



Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



**Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido
ascórbico no tratamento da doença de Chagas experimental**

Maiara Voltarelli Providello

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MAIARA VOLTARELLI PROVIDELLO

**Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no
tratamento da doença de Chagas experimental**

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MAIARA VOLTARELLI PROVIDELLO

**Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no
tratamento da doença de Chagas experimental**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 21/07/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Providello, Maiara Voltarelli

Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no tratamento da doença de Chagas experimental. Ribeirão Preto, 2022.

p.78: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: de Albuquerque, Sérgio.

1. Ácido ascórbico 2. Benznidazol 3. Doença de Chagas 4. Estresse oxidativo 5. Regime *drug-sparing*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maiara Voltarelli Providello

Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no
tratamento da doença de Chagas experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção
do Título de Doutora em Ciências.

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos os meus professores, da pré-escola à pós-graduação, vocês influenciaram minha trajetória.

Dedico ainda aos meus alunos, vocês me incentivam a ser uma pessoa melhor a cada dia!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Sérgio de Albuquerque, que me acolheu de braços abertos. Foram sete anos trabalhando juntos e certamente levarei comigo muito de seus ensinamentos. Você é sabedoria, paciência e empatia em forma de mestre. Admiro muito sua maneira leve de ver a vida e agradeço por transmitir isso a seus orientados. O meio acadêmico precisa de mais pessoas como você!

Ao meu coorientador, professor Dr. Carlos Renato Tirapelli, agradeço a oportunidade e a confiança em mim depositada. Serei eternamente grata pelos ensinamentos transmitidos e pela palavra que trazia esperança nos momentos em que os experimentos davam errado ou os artigos eram negados. Se hoje sou muita mais madura cientificamente falando, lhe devo muito!

Aos meus pais, Josiane e Fernando, obrigada pelo apoio e alicerce. Me lembro desde muito pequena o incentivo ao estudo e a leitura que sempre recebi, isso foi essencial na minha caminhada. Na idade adulta, sempre pude contar com a ajuda sem precedentes. Não estaria aqui sem vocês.

Ao meu marido Fernando! Em todos esses anos seu incentivo foi essencial. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei, obrigada por tornar os dias mais leves, os monstros menores e as alegrias amplificadas.

Matheus, meu irmão! Ao seu lado enxergo o quanto é gratificante e um ato de responsabilidade ser exemplo para alguém. Isso me faz seguir em frente e tentar ser melhor a cada dia.

A pós-doutoranda, Dra. Gisele Bulhões Portapilla, amiga, companheira de laboratório, parceira para todas as horas! Você dedicou/dedica a mim o bem mais precioso que um indivíduo possui: o TEMPO. Tempo para o trabalho e para a vida pessoal. Evolui muito através da sua amizade, te guardo sempre comigo.

A todos os companheiros do laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, que jamais citaria nomes pois esqueceria de muitos. Ao longo destes anos, foram tantas pessoas especiais que, seja pela ajuda com experimentos infundáveis ou por um café na cantina, tornaram a trajetória menos árdua.

A Dra. Carla Brigagão Pacheco da Silva, Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi e sua técnica Lilian, pela ajuda com os experimentos.

Aos professores Dr. José Clóvis do Prado Júnior e Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão, pelos ensinamentos transmitidos na rotina diária.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, Cristiana e Georgius, pela enorme ajuda na execução deste e de outros trabalhos.

Aos funcionários da FCFRP-USP, pela ajuda com os trâmites da pós-graduação.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante a pós-graduação, cada um à sua maneira, me ensinaram muito e moldaram quem sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e CNPq (Processo 142136/2019-0). Agradeço pelo fomento a essa pesquisa.

Por fim e não menos importante, agradeço a Deus pela sabedoria, discernimento e pelas maravilhosas oportunidades que concede a mim todos os dias!

“The success of an intervention depends on the interior condition of the intervenor.”

Bill O’Brien

RESUMO

PROVIDELLO, M. V. **Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no tratamento da doença de Chagas experimental.** 2022. 78f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A doença de Chagas afeta hoje, aproximadamente, sete milhões de pessoas em todo o mundo. Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), a patologia compreende os estágios agudo e crônico. As manifestações em órgãos-alvo, como coração e trato digestivo, são consequência da persistência parasitária nos tecidos deflagrando uma intensa resposta inflamatória com consequente aumento do estresse oxidativo. Atualmente, o tratamento se baseia no uso de dois compostos nitroheterocíclicos, benznidazol (BZ) e nifurtimox, estando apenas o primeiro disponível no Brasil. Estudos recentes demonstraram que o BZ reduz a carga parasitária, mas falha em, de fato, curar a infecção ou combater danos teciduais previamente instaurados. Com isso, a demanda por novas opções terapêuticas torna-se essencial e considerando as décadas em que o desenvolvimento de novas moléculas vêm falhando, a pesquisa com BZ em novos protocolos terapêuticos (regimes *drug-sparing*), associados ou não a outras substâncias, parece promissora. Nesse estudo, foi avaliado o papel tripanocida e antioxidante bem como os possíveis efeitos tóxicos de uma baixa dose de BZ (25mg/kg/dia) associada a duas doses de ácido ascórbico (aa =7,14 mg/kg/dia e AA=88,1 mg/kg/dia). Camundongos *Swiss* fêmeas e a cepa Y de *T. cruzi* foram usadas em modelos agudo e crônico de infecção. Os resultados demonstraram que, de modo geral, usar uma baixa dose de BZ pode reduzir alguns efeitos tóxicos da terapia e o tratamento combinado com o antioxidante trouxe melhorias em ambas as fases da doença, seja aumentando a atividade tripanocida ou melhorando o controle *redox*. Em especial durante a fase crônica, as terapias associadas promoveram também a redução nos títulos de anticorpos, o que pode indicar benefícios em longo prazo. Juntos, esses achados reforçam a necessidade de se explorar variações nos protocolos terapêuticos empregando BZ e que o ácido ascórbico poderia atuar como um adjuvante no tratamento da infecção chagásica, provendo melhorias nas fases aguda e crônica da doença.

Palavras-chave: Ácido ascórbico; benznidazol; doença de Chagas; estresse oxidativo, regimes *drug-sparing*; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

PROVIDELLO, M. V. **Study of the trypanocidal and antioxidant effects of ascorbic acid in the experimental Chagas disease treatment.** 2022. 78f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Chagas disease affects approximately seven million people worldwide. The pathology is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and comprises the acute and chronic stages. Manifestations in target organs, such as the heart and digestive tract, are a consequence of parasite persistence in tissues, triggering an intense inflammatory response and an increase in oxidative stress. The treatment is based on two nitroheterocyclic compounds, benznidazole (BZ) and nifurtimox, with only the first being available in Brazil. Recent studies have shown that BZ reduces the parasite load, but fails to cure the infection or reverse the established tissue damage. In this sense, the demand for new therapeutic options becomes essential, especially because there are some decades in which the development of new molecules has been failing and the research using BZ in new therapeutic protocols (drug-sparing regimens), associated or not with other substances, seems promising. In this study, the trypanocidal and antioxidant roles as well as the possible toxic effects of a low dose of BZ (25mg/kg/day) associated with two doses of ascorbic acid (aa = 7.14 mg/kg/day and AA= 88.1 mg/kg/day) were evaluated. Female Swiss mice and the Y strain of *T. cruzi* were used in acute and chronic models of infection. The results showed that a low dose of BZ can reduce some toxic effects of the therapy and the combined treatment with the antioxidant brought improvements in both stages of the Chagas disease, either by increasing trypanocidal activity or improving redox control. During the chronic phase, combined therapies also promoted a decrease in antibody titers, a data that may indicate long-term benefits. Taken together, these findings reinforce the need to explore alternatives in therapeutic protocols using BZ and ascorbic acid could act as an adjuvant in the treatment of *T. cruzi* infection, providing improvements in the acute and chronic phases of the disease.

Keywords: Ascorbic acid; benznidazole; Chagas disease; drug-sparing regimen; oxidative stress; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Carlos Chagas (1879-1934).	2
Figura 2. Carlos Chagas (à direita) junto com Berenice, primeiro caso humano detectado pelo médico, e sua mãe (à esquerda).	3
Figura 3. Efeitos das espécies reativas de oxigênio na infecção por <i>T. cruzi</i> . A geração de ERO promove efeitos protetivos como também deletérios ao hospedeiro e é apontada como parte importante na patogênese da doença.	10
Figura 4. Estrutura química de (A) benznidazol e (B) nifurtimox.	11
Figura 5. Estrutura química do ácido ascórbico.	14
Figura 6. Delineamento experimental de fase aguda.	26
Figura 7. Delineamento experimental de fase crônica.	26
Figura 8. Parasitemia. Animais infectados com 1×10^4 formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) tiveram a parasitemia avaliada nos dias 5, 7, 9, 11 e 13 pós-infecção. Os dados foram calculados pelo método de Brener. (A) Curva parasitêmica demonstrando a evolução da infecção aguda para todos os grupos experimentais comparando-os estatisticamente ao grupo CI (três símbolos representam $p < 0,0001$). <i>Two-way</i> ANOVA seguido por Bonferroni. (B) Representação e análise parasitêmica dos dias 9 e (C) 11 pós-infecção. As barras mostram a média \pm EPM de 5-7 animais/grupo. <i>One-way</i> ANOVA seguido por Bonferroni ($p < 0,05$). (*) Representa diferença estatística em relação a CI; (&) em relação a BZ25.	37
Figura 9. Quantificação de material genético de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco. A análise foi realizada por qPCR após 17 dias de infecção. Os resultados obtidos foram normalizados usando o gene controle gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e representados em n° de cópias de <i>T. cruzi</i> /10 ² GAPDH. As barras representam média \pm EPM. <i>One-way</i> ANOVA post hoc Bonferroni ($p < 0,05$). (*) representa diferença estatística em relação a CI e (&) em relação a BZ25.	38
Figura 10. Ganho de peso durante a fase aguda. O ganho de peso em gramas foi representado em (A) 9° dia pós-infecção e (B) 17° dia pós-infecção. <i>One way</i> ANOVA seguido por Bonferroni. Média \pm EPM e a análise estatística foram representadas nas figuras. Foi considerado um valor de $p < 0,05$ para a comparação estatística entres os grupos. (#) Representa diferenças significativas para o grupo CT.	39
Figura 11. Análise do peso relativo do coração e dosagem de CK-MB. (A) Peso do coração/corpo. Ao final da experimentação, os animais foram pesados antes da eutanásia e após, tiveram o peso do coração averiguado. A relação entre estes valores foi determinada. Os dados foram representados em mg/g. (B) Dosagem de CK-MB plasmática. Para obtenção do plasma o sangue foi colhido com heparina por punção cardíaca. As barras demonstram média \pm EPM. <i>One-way</i> ANOVA <i>post-hoc</i> Bonferroni. (#) representa diferenças significativas quando comparado ao grupo CT; (*) comparado ao grupo CI.	40
Figura 12. Determinação do peso relativo do fígado e dos níveis plasmáticos de transaminases. (A) Relação peso do fígado/corpo (mg/g). No gráfico foi demonstrada a média obtida para cada grupo e cada símbolo representa um animal. (B) Dosagem plasmática de ALT e (C) AST. Os resultados foram expressos em U/L e as barras demonstram média \pm EPM de 5-8 animais/grupo. A análise estatística da figura foi demonstrada por símbolos: (#) representa diferenças significativas para o grupo CT; (\$) para o grupo BZ100. <i>One-way</i> ANOVA seguido de <i>post hoc</i> Bonferroni.	42

