmacocinética e eficácia terapêutica de lactona sesquiterpênica nanoestruturada na doença de Chagas experimental em modelo murinho. Tese Doutorado, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. 2014

Branquinho, RT, Mosqueira, VC, de Oliveira-Silva, JC, Simões-Silva, M.R., Saúde-Guimarães, D.A. e Lana, Marta. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; published online 21 January 2014; doi:10.1128/AAC.00617-13

Branquinho, RT, Lana, M, Milagre, MM, Oliveira, LT, Vilela, JMC, Andraded, MS, Saúde-Guimarães, DA, Mosqueira, VCF. Comparative Pharmacokinetic Profiles Of Lychnopholide In Long-Circulating Polymeric Nanocapsules: Physicochemical Characterization And Influence Of The Formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic*. 2015. ARTIGO SUBMETIDO

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962;4:389-96

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. Terapêutica experimental da doença de Chagas. In: Cançado JR. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial de Minas Gerais; Minas Gerais: 1968. p. 510-16

Brener, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Pharmacol Chemother* 1975;13:1-44

Cançado, JR, Marra, UD, Brener, Z. Ensaio terapêutico clínico com a 5-nitro-2-furaldeido-semicarbazona (Nitrofurazona) na forma crônica da doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo* 1964;6:12-16

Cançado, JR. Tratamento da doença de Chagas. In: Cançado, JR, ed. *Doença de Chagas*, Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da UFMG, Fundação Carlos Chagas, 517-54, 1968.

Cançado, JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. Ver. Instituto Medicina Tropical S. Paulo, 44(1); 29-37, 2002.

Chagas, C. Nova Tripanozomiase Humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1: 159 – 218, 1909.

Chagas, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 3(2): 219 – 275, 1911.

Chagas, C. Tripanosomíase Americana. Forma aguda da moléstia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159 – 219, 1916.

Chagas, C, Chagas, E. Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas. Editora Freitas Bastos; Rio de Janeiro: 1935. I. p. 1892.

Chiari, E, De Oliveira, AB, Raslan, DS, Mesquita, AA, Tavares, KG. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 85, n. 3, p. 372-4, May-Jun 1991.

Chiari, E, Duarte, DS, Perry, KSP, Saúde, DA, Raslan, DS, Boaventura, MAD, Grandi, TSM, Stehman, JR, Oliveira, AB. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. Phytother Res, v. 10, p. 636-8, 1996.

CHAGASOL. Clinical Trial For The Treatment Of Chronic Chagas Disease With Posaconazole And Benznidazole (CHAGASAZOL). Hospital Universitari Vall d'Hebron Research Institute 2010 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01162967. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>

Coura, JR & Silva, JR. Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. Rev Bras Med 1961;51:283-90

Coura, JR, Anunziato, N & Willcox, HP. Chagas disease morbidity. I. Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 78: 363-372, 1983.

Coura, JR, Abreu, LL, Borges-Pereira, J, Wilcox, HP. Morbidade da doença de Chagas. IV – Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 80(1): 73 – 80, 1985.

Coura, JR & Castro, SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97: 3 – 24, 2002.



Coura, JR. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? Mem Inst Oswaldo Cruz, 108, 962-967, 2013

Diniz, L. D. F., Caldas, I. S., Guedes, P. M. D. M., Crepalde, G., De Lana, M., Carneiro, C. M., Talvani, A., Urbina, J. A. and Bahia, M. T. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 2979-2986, 2010.

DNDi. Proof-of-Concept Study of E1224 to Treat Adult Patients With Chagas Disease. Drugs for Neglected Diseases 2011 ClinicalTrials.gov identifier: NCT01489228. Available from: [http:// www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)

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

DoCampo, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des*, v. 7, p. 1157-64, 2001.

Domb, A. J. *Polymeric Site-specific Pharmacotherapy*. New York: John Wiley & Sons Ltda, v. 2, p. 27-46, 1994.