Figura 13. Análise do peso relativo dos rins e determinação dos níveis plasmáticos de creatinina. (A) Peso dos rins/corpo. Animais experimentais tiveram o peso de seus rins normalizados pelo peso corporal (mg/g). Na figura cada símbolo representa o valor obtido para um animal e a média é representada pela barra horizontal. (B) Dosagem de creatinina plasmática. No gráfico foram representadas a média \pm EPM de cada grupo (5-8 animais/grupo). *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni foi usado em ambos os testes para a comparação entre os grupos, considerando a diferença significativa quando $p < 0.05$43

Figura 14. Efeitos da infecção e/ou terapias empregadas na produção de superóxido, concentração de peróxido de hidrogênio e atividade das enzimas SOD e CAT em homogenatos de ventrículo esquerdo. Níveis cardíacos de (A) $O_2^{\bullet-}$ (B) H_2O_2 e a atividade enzimática de (C) SOD e (D) CAT foram representadas na figura. Média \pm EPM de 5-8 animais/grupo ($p < 0.05$; ANOVA *post hoc* Bonferroni). Diferenças estatísticas foram demonstradas por símbolos: (#) em relação ao grupo CT; (*) grupo CI (&) grupo BZ25 e (@) grupo BZ25+aa.45

Figura 15. Avaliação de danos oxidativos a lipídios e proteínas durante a infecção chagásica aguda. (A) A peroxidação lipídica foi mensurada após 17 dias de infecção pela quantificação de TBARS. (B) O conteúdo carbonil de proteínas foi dosado afim de avaliar danos oxidativos a esta biomolécula. Nas figuras foram representadas a média \pm EPM de 6-8 animais/grupo e a análise estatística que considerou significativo $p < 0.05$. *One-way* ANOVA e *post hoc* Bonferroni foram usados e as diferenças estatísticas foram representadas pelos símbolos: (#) comparação ao grupo CT; (*) grupo CI; (&) grupo BZ25; (@) grupo BZ25+aa e (\$) BZ100.47

Figura 16. Avaliação do ganho de peso de animais experimentais durante o processo de cronificação e durante o tratamento. (A) Camundongos foram pesados ao início da experimentação e após 30, 60 e 90 dias da infecção. Resultados demonstrados em (g). (B) Ganho de peso durante o tratamento. Resultado (em gramas) obtido pela subtração do peso ao fim do tratamento (dia 105) e ao início (dia 90). Gráficos demonstram média \pm EPM de 6-8 animais/grupo. *Two-way* ANOVA foi aplicado na figura A e *One-way* ANOVA na figura B, para ambos *post hoc* Bonferroni. (*) representa diferença estatística em relação a animais não infectados. Dois símbolos: $p < 0.01$; três símbolos: $p < 0.0001$49

Figura 17. Determinação do peso relativo do coração, da infecção tecidual cardíaca e dosagem de CK-MB. A análise foi conduzida após 90 dias de cronificação, seguidos de 15 dias de tratamento, totalizando 105 dias da infecção. (A) Relação peso do coração/ peso corporal. (B) Determinação dos níveis parasitários no tecido cardíaco por qPCR. Os resultados foram expressos em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. (C) Determinação plasmática da isoenzima CK-MB. Na figura foi representada a análise estatística conduzida por *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni. Foi considerado significância estatística quando $p < 0.05$. (*) Representa diferença estatística em relação ao grupo CI.51

Figura 18. Avaliação do peso relativo e carga parasitária do baço. Animais cronicamente infectados por *T. cruzi* foram tratados por 15 dias. (A) Relação peso do baço/corpo, representado em mg/g. (B) Análise do parasitismo esplênico representada em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. *One-way* ANOVA seguido de *post-hoc* Bonferroni foi usado para avaliar estatisticamente os grupos experimentais. Média de 5-8 animais/ grupo. (#) representa diferença estatística em relação ao grupo CT.52

Figura 19. Averiguação da relação peso do fígado/corpo, parasitismo tecidual hepático e dosagem plasmática de transaminases. (A) Determinação do peso relativo do órgão ao final da experimentação, expresso em mg/g (B) Quantificação de DNA parasitário realizada por

qPCR. Resultados demonstrados em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. (C) Determinação de AST e (D) ALT no plasma dos animais em experimentação. Na figura foi demonstrada a média ±EPM de 5-8 animais/grupo e a análise estatística considerando p<0.05. *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni. (f) representa significância estatística quando comparado ao grupo AA.....53

Figura 20. Determinação do peso relativo dos rins e níveis plasmáticos de creatinina. (A) Relação peso dos rins/corpo, expresso em mg/g após 105 dias de infecção. (B) Dosagem de creatinina. Resultado representado em mg/dL. *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni foi usado para comparação estatística e diferenças entre os grupos foram representadas por símbolos: (#) comparação ao grupo CT. Média ±EPM de 5-8 animais/grupo.55

Figura 21. Determinação de ERO e atividade de enzimas antioxidantes em modelo crônico de infecção. (A) Avaliação da geração de superóxido, avaliada por quimioluminescência da lucigenina. (B) Concentração plasmática de peróxido de hidrogênio. (C) Análise da atividade da enzima superóxido dismutase e (D) catalase. Na figura, foi demonstrado a média ±EPM e diferenças estatísticas foram representadas por símbolos: (#) em relação ao grupo CT; (*) grupo CI; (&) grupo BZ25 e (\$) grupo BZ100.....56

Figura 22. Avaliação de danos oxidativos a lipídios e proteínas em modelo crônico de infecção. As análises foram realizadas no plasma após 105 dias de infecção, sendo 90 dias de cronificação e 15 dias de tratamento (A) Peroxidação lipídica determinada pela quantificação de TBARS. (B) Carbonilação de proteínas pela técnica de reação ao DNPH. Nas figuras foram representadas a média±EPM de 6-8 animais/grupo e a análise estatística que considerou significativo p<0.05. ANOVA *post hoc* Bonferroni foi usado e as diferenças estatísticas foram representadas pelos símbolos: (#) comparação ao grupo CT; (*) grupo CI e (\$) BZ100.....58

Figura 23. Detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* pela técnica de ELISA. A análise foi conduzida em amostras de soro de animais cronicamente infectados após o término das terapias. Uma proteína recombinante correspondente a trans-sialidase (TS) de *T. cruzi* foi empregada e a diluição 1:8000 foi aplicada nas amostras. Na figura, foram demonstrados os valores médios de 5-6 animais/grupo. A análise estatística foi representada por símbolos: (#) representa significância estatística em relação a CT; (*) em relação a CI. *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni.60

Figura 24. Sumarização dos resultados de fase aguda. Os principais achados encontrados para os grupos BZ100, BZ25+aa e BZ25+AA foram representados na imagem. Os resultados foram categorizados em: atividade tripanocida, antioxidante e citotoxicidade.....63

Figura 25. Sumarização dos resultados de fase crônicos. Os principais achados encontrados para os grupos BZ100, BZ25+aa e BZ25+AA durante a fase crônica foram representados na imagem. Os resultados foram categorizados em: atividade tripanocida, antioxidante e citotoxicidade.64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e doses.....	25
Tabela 2. Primers utilizados na reação de qPCR.....	29
Tabela 3. Averiguação da parasitemia em uma amostra aleatória.	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo de tratamento empregado em pacientes chagásicos no Brasil de acordo com o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.....	12
---	----

LISTA DE ABREVIACOES

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CK-MB	Creatinoquinase fração MB
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPB	2,4-Dinitrofenilhidrazina
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathiona Peroxidase
GR	Glutathiona Redutase
GSSG	Glutathiona Oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NO	Óxido Nítrico
Nox	NADPH oxidase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical Superóxido
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
RO ₂ [•]	Radical Peroxil
SOD	Superóxido Dismutase
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
SUMÁRIO.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Doença de Chagas: um pouco de história.....	2
1.2 Um primeiro olhar: agente etiológico, mecanismos de transmissão e aspectos epidemiológicos.....	3
1.3 Compreendendo a doença: aspectos patogênicos.....	5
1.4 Estresse oxidativo na infecção por <i>T.cruzi</i> : vilão ou aliado?	7
1.5 Tratamento: estado-da-arte e compreensão dos desafios	10
1.6 Ácido ascórbico: muito mais que um antioxidante	13
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivos Gerais	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Substâncias avaliadas	24
4.2 Modelo experimental.....	24
4.3 Manutenção dos animais e ética	24
4.4 Delineamento Experimental de Fase Aguda	25
4.5 Delineamento Experimental de Fase Crônica	26