Duarte, D.S. Estudo químico e biológico de *Lychnophora pinaster* Mart. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 99 p., 1993.

Fabbro de Suasnábar D, Arias, E, Streiger, M, Piacenza, M, Ingaramo, M, Del Barco, M, Amicone, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.2000Mar-Apr;42 (2):99-109.

Ferrari, FC, Ferreira, LC, Souza, MR, Grabe-Guimarães, A, Paula, CA, Rezende, SA and Saúde-Guimarães, DA. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha* spreng. (Brazilian Arnica). *Phytother Res*, 27, 384-389, 2013.

Ferreira, HO. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e Benznidazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 23: 209 – 211, 1990.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm*, 55, R1-R4, 1989

Filardi, L.S. AND Brener, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81, 755-759, 1987.

- François, G., Passreiter, C.M., Woerdenbag, H.J. AND Van Looveren, M. Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena Iobata*. *Planta Medica*, 62(2), 126-129, 1996.
- Frederici, EE, Abelmann, WH and Nevaf, A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Trop Med Hyg*, 13,272-280, 1964.
- Freitas, JLP, Lion, MF and Partari, JTA. Resultados de um a investigação sôbre Moléstia de Chagas realizad a no Município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. *Rev Hosp Clínicas (São Paulo)*, 8, 81-92, 1953.
- Giesbrecht, A.M., Davino, S.C., Nassis, C.Z., et al. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones. *Química Nova*, 13, 312-314, 1990.
- Gomes, ML, Galvão, LM, Macedo, A.M, Pena, SD and Chiari, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*, 60, 205-210, 1998.
- Grael, C.F.F., Albuquerque, S., Lopes, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76(1), 73-82, 2005.
- Hoetz, P.J. Chagas Disease: The New Numbers. PLOS Medical Journals' Community Blog. Thursday, July 23, 2015
- Jisaka, M., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Takegawa, K., Huffman, M. A., Ohigashi, H., Koshimizu, K. Antischistosomal activities of sesquiterpene lactones and steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, possibly used by wild chimpanzees against parasite-related diseases. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(5), 845-846, 1992.
- Jordão, C.O., Vichnewski, W., Souza, G.E., Albuquerque, S., Lopes, J.L.C. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. *Phytother. Res.*, 18, 332-334, 2004.
- Kreuter, J. Nanoparticles. In *Drugs and the Pharmaceut. Sci.* New York: Marcel Dekker Inc., 1994. v.66, cap. 5, p. 219-342.
- Lamas, M.C. *et al.* Development of parenteral formulations and evaluations of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdã, 307(2), 239-243, 2006.
- Lana, M, Lopes, LA, Martins, HR, Bahia, MT, Machado-de-Assis, GF, Wendling, AP, Martins-Filho, AO, Montoya, RA, Dias, JCP, Albajar-Viñas, P. Clinical and laboratory status of patients

with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(8): 1139-1147, December 2009.

Lana, M., Branquinho, R. T., Mosqueira, V. C. F., Saúde-Guimaraes, D. A. Improvement of pharmacokinetic profile and efficacy of sesquiterpene lactone in nanocarriers in the experimental Chagas disease in mice In: 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2014, Guimarães, Portugal. 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. , 2014. v.16. p.1 – 2.

Laucella, S.A, Mazliah, D.P, Bertocchi, G. *et al.* “Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 11, pp. 1675–1684, 2009.

Lauria-Pires, L, Braga, M, Vexenat, AC, Nitz, N, Simões-Barbosa, A, Tinoco, DL, Teixeira, AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *American Journal Tropical Medicine e Hygiene*, 63: 111 – 118, 2000.

Lee, K.J., Hall, I.H., Mar, E.C., Starnes, C.O., Etgebalby, S., Waddel, T.G., Hadgraf, R.I., Ruffner, C.G., Weidner, I. Sesquiterpene Antitumor Agents: Inhibitors of Cellular Metabolism. *Science*, 196, 533-536, 1977.