4.6 Parâmetros Avaliados.....	27
4.6.1 Curva parasitêmica	27
4.6.2 Ganho de Peso	27
4.6.3 Peso relativo dos órgãos	28
4.6.4 Quantificação da infecção tecidual por Real Time PCR (qPCR).....	28
4.6.5 Parâmetros Bioquímicos.....	29
4.6.6 Determinação da geração de superóxido por quimioluminescência da lucigenina	29
4.6.7 Mensuração da concentração de H ₂ O ₂ no tecido cardíaco e plasma	30
4.6.8 Avaliação da atividade enzimática da SOD	30
4.6.9 Avaliação da atividade da catalase	31
4.6.10 Mensuração dos níveis de TBARS.....	31
4.6.11 Quantificação de proteína carbonilada	32
4.6.12 Dosagem proteica	33
4.6.13 Detecção de imunoglobulina G (IgG) específica contra <i>T.cruzi</i> por <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i> (ELISA).....	33
4.7 Análise Estatística	34
5. RESULTADOS DE FASE AGUDA E DISCUSSÃO	36
5.1 Parasitemia	36
5.2 Parasitismo cardíaco	38
5.3 Ganho de peso	39
5.4 Avaliação do peso relativo do coração e dosagem plasmática de CK-MB	40
5.5 Avaliação do peso relativo hepático e dos níveis plasmáticos de transaminases.....	41
5.6 Avaliação do peso relativo dos rins e dos níveis plasmáticos de creatinina	43
5.7 Avaliação da geração de superóxido pela quimioluminescência da lucigenina e concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco.....	44
5.8 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no coração	46
5.9 Análise de peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas	47
6. RESULTADOS DE FASE CRÔNICA E DISCUSSÃO	48

6.1	Averiguação da parasitemia.....	48
6.2	Ganho de Peso	49
6.3	Análise anatômica e parasitológica do coração e níveis plasmáticos de CK-MB.....	50
6.4	Análise anatômica e parasitológica do baço.....	51
6.5	Análise anatômica e parasitológica do fígado e níveis plasmáticos de transaminases.....	52
6.6	Análise anatômica dos rins e níveis plasmáticos de creatinina	54
6.7	Avaliação da geração cardíaca de superóxido pela quimioluminescência da lucigenina e concentração plasmática de peróxido de hidrogênio.....	55
6.8	Determinação da atividade da SOD e CAT no plasma	57
6.9	Mensuração plasmática da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.....	57
6.10	Avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas anti- <i>T. cruzi</i>	59
7.	CONCLUSÃO.....	62
8.	SUPORTE FINANCEIRO	66
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	78
	Anexo 1. Autorização emitida pela CEUA	78



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: um pouco de história

Em 1909, o médico sanitarista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Figura 1) descrevia a doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*): Doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Tãmanha foi a magnitude de seu achado que, pela primeira vez na história, um único pesquisador fora capaz de caracterizar a doença bem como suas manifestações clínicas, seu agente etiológico, vetor, reservatórios domésticos e silvestres, além de identificar animais de laboratório susceptíveis à infecção. A partir desta data, os vinte e cinco anos seguintes de sua carreira foram dedicados à pesquisa sobre essa patologia (BESTETTI; RESTINI; COUTO, 2016; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; STEVERDING, 2014).

Figura 1. Carlos Chagas (1879-1934).

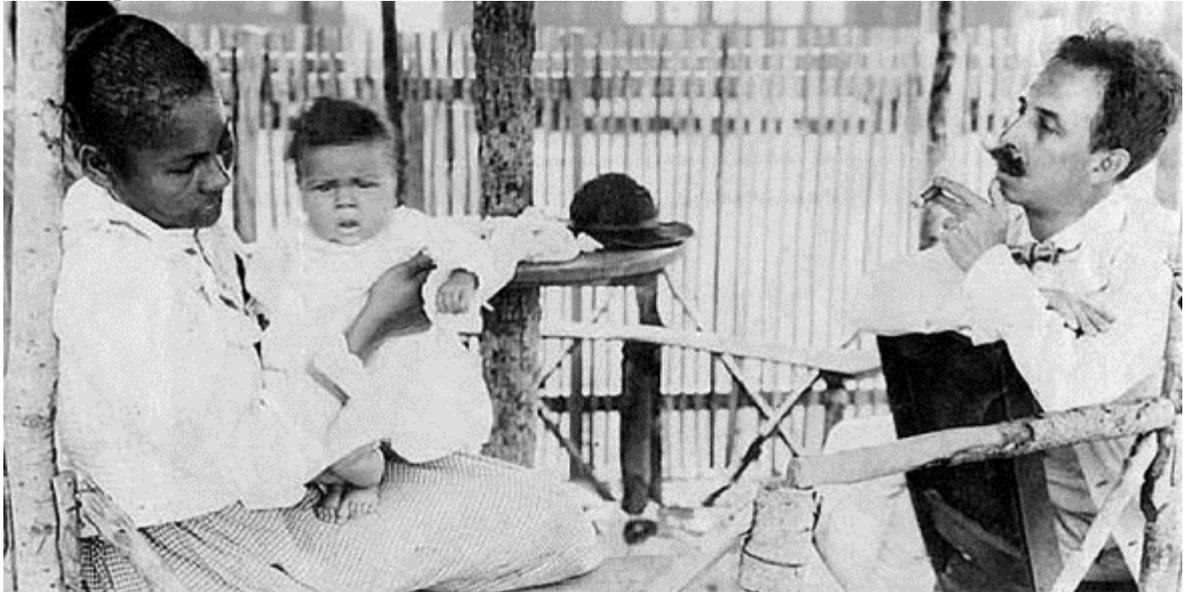


Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=151&sid=76>.

Apesar do raso reconhecimento internacional denotado à Carlos Chagas ao longo dos anos, em maio de 2019, durante a 72^o Assembleia Mundial da Saúde, estabeleceu-se o dia 14 de abril como o Dia Mundial da doença de Chagas. A data marca o dia em que em 1909, o médico brasileiro diagnosticou o primeiro caso humano da doença, a menina Berenice, de dois anos de idade (Figura 2). A singela homenagem mesmo que 110 anos depois, oferece à comunidade global uma maior visibilidade não apenas aos impactos à saúde, mas também aos

efeitos psicossociais e econômicos dessa doença há muito negligenciada (WHO, 2020; OPAS/WHO, 2022).

Figura 2. Carlos Chagas (à direita) junto com Berenice, primeiro caso humano detectado pelo médico, e sua mãe (à esquerda).



Fonte: Chao, Leone e Vigliano (2020).

1.2 Um primeiro olhar: agente etiológico, mecanismos de transmissão e aspectos epidemiológicos

Acerca do agente etiológico, *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida que possui um complexo ciclo de vida, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados (VELASCO; MORILLO, 2020).

Os triatomíneos (Ordem Hemiptera, Família Reduviidae), popularmente conhecidos como “barbeiros”, atuam como hospedeiros invertebrados e são reconhecidas 157 espécies, das quais 3 são fósseis, pertencentes a 18 gêneros capazes de albergar o protozoário. Dentre estes, os gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* são considerados os principais responsáveis por transmitir a doença a humanos, dada a sua maior adaptação à ambientes domésticos e peridomésticos (ALEVI *et al.*, 2020; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; DIAS, J. C. P.; COURA; YASUDA, 2014; GORLA; NOIREAU, 2017; OLIVEIRA CORREIA *et al.*, 2022). Quanto aos hospedeiros vertebrados, estima-se que *T. cruzi* seja capaz de infectar aproximadamente 100 espécies mamíferas distintas (JIMÉNEZ *et al.*, 2019; TIBAYRENC; TELLERIA, 2010; ZINGALES *et al.*, 2014).

No ciclo natural da infecção, o triatomíneo se infecta ao realizar o repasto sanguíneo em um mamífero contaminado. A ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas dá início a uma série de transformações sofridas por *T. cruzi* neste hospedeiro. No trato digestivo dos insetos, as formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas, capazes de multiplicar-se por sucessivas divisões binárias, o que contribui para a migração dessas formas para a porção final do tubo digestivo do inseto, onde será iniciado o processo de metaciclogênese. A metaciclogênese inclui diversas modificações em nível molecular no protozoário, relacionadas primordialmente a virulência, uma vez que, os tripomastigotas metacíclicos gerados serão capazes de infectar as células mamíferas (DE GODOY *et al.*, 2012). Essa infecção ocorre por um novo repasto sanguíneo, onde o triatomíneo libera as formas metacíclicas em suas excretas e, em contato com mucosas ou qualquer injúria tecidual preexistente ou decorrente da picada do inseto instaura-se a infecção do hospedeiro vertebrado (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; STEVERDING, 2014).

Após infectar as células do hospedeiro mamífero, *T. cruzi* sofre uma nova modificação, originando as formas amastigotas, que se multiplicam também por divisão binária. Na célula infectada, após alguns ciclos de divisão, o parasito sofre nova modificação gerando as formas tripomastigotas sanguíneas que são móveis e acabam por romper a membrana celular para alcançarem a circulação sanguínea e infectarem novas células (BONNEY *et al.*, 2019).

Esta via de transmissão, dita vetorial, representa nos dias atuais importante papel em países endêmicos, entretanto, a patologia pode ser transmitida também pela via congênita, por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, via oral através de alimentos e bebidas contaminados ou por meio de acidentes laboratoriais. Estes diferentes mecanismos de transmissão, associados aos intensos movimentos migratórios ocorridos nas últimas décadas, conferiram um caráter global a doença de Chagas, chegando a países onde a transmissão pelo vetor é indetectável ou inexistente (COURA, 2014; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A ampla gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados justifica a vasta distribuição de *T. cruzi* pelas Américas, sendo de característica endêmica em 21 países na América Latina, incluindo o Brasil. Atualmente, estima-se que haja seis a sete milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo mais de um milhão delas no Brasil (WHO, 2022). Além disso, existem setenta e cinco milhões de pessoas sob o risco de contrair a doença que é a responsável por quatorze mil mortes anuais e representa uma perda de produtividade industrial estimada em mais de um bilhão de reais anualmente em nosso país (DNDi, 2022).

1.3 Compreendendo a doença: aspectos patogênicos

No que diz respeito a doença humana, o indivíduo infectado inicialmente desenvolve a chamada fase aguda, que corresponde a um período de aproximadamente quatro a oito semanas, marcada por diversos ciclos de replicação do protozoário com início em células próximas ao sítio de inoculação e consequente liberação de formas tripomastigotas na corrente sanguínea. Esse padrão de multiplicação e liberação de formas circulantes confere a característica marcante desta fase: a alta parasitemia. No entanto, de maneira geral, o estágio agudo é assintomático, o que dificulta o diagnóstico neste período. Quando há sintomas, estes geralmente são inespecíficos, como febre, mal-estar geral, dores de cabeça, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e linfocitose atípica (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017; TZIZIK; BORCHARDT, 2018).

Dentre a sintomatologia específica que pode ocorrer durante a fase aguda, embora incomum, destaca-se o sdoençainal de Romaña, um edema bpalpebral e unilateral que pode estar presente quando a penetração do parasito ocorre pela conjuntiva e o chagoma de inoculação, inflamação aguda que acomete a derme e hipoderme no local de inoculação do protozoário (TZIZIK; BORCHARDT, 2018).

Neste período a taxa de mortalidade é baixa, em torno de 5%, atingindo em maior número crianças e pacientes imunossuprimidos, com ressalva à infecção oral que apresenta altas taxas de mortalidade ainda neste estágio (BERN, 2015; TZIZIK; BORCHARDT, 2018; URBINA, 2010; YOSHIDA, 2008).

De maneira geral, a fase aguda resolve-se espontaneamente pela ação coordenada das respostas imunes inata e adaptativa e os pacientes evoluem para a fase crônica da doença (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Quando não tratados no período agudo, os pacientes permanecem infectados por toda vida, no entanto, a maioria nunca desenvolverá sintomas ou acometimento visceral e permanecerão na chamada forma crônica indeterminada da doença de Chagas. Considerada um bom prognóstico, este estágio caracteriza-se pelos seguintes parâmetros diagnósticos: sorologia e testes parasitológicos positivos, ausência de sinais e/ou sintomas, eletrocardiograma normal e inalterações morfofisiológicas em órgãos comumente afetados como coração, esôfago e cólon (BONNEY *et al.*, 2019).

Entretanto, alguns anos ou até mesmo décadas após a infecção, uma menor parte dos afetados, em torno de 30%, desenvolverá a forma crônica sintomática da doença (BONNEY *et al.*, 2019; VELASCO; MORILLO, 2020). A caracterização fisiopatológica dessa etapa dependerá da sintomatologia apresentada, podendo ser cardíaca, digestiva ou mista (cardíaca e digestiva) e essa variação parecer ter relação direta com a diversidade genética de *T. cruzi*, o

que lhe confere diferentes tropismos teciduais (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017; JIMÉNEZ *et al.*, 2019; ZINGALES *et al.*, 2012).

Independentemente da forma da doença apresentada pelos pacientes, ela causa danos morfológicos e funcionais aos órgãos supracitados, como consequência da destruição tecidual progressiva e substituição por tecido fibrótico (BONNEY *et al.*, 2019). A patogênese, apesar de não ser completamente elucidada, é amparada nos seguintes pilares: (I) multiplicação intracelular parasitária que, nesse estágio, é amplamente reduzida quando comparada a fase aguda, porém se mantém constante; (II) presença de um intenso infiltrado inflamatório local, com predomínio de produção de citocinas como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e outros mecanismos citotóxicos envolvendo células T CD8+ e; (III) elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que extrapola a capacidade *redox* do tecido, podendo levar a um quadro de estresse oxidativo “não-fisiológico” (*oxidative distress*). Existe ainda, a hipótese da autoimunidade que, defendida sob controvérsias, prevê a geração de autoanticorpos, dada a estimulação antigênica contínua ou a mimetização de proteínas hospedeiras (BONNEY *et al.*, 2019; DE BONA *et al.*, 2018; MATTOSO-BARBOSA *et al.*, 2017).

A forma cardíaca da doença de Chagas é a mais frequente e severa considerando sua morbidade e mortalidade. Uma vez instalada, os danos ao miocárdio são progressivos e culminam na destruição das fibras cardíacas com consequente disfunção sistólica do ventrículo esquerdo, arritmias e eventos tromboembólicos. Neste contexto patológico, os mecanismos de compensação cardíacos já não são capazes de suplantar as deficiências, culminando no quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), que se apresenta como causa frequente de óbitos entre os pacientes acometidos (BONNEY *et al.*, 2019; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Já a forma digestiva da doença é consequência da destruição do plexo mesentérico, que compromete a inervação inibitória e excitatória do trato digestivo. Embora todo o trato digestivo possa ser acometido, de glândulas salivares a reto, o esôfago e colón são os órgãos mais frequentemente afetados (DE OLIVEIRA, R. B.; MENEGHELLI, 1998; MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009; MEDINA-RINCÓN *et al.*, 2021; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Assim como na forma cardíaca, as alterações são morfológicas (megaesôfago e magacólon) e funcionais podendo levar a quadros graves de desnutrição e obstrução intestinal. Ainda, pesquisadores relatam que a chance de desenvolvimento de um carcinoma nos referidos órgãos, chega a ser 33 vezes maior nestes pacientes em relação a um indivíduo sadio (GULLO *et al.*, 2012; RASSI JR, RASSI & MARIN-NETO, 2010).

1.4 Estresse oxidativo na infecção por *T.cruzi*: vilão ou aliado?

Para melhor compreender o processo patogênico na doença de Chagas, o entendimento sobre o papel do estresse oxidativo na destruição tecidual torna-se fundamental.

Na década de 80, o pesquisador alemão Helmut Sies descrevia os primeiros achados sobre a bioquímica do estresse oxidativo. Nestes conceitos iniciais, Sies retratava o fenômeno como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma sinalização *redox* que comprometeria a homeostase e ocasionaria danos moleculares. O cientista já mencionava que o estresse oxidativo poderia correlacionar-se com a inflamação, carcinogênese e envelhecimento precoce (SIES, 1986).

Com os avanços científicos, o conhecimento sobre radicais livres e antioxidantes foram alavancados e confirmaram alguns dos achados de Helmut Sies. Atualmente, define-se os radicais livres como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, que podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pela quebra de uma ligação covalente. Essa instabilidade eletrônica confere-lhes alta reatividade, pois para estabilizar-se, ligam-se covalentemente a biomoléculas levando-as a oxidação (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HALLIWELL, 2013; VIÑA; BORRAS; GOMEZ-CABRERA, 2018).

Neste conceito de moléculas altamente reativas, surgem as espécies reativas de oxigênio (ERO), que são originadas pela redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2), gerando duas moléculas de água. O processo ocorre naturalmente em organismos aeróbios, seja pelo desvio de elétrons da cadeia respiratória durante o processo de produção de adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias ou ainda pela atividade de enzimas oxidantes presentes no organismo, como por exemplo as NADPH oxidases (NOXs), que oxidam a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (SIES; BERNDT; JONES, 2017; SIES; JONES, 2020).

Contudo, devido a configuração eletrônica do O_2 , a molécula tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). ERO inclui não só estes, mas também alguns de seus subprodutos como, por exemplo, o radical peroxil (RO_2^{\bullet}) e oxigênio *singlet* (SIES; JONES, 2020; TURRENS, 2004).

Com isso, estabelece-se que o termo ERO é amplo e abrange espécies que podem ser definidas como radicais livres ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também outras não-radicalares (H_2O_2 e oxigênio *singlet*). Em outras palavras, pode-se afirmar que todo radical livre derivado do

oxigênio é uma ERO, mas nem toda ERO é um radical livre (SIES; BERNDT; JONES, 2017; TURRENS, 2004).

Como previamente dito, a geração de ERO é inerente a organismos aeróbios. Pesquisadores indicam que tão logo o oxigênio começou a enriquecer a atmosfera, há aproximadamente 2,2 bilhões de anos, surgiram também as primeiras formas de vida aeróbia e possivelmente as ERO também já estavam presentes nestas. Com isso, acredita-se que a evolução só se deu pois estes intermediários reativos apresentavam funções fisiológicas nestes organismos e porque estes desenvolveram mecanismos antioxidantes que promoveram o equilíbrio permitindo tal evolução (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018).

A respeito das defesas antioxidantes, existem diferentes moléculas que protegem os sistemas biológicos dos efeitos tóxicos das reações *redox*. Antioxidantes endógenos são em sua maioria enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), mas existem ainda outras defesas endógenas não enzimáticas, como a glutathione (GSH), coenzima Q e ferritina. Por outro lado, existem também os antioxidantes exógenos que podem ser obtidos por meio da dieta como o ácido ascórbico (vitamina C), cobalamina (vitamina B₁₂), β-caroteno e flavonóides que representam alguns dentre a vasta gama de substâncias detentoras desta propriedade (LIGUORI *et al.*, 2018). De maneira geral, podemos elencar quatro mecanismos pelos quais os antioxidantes atuam: (I) sequestro de íons metálicos; (II) eliminação de intermediários reativos; (III) interrupção de reações em cadeia por radicais livres e (IV) reparo molecular de danos oxidativos (AGUILAR; NAVARRO; PÉREZ, 2016).

Sob a luz das recentes definições de ERO e sistemas antioxidantes, o próprio doutor Helmut Sies reviu sua concepção sobre estresse oxidativo, que hoje passa a ser definido como: “um desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, levando à interrupção da sinalização e controle redox e/ou danos moleculares” (SIES, 2021, p.01). Com isso, para que haja a diferenciação, o “desequilíbrio” fisiológico ganhou recentemente um novo nome: *eustress* oxidativo (SIES, 2021). E apesar de tratar-se de um conhecimento recente, já se sabe que as funções fisiológicas estão envolvidas em processos de sinalização e diferenciação celular, angiogênese e síntese proteica que seriam controlados por citocinas e alguns fatores de crescimento (SIES; JONES, 2020).