Legrand, P, Barratt, G, Mosqueira, VCF, Fessi, H and Devissaguet, J.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. *STP Pharma Sci*, 9, 411-418, 1999.

Machado-De-Assis, GF. Avaliação laboratorial e clínica de indivíduos chagásicos tratados com Benznidazol e não tratados residentes no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG. Tese de doutorado, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPEB, UFOP, Ouro Preto, 128pp, 2011.

Machado-De-Assis, GF, Silva, AR, Do Bem, VAL, Bahia, MT, Martins-Filho, OA, Dias, JCP, Albajar-Viñas, P, Torres, RM and Lana, M. Posttherapeutic cure criteria in chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 1283-1291, 2012.

Marin-Neto, JA, Rassi-Junior, A, Junior, AA, Mattos, AC, Rassi, A. The BENEFIT Trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl D): 319 – 324, 2009.

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.

Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A. J., Loebenberg, D., Urbina, J. A. Activity of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 150-155, 2000

Molina, I. International Congress of Tropical Medicine and Malaria 2012 First clinical trial with posaconazole and benznidazole for the treatment of chronic Chagas disease. Available from: [http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/program\\_25\\_sept.html](http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/program_25_sept.html)

Mosqueira, V.C., Legrand, P., Gulik, A., Bourdon, O., Gref, R., Labarre, D., Barratt, G. Relationship Between Complement Activation, Cellular Uptake and Surface Physicochemical Aspects of Novel PEG-Modified Nanocapsules. *Biomaterials*, 22, 2967-2979, 2001.

Mosqueira, VC, Loiseau, PM, Bories, C, Legrand, P, Devissaguet, JP, Barratt, G. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in Plasmodium berghei-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 4, p. 1222-1228, 2004.

Mazza, S, Freire, RS. Manifestaciones cutâneas de inoculación, metastáticas y hematógenas em enfermedad de Chagas. Chagomas de inoculación, chagomas metastáticos y chagomas hematógenos. *Public MEPRA*, 46: 3 – 38, 1940.

Miles, MA, Yeo, M & Gaunt, MW. Epidemiology of American Trypanosomiasis. In: Ian Maudlin, Peter H. Holmes and Michael A. Miles (eds). *The Trypanosomiasis*. Trowbridge, Cabi Publishing. Pág. 243 – 251, 2004.

Ministério da Saúde, Governo Federal do Brasil. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 38, (Supl 3), p.7-29, 2005.

Moncayo, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (Supl. I): 401 – 404, 1999.

Moncayo, A, Silveira, AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 17-30, 2009.

Muñoz, M. J., Murcia, L. and Segovia, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9, 5-7, 2011.

- Oliveira, A.B., Saúde, D.A., Perry, K.S.P., Duarte, D.S., Raslan, D.S., Boaventura, M.A.D., Chiari, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytotherapy Research*, 10(4), 292-295, 1996.
- Packchanian, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurans compounds. *Antibiot Chemother* 1957;7:13-23
- Pereira, JB, Willcox, HP, Coura, JR . Morbidity in Chagas disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1985 Jan-Mar; 80(1):63-71.
- Pérez De Ayala, A, Pérez-Molina, JA, Norman, F, López-Vélez, R. Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr; 15(4):607-8. doi: 10.3201/eid1504.080938.
- Petherick, A. (2010). Country by country. [www.nature.com/outlooks](http://www.nature.com/outlooks), S10.
- Picman, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14, 225–281, 1986.
- Pinazo, M.J, Thomas, M.C, Bua, J. *et al.* “Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review,” *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 12, no. 4, pp. 479–496, 2014.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v. 1, 2, p. 92-100, Sep 2001.
- Rassi JR, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, 375, 1388-1402, 2010.
- Ren, Y., Acuña, U.M., Jiménez, F., García, R., Mejía, M., Chai, H., *et al.*, Cytotoxic and NF- $\kappa$ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*; *Tetrahedron*, (2012); 68: 2671-2678.
- Rezende, JMO. O aparelho digestivo na doença de Chagas: aspectos clínicos. In: Dias JCP, Coura JR (eds) *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Editora da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 153-176, 1997.
- Rodríguez, E., Towersg, N.A., NDM Itchell, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573-158, 1976.
- Rodríguez, JB. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Curr Pharm Des* 7: 1105-1116. 2001

Romaña, C Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de La enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad) Public MEPRA, 22: 16 – 28, 1935.