No entanto, o papel prejudicial do estresse oxidativo já parece ser melhor consolidado. Inflamações em geral, doenças degenerativas, câncer e obesidade são apenas alguns dos

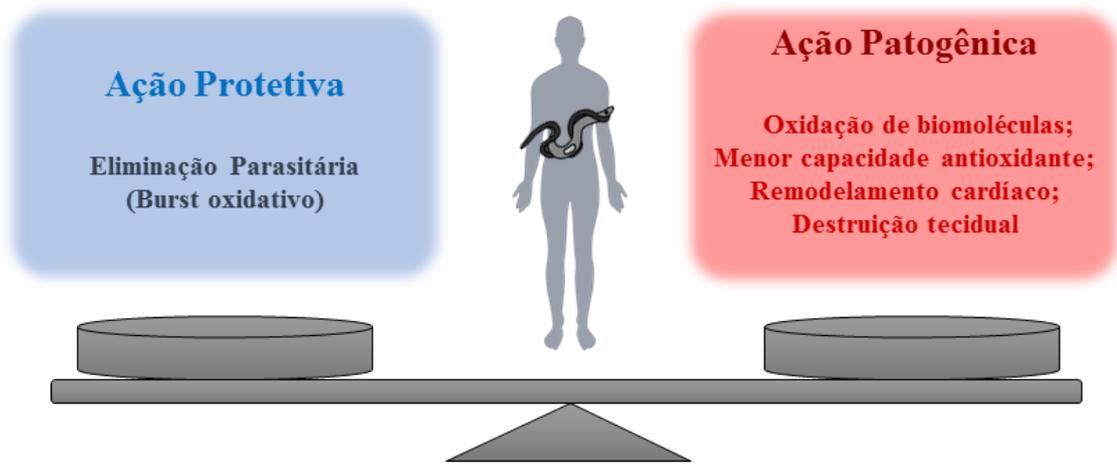
exemplos nos quais o estresse oxidativo poderia influenciar negativamente (LIGUORI *et al.*, 2018). E na doença de Chagas em especial, o estresse oxidativo é trazido como causa e consequência do dano tecidual.

Inicialmente, durante a fase aguda é sabido que a intensa multiplicação de *T. cruzi* desencadeia diversos estímulos em células fagocíticas que atuam aumentando a geração de espécies reativas na tentativa de controlar a infecção (*burst* oxidativo). O avanço da doença e o consequente acometimento dos tecidos promovem a exacerbada geração de ERO, especialmente pela sinalização que *T. cruzi* desencadeia nas mitocôndrias, especialmente por alterar o potencial de membrana destas e aumentar o desvio de elétrons pela cadeia transportadora (LOPEZ; TANOWITZ; GARG, 2018). As ERO originadas promovem dano direto pela oxidação de biomoléculas, mas também desencadeiam uma série de vias de sinalização que, indiretamente, causam danos ao DNA, lipídios e proteínas, além de inibir a expressão de algumas enzimas antioxidantes (BONNEY *et al.*, 2019).

Ademais, a presença do parasito no tecido, como já dito, desencadeia inflamação e destruição tecidual, sendo que ambos exacerbam a geração de intermediários reativos. Neste contexto, mesmo que a função constitutiva dessas moléculas seja promover a eliminação do patógeno, quando a exposição ocorre sistematicamente os efeitos danosos passam a ser percebidos.

A figura 3 representa resumidamente os efeitos protetivos e patogênicos do aumento na geração de espécies reativas desencadeada pela infecção por *T. cruzi*.

Figura 3. Efeitos das espécies reativas de oxigênio na infecção por *T. cruzi*. A geração de ERO promove efeitos protetivos como também deletérios ao hospedeiro e é apontada como parte importante na patogênese da doença.



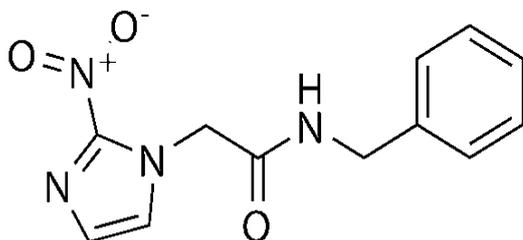
Fonte: Autoria própria.

1.5 Tratamento: estado-da-arte e compreensão dos desafios

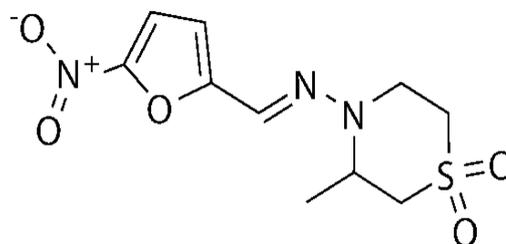
Tão logo se deu a descoberta da doença de Chagas, tiveram início inúmeras pesquisas buscando compostos que atuassem como agentes tripanocidas. No entanto, foram décadas marcadas por experiências frustradas e resultados dúbios até o surgimento de dois compostos nitroheterocíclicos, o Benznidazol (BZ) em 1966 e o Nifurtimox (NFX) em 1970, que foram empregados como terapias para a doença de Chagas (Figura 4) (CASTRO; DEMECCA; BARTEL, 2006).

Figura 4. Estrutura química de (A) benznidazol e (B) nifurtimox.

A) Benznidazol



B) Nifurtimox



Fonte: PubChem adaptado. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benznidazole> e <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6842999>.

Na época, não havia compreensão acerca do mecanismo de ação desses compostos e atualmente, apesar do conhecimento de alguns alvos moleculares, pesquisadores acreditam que a atividade biológica de BZ e NFX ainda não foi totalmente elucidada. Ambos atuam como pró-fármacos que, após sofrerem bioativação, produzem uma série de intermediários reativos, os radicais nitro reduzidos, apontados como os responsáveis pela ação anti-*T. cruzi* dos fármacos (FRANCISCO *et al.*, 2020; VIOTTI *et al.*, 2009).

A nível parasitário, enzimas nitroredutases localizadas nas mitocôndrias de *T. cruzi* geram os metabólitos reduzidos. Para BZ, a atividade biológica é fundamentada em propriedades mutagênicas destes produtos, que atuam a nível molecular inibindo a síntese de algumas proteínas e comprometendo certos mecanismos de reparo ao DNA. Além disso, promovem geração exacerbada de ERO que levam a oxidação de biomoléculas. Por outro lado, os intermediários gerados pela metabolização de NFX parecem interagir com o oxigênio molecular e desencadear a produção de radicais superóxido que, por sua vez, oxidam estruturas vitais para o parasito (FRANCISCO *et al.*, 2020; HALL; WILKINSON, 2012).

Já no hospedeiro humano, enzimas do sistema citocromo P450 participam da biotransformação dos compostos. Este processo ocorre majoritariamente no fígado e desencadeia a geração dos mesmos metabólitos altamente instáveis. Com isso, biomoléculas são igualmente oxidadas, fundamentando a toxicidade denotada as substâncias (CASTRO; DEMECCA; BARTEL, 2006).

Por isso, muitos efeitos colaterais são associados ao tratamento, sendo de maneira geral as manifestações cutâneas e gastrointestinais mais intensas para BZ, enquanto dor de cabeça, insônia, perda de peso e anorexia frequentemente são observados em pacientes

tratados com NFX. Tamaña é a frequência destas manifestações, observadas em até 90% dos indivíduos, que constantemente o tratamento é descontinuado (OLIVERA *et al.*, 2017; URBINA, 2010).

Quando comparados, NFX apresenta menor eficácia e maior toxicidade, fazendo com que seu uso fosse suspenso no Brasil e diversos outros países, nos quais o BZ se tornou a única alternativa terapêutica disponível (COURA, 2009). No entanto, algumas particularidades de BZ fazem com que este nem sempre seja empregado, como: a baixa efetividade em fase crônica (taxa de cura em torno de 8-15%); alta toxicidade em adultos (crianças apresentam melhor tolerabilidade) e existência de cepas resistentes ao fármaco.

Com isso, no Brasil estabeleceu-se um protocolo (Quadro 1) que norteia os médicos quanto ao seu uso:

Quadro 1. Protocolo de tratamento empregado em pacientes chagásicos no Brasil de acordo com o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.

Estágio da doença	Quem deve ser tratado^a	Taxa de cura
Fase aguda	Todos os casos*	Crianças/Adultos: 70-90% ^{b; e}
Fase crônica “recente” (até doze anos de infecção)	Todos os casos* ^{&}	Crianças: 50-60% ^{b; c}
Fase crônica “tardia”	-Mulheres em idade fértil; -Demais Casos: análise clínica individualizada	Adultos: 8-15% ^{b; d; e}
Doença congênita	- Recém-nascidos [#]	Recém-nascidos: >95% ^a

Fonte:^a(PINTO DIAS *et al.*, 2016); ^b(GUEDES *et al.*, 2011); ^c(PORCEL *et al.*, 1998);^d(ÁLVAREZ *et al.*, 2012);^e(VIOTTI *et al.*, 2006);^c(CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019).

Notas:*excluindo gestantes e lactantes; [&]normalmente esse estágio é atribuído a crianças até 12 anos, uma vez que no indivíduo adulto é difícil se estabelecer quando a infecção ocorreu; [#]o tratamento se dá nas primeiras semanas de vida.

Em 2015, Morillo e colaboradores publicaram o maior estudo clínico já realizado com BZ. Nele, aproximadamente 2800 pacientes com a cardiomiopatia chagásica, provenientes de

diversos países da América Latina, foram tratados ou não com BZ e foram acompanhados por um período de cinco anos. Os resultados revelaram que apesar da intervenção medicamentosa reduzir a carga parasitária, a deterioração cardíaca não pôde ser prevenida com o tratamento (MORILLO *et al.*, 2015). Neste sentido, a pesquisa reiterou a necessidade de se desenvolver novas alternativas terapêuticas para a doença.

Além das características apresentadas, o longo período de tratamento torna-se outro inconveniente. O paciente deve fazer o uso da medicação por sessenta dias, onde a dose diária pode ser dividida em duas a três tomadas (PINTO DIAS *et al.*, 2016). Há evidências científicas que suportam o fato de que a toxicidade do fármaco seja dose e tempo dependentes (NOVAES *et al.*, 2015; PEDROSA *et al.*, 2001) e embora alguns estudos vêm propondo regimes de tratamento que reduzam a dose e/ou o tempo de administração, os chamados regimes “*drug sparing*”, nenhuma alteração terapêutica foi, de fato, implantada na prática clínica (ÁLVAREZ, MARÍA GABRIELA *et al.*, 2016; BUSTAMANTE *et al.*, 2020; PEDROSA *et al.*, 2001).

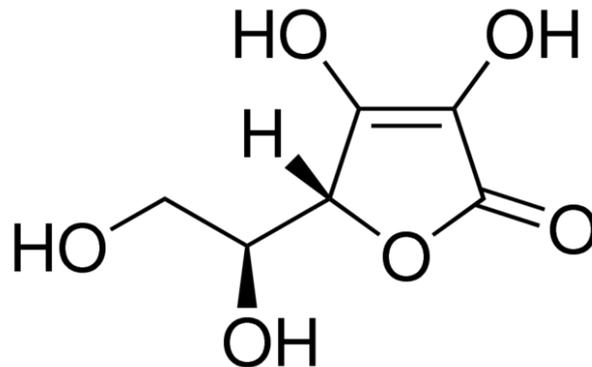
Dentre estes estudos, uma importante triagem clínica vem sendo conduzida. Intitulado BENDITA (do inglês, *Benznidazole New Doses Improved Treatment and Associations*) (Identificador *ClinicalTrials.gov*: #NCT03378661), o estudo propõe o uso de BZ em doses ou períodos reduzidos, sozinho ou em associação a outra substância que se encontra em fase clínica (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES, 2017). Atualmente, a pesquisa encontra-se em fase II e resultados preliminares ainda não foram divulgados.

Neste contexto, alterações no protocolo terapêutico de BZ, bem como associações a outras substâncias, parecem ser uma alternativa pertinente quando a busca por novos compostos não apresentou sucesso nas últimas cinco décadas.

1.6 Ácido ascórbico: muito mais que um antioxidante

Ácido ascórbico ou vitamina C (Figura 5) é uma substância orgânica e hidrossolúvel amplamente reconhecida por suas propriedades antioxidantes, sendo biossintetizada por plantas, fungos e diversos animais vertebrados e invertebrados (SMIRNOFF, 2018).

Figura 5. Estrutura química do ácido ascórbico.



Fonte: PubChem adaptado. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54670067>.

Curiosamente, ao longo da evolução, algumas espécies perderam a capacidade de produção da substância, como por exemplo algumas espécies de peixes, aves, morcegos e primatas, incluindo o homem. Isso porque, nessas espécies, o gene que codifica a enzima gulonolactona oxidase, responsável pelo passo final da produção da vitamina, sofreu mutações que o tornaram inativo. E a explicação mais plausível formulada por pesquisadores seria que a dieta dessas espécies animais já supriria as necessidades diárias de ácido ascórbico (DROUIN; GODIN; PAGE, 2011).

Em humanos, as funções fisiológicas do ácido ascórbico são diversas, atuando na síntese de colágeno, carnitina e adrenalina, participa da hematopoiese, auxilia na absorção do ferro, atua sobre os neurotransmissores dopamina e noradrenalina e, mais recentemente, foi demonstrado que enzimas atuantes em mecanismos de reparo ao DNA e regulação epigenética são dependentes de ácido ascórbico (DE TULLIO, MARIO C., 2012; MONFORT; WUTZ, 2013; SMIRNOFF, 2018).

Como descrito por Smirnoff (2018), o ácido ascórbico parece ser simultaneamente bem conhecido e surpreendentemente mal compreendido, o que confere um famoso paradoxo acerca de seu papel no estado *redox*. Afinal, seria essa substância um depurador de radicais livres ou *radical scavenger*, ou sua função seria pró-oxidante, intensificando a geração de intermediários reativos? Na verdade, ambas as afirmações podem ser consideradas verdadeiras.

A incontestável capacidade de doar elétrons da vitamina C, sendo assim um agente redutor, estabiliza eletronicamente radicais livres que poderiam oxidar componentes celulares, conferindo a sua função mais reconhecida: a de antioxidante. No entanto, o ácido ascórbico atua ainda, indiretamente, reativando a capacidade antioxidante de outros componentes como a vitamina E e a glutatona (DUARTE; LUNEC, 2005; SMIRNOFF, 2018).

Por outro lado, reações com íons metálicos Fe^{3+} e Cu^{2+} evidenciam as propriedades pró-oxidantes da substância, uma vez que estes íons reduzidos reagem com o oxigênio dando origem as ERO. Contudo, essas reações, em condições normais, favorecem a absorção do ferro pelo organismo e só poderiam ser consideradas prejudiciais quando em concentrações elevadas de ácido de ascórbico que ultrapassariam a capacidade antioxidante (DROUIN; GODIN; PAGE, 2011; DUARTE; LUNEC, 2005; MACAN; KRALJEVIĆ; RAIC-MALIĆ, 2019).

Num contexto terapêutico, a substância vem sendo aplicada em diversos estudos onde sua propriedade de *radical scavenger* é requerida. Patologias ou outras condições onde o estresse oxidativo é deflagrado, como o envelhecimento (MASAKI, 2010), câncer (CHEN *et al.*, 2008; DE TULLIO, M. C.; ARRIGONI, 2004; SHENOY *et al.*, 2018), doenças neurodegenerativas (MORETTI; FRAGA; RODRIGUES, 2017) e diabetes *mellitus* (DAKHALE; CHAUDHARI; SHRIVASTAVA, 2011; MASON *et al.*, 2019), são apenas alguns exemplos de situações onde o uso terapêutico de ácido ascórbico parece ter papel adjuvante as terapias rotineiramente aplicadas.

Em casos de infarto agudo do miocárdio, por exemplo, os benefícios da substância já são bem documentados. Nessa condição, é importante prevenir as lesões de reperfusão, termo que designa as alterações funcionais e estruturais decorrentes do reestabelecimento do fluxo cardíaco (LIU; ZENG; XU, 2022). Grande parte dessas alterações são promovidas pela geração exacerbada de ERO no tecido cardíaco, e o emprego do ácido ascórbico nesse estágio pode ajudar na preservação da função do miocárdio devido as suas propriedades antioxidantes (BHAKUNI; CHANDRA; MISRA, 2006; GAO, F. *et al.*, 2002).

Sabe-se que o ácido ascórbico também pode atuar como agente cardioprotetor, pois além dos benefícios na prevenção do estresse oxidativo a nível cardíaco, ele é capaz de prevenir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), além aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), molécula essencial na manutenção do tônus vascular (AGUIRRE; MAY, 2008; WANG *et al.*, 2020).

Diante dos benefícios cardiovasculares observados e considerando a natureza oxidativa da patogenia chagásica, a substância atraiu os olhares de pesquisadores que avaliam

seus efeitos na infecção por *T. cruzi*. Além disso, apesar de alguns trabalhos mostrarem efeitos positivos sob biomarcadores do estresse oxidativo (MAÇAO *et al.*, 2007), o uso da substância em associação ao benznidazol ainda foi pouco explorado.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a complexa fisiopatologia da doença de Chagas, que possui significativas alterações *redox* como uma das chaves no processo patogênico, associada a ineficácia e toxicidade da terapia atualmente empregada, surgiu a motivação deste trabalho.

A doença, que se tornou globalizada após os avanços na mobilidade social, desafia os pesquisadores na busca por novas alternativas terapêuticas, mesmo após 113 anos de sua descrição, uma vez que ela ainda continua sem um tratamento que seja, de fato, eficaz em ambas as fases aguda e crônica da infecção.

Por outro lado, os avanços de técnicas moleculares nos últimos anos forneceram maior compreensão sobre os mecanismos antioxidantes de *T. cruzi* que, apesar de não possuir algumas enzimas presentes nos mamíferos, apresenta, entretanto, outras várias que são comuns ao seu gênero (PIACENZA *et al.*, 2013). Ademais, atualmente, conhece-se mecanismos avançados de reparo ao DNA identificados neste protozoário (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016). Somados, esses fatores demonstram a maquinaria rebuscada do parasito em um ambiente oxidativo, que poderiam favorecer a sobrevivência parasitária à ação do sistema imune, bem como à ação de compostos antiparasitários (GUPTA; WEN; GARG, 2009; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

Neste contexto, alguns trabalhos vêm mostrando que *T. cruzi* poderia, inclusive, se beneficiar desta sobrecarga de espécies reativas desencadeadas pela infecção celular. A quebra do paradigma de que as ERO seriam “apenas” excelentes aliadas à depuração parasitária teve início quando alguns estudos mostraram que na presença de H₂O₂ ou de outros pró-oxidantes a multiplicação de *T. cruzi* poderia ser intensificada (GOES *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2012).

Por fim, estudos mostram que a intensa geração de ERO deflagrada pela infecção poderia ainda inibir alguns mecanismos antioxidantes do hospedeiro. A exemplo da citocina TNF- α , que pode diminuir a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e GPx ou inibir alguns fatores de transcrição, que reduzem a expressão de algumas das defesas enzimáticas. Estes dados sugerem que durante a infecção chagásica a resposta antioxidante hospedeira também não é ativada adequadamente (GUPTA; WEN; GARG, 2009; WEN, J. J.; PORTER; GARG, 2017)

Juntos, estes conceitos sugerem que na doença de Chagas o hospedeiro humano está constantemente susceptível a danos oxidativos enquanto o parasito, por outro lado, poderia ser parcialmente beneficiado. Por esta razão o uso de antioxidantes vem sendo amplamente estudado na terapia da doença.

Pesquisas utilizando o ácido ascórbico como uma alternativa terapêutica na doença de Chagas vêm sendo conduzidas, onde melhorias no quadro de estresse oxidativo puderam ser observadas. Maçao e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes crônicos tratados com vitamina C tiveram melhor atividade de enzimas antioxidantes e menor dano oxidativo à lipídios e proteínas. Entretanto, a literatura ainda carece de trabalhos que avaliem os efeitos da associação entre BZ e ácido ascórbico, determinando possíveis ações tripanocidas e antioxidantes dessa associação.

Este estudo ainda teve como motivação a crescente aplicação dos regimes “*drug-sparing*”, que têm por objetivo estudar os efeitos da diminuição do tempo de tratamento ou ainda, promover reduções na dose da terapêutica atual. Esses protocolos avaliam, por vezes, associações entre medicamentos que possam potencializar o efeito terapêutico dos tratamentos rotineiramente empregados. Seja para a infecção chagásica ou outras doenças onde, devido à dificuldade de se desenvolver novas terapias, explorar regimes “*drug-sparing*” parece ser um caminho encorajador quando a busca por novas terapias falha (BUSTAMANTE; TARLETON, 2014; VIOTTI *et al.*, 2009).

Neste sentido, esse estudo visou a continuidade de um trabalho do nosso grupo de pesquisa, que avaliou um protocolo de tratamento para a fase aguda com ácido ascórbico na dose 7,14 mg/kg/dia associado a BZ 10 mg/kg/dia (dose dez vezes inferior a dose clínica experimental) (PROVIDELLO *et al.*, 2018). Dentre os resultados obtidos, destacamos a potencialização do efeito tripanocida do fármaco quando este foi associado à vitamina C e a diminuição da inflamação cardíaca. BZ em associação ao antioxidante atenuou também alguns parâmetros oxidativos, como a concentração de ERO intracelular e a peroxidação lipídica no coração.