Sánchez, G, Cuellar, D, Zulantay, I, Gajardo, M, Gonzálezmartin, G. Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. Biol. Res. V. 35(1), p. 39-45, 2002.

Santos, S.M.B.P. Lactonas sesquiterpênicas-aplicações farmacológicas e quimiotaxonômicas. *Boletim SPQ*, 36, 41-43, 1989.

Santos, FR, Pena, SDJ and Epplen, JT. Genetic & population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetic*, 90, 655-656, 1993.

Saraf, S. Process optimization for the production of nanoparticles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6, 187-196, 2009.

Saúde, D.A., Barrero, A.F., Oltra, J.E., Justiça, J., Raslan, D.S.,Silva, E.A. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1), 7–10, 2002.

Saúde-Guimarães, DA, Raslan, DS and Oliveira, AB. *In Vitro* Antitumor Activity of Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha*. *Rev Bras Plant Med*. In Press. Maio 2014.

Schaffazick, SR, Guterres, SS, Freita, LL, Pohlmann, AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

Schmunis, GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 102(Suppl. D): 75-85, 2007.

Segura, M, Mollina, Deraspi, Basombria, MA. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic *Trypanosoma cruzi* infected mice after late tripanosomicidal treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 213 – 216, 1994.

Shikanai-Yasuda, MA, Lopes, MH, Tolezano, E, Umezawa, E, Amato-Neto, V, Barreto, AC, Higaki, Y, Moreira, AA, Funayama, G, Barone, AA. Doença de Chagas aguda: vias de transmissão, aspectos clínicos e resposta à terapêutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. *Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, 32(1): 16 – 27, 1990.

Silva, LHP and Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clin Biol*, 20, 191-208, 1953.

Sosa-Estani, S, Segura, EL, Ruiz, AMR, Velazquez, E, Porcel, BM, Yampotis, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in their determinate phase of Chagas disease. *Am J TropMedHyg*, 59(4): 526-529, 1998.

Sosa Estani, S, Segura, E. Tratamiento de la infección por *T. cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización actual en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 59:166–170, 1999.

Streiger, ML, Barco, ML, Fabbro, D.L, Arias, ED, Amicone, NA- Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,37: 365-375, 2004.

Suasnabar, DF, Arias, E, Streiger, M, Piacenza, M, Ingaramo, M, Del Barco, K, Amicone, N. Evolutionary behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo*, 42(2): 99 – 109, 2000.

Torrico, F. Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene 2013 E1224 -- results of proof-of-concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease. Available from: <http://www.dndi.org/about-us/our-people/team/354-media-centre/press-releases/1700-e1224>. Html

Urbina, JA, Payares, G, Sanoja, C. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents* 2003;21:27-38

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

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

Vichnewski, W., Sarti, S.J., Gilbert, B., Herz, W. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. *Phytochemistry*, 15, 191-193, 1976.

Viotti, R, Vigliano, C, Armenti, H, Segura, E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Heart J.*127, 151-162, 1994.

Viotti, R, Vigliano, C, Lococo, B, Bertocchi, G, Petti, M, Alvarez, MG, Postan, M, Armenti, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724-734, 2006.

WHO. Control of Chagas disease. WHO technical report series 905, World Health Organization, Geneva, 2002.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva, 2010.

WHO. Media Centre, fact sheet N°340, World Health Organization, Geneva. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM and Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(13):5022-5027, 2008.

Zili, Z, Souad, S, Fessi, H. Preparation and characterization of poly-ε-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm*, 294, 261-267, 2005.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AJ. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054. 2009.