Com isso, a proposta deste novo trabalho foi promover algumas alterações nas doses previamente utilizadas, usando ainda uma dose reduzida de benznidazol, com o propósito de atenuar a citotoxicidade do fármaco e conseqüentemente, diminuir seus efeitos colaterais. Quando associamos o medicamento ao ácido ascórbico nosso objetivo foi avaliar se o uso concomitante das substâncias reduziria o dano oxidativo e aumentaria a depuração parasitária.

Em suma, ao avaliar ambas as fases da doença, a proposta desse trabalho foi analisar a atividade tripanocida, antioxidante e a toxicidade dos tratamentos propostos.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial tripanocida e antioxidante de duas diferentes doses de ácido ascórbico, associadas ou não a uma dose reduzida de benznidazol, em modelo experimental de fase aguda e crônica da doença de Chagas.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito tripanocida dos tratamentos propostos no desenvolvimento da infecção *in vivo*, analisados por meio do estabelecimento de uma curva parasitêmica, determinação do parasitismo tecidual e dosagem de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*;
- Compreender se as terapias propostas podem atuar sobre enzimas antioxidantes, mensurando a atividade de SOD e CAT;
- Avaliar os efeitos da infecção e das terapias empregadas nos níveis de radical superóxido e peróxido de hidrogênio;
- Determinar danos a biomoléculas relacionados ao estresse oxidativo que podem ser desencadeados pela infecção, como a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas e averiguar se os tratamentos propostos interferem nestes parâmetros;
- Mensurar possíveis efeitos citotóxicos relacionados às terapias estudadas por meio de parâmetros bioquímicos que determinem função hepática, renal e cardíaca, além da análise do peso relativo dos órgãos.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias avaliadas

Ácido ascórbico foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA) e benznidazol foi obtido do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco- LAFEPE (Recife, PE, Brasil). Para BZ, a dose clínica experimental para camundongos foi utilizada como controle (100 mg/kg/dia), além de uma dose reduzida de 25 mg/kg/dia, que foi testada isoladamente ou em associação ao ácido ascórbico. Essa dosagem reduzida foi escolhida a partir de estudos prévios que demonstraram a capacidade de BZ reduzir a parasitemia e o parasitismo tecidual, além de aumentar a sobrevivência em modelo murino (CEVEY *et al.*, 2016).

Para o ácido ascórbico, duas doses foram determinadas, uma de 7,14 mg/kg/dia e outra de 88,1 mg/kg/dia. A primeira dosagem foi estabelecida por estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, cujo resultado demonstrou melhorias nos parâmetros oxidativos quando o ácido ascórbico foi associado à BZ, além do efeito da atividade tripanocida do fármaco ter sido potencializado em, aproximadamente, 21% (PROVIDELLO *et al.*, 2018).

Por outro lado, a maior dose de ácido ascórbico foi explorada pela primeira vez, com o objetivo de alcançar melhorias nos resultados. Para sua obtenção, considerou-se o cálculo da área de superfície corporal (Body Surface Area- BSA), que abrange aspectos como utilização de oxigênio, gasto calórico, volume sanguíneo e função renal dos diferentes modelos experimentais (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007). Para camundongos, a dose obtida a partir desse cálculo (88,1 mg/kg/dia) equivale a 500 mg/dia para um indivíduo adulto de 70 kg.

4.2 Modelo experimental

Camundongos *Swiss* fêmeas, com cinco semanas de idade, foram usados nesse estudo (21 ± 3 g) e a linhagem do parasito utilizada foi a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA, 1953).

4.3 Manutenção dos animais e ética

Animais foram mantidos em rack ventilada Alesco® (Monte Mor, SP, Brasil) em mini isoladores (32 x 20 x 21cm), sendo alimentados com água e ração comercial *ad libitum*. A sala possui ciclo 12h claro/12h escuro com temperatura constante de 22°C. Todos os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei 11.974/08 e

aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob o número #17. 1.989.60.4 (ANEXO 1).

4.4 Delineamento Experimental de Fase Aguda

Os animais foram infectados intraperitonealmente com 1×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, obtidas a partir do sangue de camundongos previamente infectados mantidos no Laboratório de Parasitologia para manutenção da cepa, através de passagens semanais.

Estes animais foram divididos em 8 grupos como demonstrados na tabela 1.

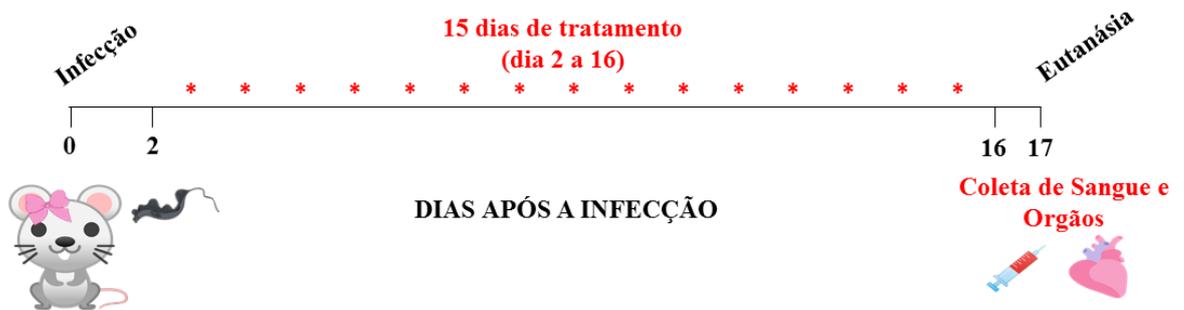
Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais com seus respectivos tratamentos e doses.

Grupos	Número de Animais	Infecção	Tratamento
Grupo CT (Controle)	n=13	Não infectados	Água + 5% DMSO (veículo de diluição)
Grupo CI (Controle infectado)	n=13	Infectados	Água + 5% DMSO (veículo de diluição)
Grupo aa	n=13	Infectados	Ácido ascórbico 7,14 mg/kg/dia
Grupo AA	n=13	Infectados	Ácido ascórbico 88,1 mg/kg/dia
Grupo BZ25	n=13	Infectados	Benznidazol 25 mg/kg/dia
Grupo BZ25+aa	n=13	Infectados	Benznidazol 25 mg/kg/dia + ácido ascórbico 7,14 mg/kg/dia
Grupo BZ25+AA	n=13	Infectados	Benznidazol 25 mg/kg/dia + ácido ascórbico 88,1 mg/kg/dia
Grupo BZ100	n=13	Infectados	Benznidazol 100 mg/kg/dia

Dois dias após a infecção dos animais em experimentação, iniciou-se o tratamento que durou quinze dias (Figura 6). Os animais foram tratados via oral, por gavagem, sendo as

substâncias administradas em um volume de 100 μL /animal/dia. As substâncias foram diluídas em água filtrada e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Figura 6. Delineamento experimental de fase aguda.



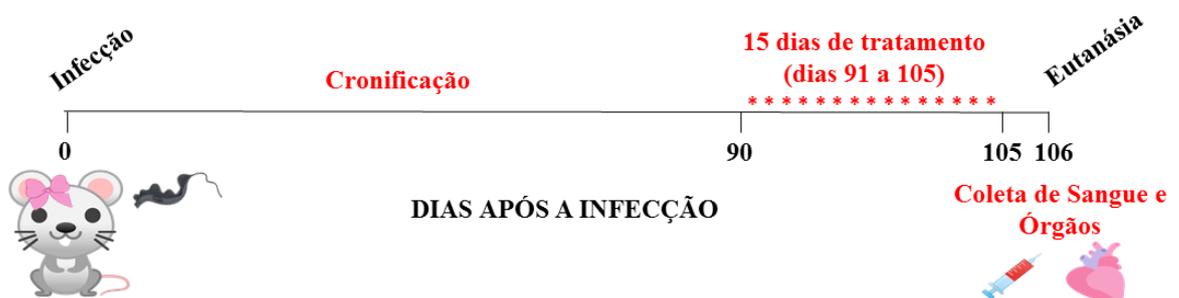
Passado esse período os animais foram mortos por exsanguinação com anestesia prévia de cetamina (80 mg/kg-1) e xilazina (8 mg/kg-1) e tiveram sangue, coração, fígado, baço e rins colhidos para avaliação.

4.5 Delineamento Experimental de Fase Crônica

Para os ensaios de fase crônica, a mesma linhagem murina e cepa parasitária foram empregadas. No entanto, aqui os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, obtidas como previamente citado no tópico 4.4.

A divisão dos grupos experimentais se deu exatamente como na fase aguda (Tabela 1). Após a infecção os animais foram mantidos durante 90 dias, para a cronificação da doença (figura 7). Nesse período, a parasitemia de uma amostra aleatória dos animais (n=10/dia) foi averiguada a partir do dia 9 para a confirmação da infecção.

Figura 7. Delineamento experimental de fase crônica.



Decorridos os 90 dias, iniciou-se o tratamento com duração de quinze dias. Os animais foram igualmente tratados pela via oral, sendo as substâncias administradas em um volume de 100 µL/animal/dia. Os compostos foram diluídos em água filtrada e 5% de DMSO.

Ao término do tratamento, os animais foram mortos por exsanguinação com anestesia prévia de cetamina (80 mg/kg⁻¹) e xilazina (8 mg/kg⁻¹) e tiveram sangue, coração, fígado, baço e rins colhidos para avaliação.

4.6 Parâmetros Avaliados

Foram conduzidos dois experimentos independentes, sendo que todos os parâmetros abaixo descritos foram repetidos ao menos duas vezes (duplicata).

4.6.1 Curva parasitêmica

Com o objetivo de avaliar a influência dos tratamentos propostos sob o desenvolvimento da doença na fase aguda de infecção, a construção de uma curva parasitêmica foi realizada. Para isso, 5 µL de sangue foi colhido da cauda de cada animal em experimentação, a cada 48 horas a partir do 5º dia após a infecção (5º, 7º, 9º, 11º e 13º dias). O sangue foi então colocado sobre uma lâmina e recoberto por lamínula (22 x 22 cm), seguido de contagem de parasitos em 50 campos feita pela observação direta ao microscópio óptico (aumento final de 400 vezes). A quantificação parasitária foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (BRENER, 1962). Os resultados foram expressos em número de parasitas/mL.

4.6.2 Ganho de Peso

Os animais em experimentação foram avaliados quanto ao ganho de peso, como medida de avaliar o bem-estar animal, assim como possíveis efeitos tóxicos das drogas. Estudos prévios demonstraram que a perda de peso em animais infectados por *T. cruzi* pode ser observada já em fase aguda e poderia correlacionar-se a um mau prognóstico (BILATE *et al.*, 2008). Para isso, nos protocolos de fase aguda, os camundongos foram pesados no início, durante e ao fim do tratamento. Enquanto que nos protocolos de fase crônica, os animais tiveram o peso averiguado no dia da infecção, 30, 60 e 90 dias após a infecção, bem como ao final do tratamento. Os dados foram representados em gramas (g).

4.6.3 Peso relativo dos órgãos

Coração, fígado, baço e rins dos animais tiveram o peso determinado ao fim das experimentações, com intuito de avaliar possíveis danos funcionais ou morfológicos da infecção ou dos protocolos de tratamento (SCARIM *et al.*, 2018). Os resultados foram normalizados em relação ao peso corporal e expressos em mg/g.

4.6.4 Quantificação da infecção tecidual por Real Time PCR (qPCR)

A quantificação da infecção nos tecidos foi realizada pela técnica de qPCR, com o propósito de determinar se a terapia em estudo poderia exercer influência no parasitismo do coração, fígado ou baço. Para isso, o tecido hepático, esplênico e cardíaco, tiveram seu DNA purificado a partir de 5 mg de tecido, extraído através do kit comercial *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* - Promega® (Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto a sua integridade por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 8.0).

Uma vez verificada sua integridade, o DNA foi quantificado utilizando Qubit™ Assay Kit – ThermoFisher Scientific® (Waltham, MA, EUA) e ajustado para a concentração de 10 ng/μL, utilizando *Nuclease-free water*- Promega® (Madison, WI, USA).

Uma curva-padrão com seis pontos foi construída por diluição seriada (1:10 – DNA: H₂O), a partir de DNA extraído de cultura de epimastigotas, em triplicata. A curva gera uma equação, através da qual é possível calcular posteriormente a quantidade de fitas de DNA presentes nas amostras, em função do Ct (indica o ciclo no qual a amostra iniciou a emissão de sinal fluorescente de amplificação).

Dois *primers* foram adotados na reação, as sequências *Cruzi 1* (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3') e *Cruzi 2* (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'), ambos na concentração 1 μM, que amplificam um produto de 166 pares de base (pb), como mostrado na Tabela 2. A reação foi realizada utilizando o kit *Master Mix SYBR™- KAPA Biosystems®* (Wilmington, MA, EUA) e amplificadas em placas de 48 poços, específicas para o termociclador *Eco Real-Time System* (Illumina®, San Diego, CA, EUA), em duplicata. Os resultados foram normalizados pelo controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e expressos n° de cópias de *T. cruzi*/GAPDH.

Tabela 2. Primers utilizados na reação de qPCR.

Primers	Sequência (5'-3')	Concentração (μM)	Amplicon(pb)	Posição
<i>Cruzi 1 (forward)</i>	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA	1	166	27–46
<i>Cruzi 2 (reverse)</i>	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	1	166	172–192

Notas: μ M: Micromolar; pb: pares de base

A metodologia empregada baseou-se em SCHIJMAN *et al.*, (2011) e PIRON *et al.*, (2007).

4.6.5 Parâmetros Bioquímicos

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações relacionadas à citotoxicidade que podem ser geradas pelos tratamentos em estudo ou mesmo pela infecção, parâmetros bioquímicos que avaliem a função hepática, cardíaca e renal foram avaliados.

Transaminases (ALT e AST), creatinina e creatinoquinase-MB (CK-MB) foram dosadas no plasma dos animais. Para isso, o sangue foi colhido por punção cardíaca fazendo uso do anticoagulante heparina e posteriormente centrifugado a 948 g por 5 minutos, para a obtenção do plasma.

As análises foram realizadas pelo uso de kits comerciais específicos (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as indicações do fornecedor. Os resultados foram expressos em U/L para ALT, AST e CK-MB e em mg/dL para creatinina.

4.6.6 Determinação da geração de superóxido por quimioluminescência da lucigenina

Esta técnica permite avaliar a produção de superóxido pela enzima NADPH oxidase, a fim de compreender possíveis mecanismos de ação dos tratamentos estudados. Para isso, parte do coração foi homogeneizado em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação é iniciada pela adição de NADPH (0,1

mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μ L) contendo amostra (50 μ L), lucigenina (5 μ mol/L) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de luminescência foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura no equipamento luminômetro *Orion II- Microplate Luminometer MPL4* (Berthold Detection Systems®, Pforzheim, Alemanha). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína de cada amostra e expressos em URL (unidades relativas de luz)/mg de proteína (YOGI *et al.*, 2012).

4.6.7 Mensuração da concentração de H₂O₂ no tecido cardíaco e plasma

Na tentativa de compreender possíveis mecanismos de ação pelos quais agem os tratamentos avaliados, foi analisada a concentração de peróxido de hidrogênio no coração dos animais em experimentação de fase aguda e no plasma para as amostras de fase crônica. O tecido cardíaco foi homogeneizado em solução de Krebs (130 mmol/L de NaCl; 4,7 mmol/L de KCl; 1,18 mmol/L de KH₂PO₄; 1,17 mmol/L de MgSO₄; 14,9 mmol/L de NaHCO₃; 5,5 mmol/L de Glicose; 1,6 mmol/L de CaCl₂; pH 7,4), e o homogenato foi centrifugado a 10.000 \times g por 5 minutos a 4° C. O H₂O₂ foi avaliado utilizando o kit *Amplex Red® Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay* (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). Para a montagem da placa, a cada 50 μ L do sobrenadante foi adicionado 50 μ L de uma solução de trabalho composta, basicamente, pelo reagente *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxi-pheNoxazine) e a peroxidase (HRP). O reagente *Amplex Red* na presença da peroxidase reage com o H₂O₂ presente em cada amostra, produzindo a resorufina, produto altamente fluorescente (λ excitação 571 nm e λ emissão 585 nm). Os valores de H₂O₂ foram obtidos a partir da construção de uma curva padrão de H₂O₂ e expressos em μ mol/L/mg proteína ou μ mol/L/mL. A metodologia foi baseada em DO VALE *et al.*, (2017).

4.6.8 Avaliação da atividade enzimática da SOD

Determinamos a atividade da SOD com o propósito de avaliar se as terapias propostas podem exercer efeito sob esta importante enzima antioxidante. Parte do tecido cardíaco das amostras de fase aguda foi homogeneizado em tampão PBS (pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 \times g por 12 min a 4° C. O kit *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado, onde o princípio do teste consiste na redução do oxigênio pela enzima xantina oxidase (XO) e hipoxantina presente no reagente, com consequente formação

de superóxido. Esta reação gera um produto cromogênico (formazan) que pode ser medido colorimetricamente por absorvância (440nm). Portanto, a quantidade de formazan formado é inversamente proporcional à atividade da enzima superóxido dismutase. Os valores foram representados por U/mg de proteína (DO VALE *et al.*, 2017). A mesma técnica foi implementada no plasma em amostras de fase crônica, onde o resultado foi expresso em U/mL.

4.6.9 Avaliação da atividade da catalase

A enzima catalase atua convertendo H_2O_2 em H_2O e O_2 (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Analisamos a atividade da catalase para entender se os protocolos terapêuticos em estudo exercem influência sob ela. Para o design de fase aguda, as amostras de coração foram homogeneizadas em tampão PBS (pH 7,4). Em seguida, em 100 μ L de amostra foram adicionados 100 μ L de tampão fosfato (pH 6,5, contendo 0,1 mol/L de K_2HPO_4) e centrifugados a $8.000 \times g$ por 20 min a 4° C. Para a realização do ensaio foram adicionados 20 μ L do sobrenadante da amostra a 980 μ L de solução de reação (2,5 mL de tampão Tris-EDTA, 47,3 mL de água Mili-q e 175,5 μ L de H_2O_2 (30 mmol/L) aquecida a 36° C e em cubetas de quartzo, onde a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi medida durante 60 segundos em 240nm. Os valores de absorvância foram multiplicados por $2,5 \times 10^3$, referente ao coeficiente de distinção do H_2O_2 e à diluição da amostra. Uma unidade (U) de catalase é definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μ mol de H_2O_2 /min/mg proteína (DO VALE *et al.*, 2018). Para o design experimental de fase crônica a análise foi realizada no plasma dos animais em experimentação.

4.6.10 Mensuração dos níveis de TBARS

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia de radicais livres com ácidos graxos poliinsaturados, que frequentemente é desencadeada pela oxidação destes lipídios por radicais hidroxil ($OH\bullet$), que são altamente reativos e danosos, podendo oxidar inespecificamente, não apenas os lipídios, mas grande parte das biomoléculas. A lipoperoxidação pode trazer sérios danos, especialmente as membranas celulares (SIES; JONES, 2020).

Esta reação de peroxidação dos lipídios gera intermediários que reagem entre si, formando diversos produtos secundários, como o malondialdeído (MDA), que é um importante biomarcador de dano a essa biomolécula. A técnica de TBARS dosa, portanto, a concentração deste marcador oxidativo e avalia a peroxidação lipídica (GONZAGA;

SIMPLICIO; TIRAPELLI, 2016). Verificamos, portanto, se os tratamentos propostos podem interferir neste parâmetro. Amostras de coração ou plasma foram empregadas. O tecido cardíaco foi homogeneizado com tampão RIPA, centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O ensaio consiste na medida colorimétrica (comprimento de onda de 530-540 nm) do complexo formado pela reação do MDAe o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob alta temperatura ($90\text{-}100^\circ \text{C}$) em meio ácido, utilizando kit comercial *Cayman Chemical* (Ann Arbor, MI, EUA). Valores maiores de TBARS são alcançados proporcionalmente à presença de maior quantidade de lipídeos poliinsaturados. Os valores foram representados como nmol/mg de proteína ou nmol/mL (DO VALE *et al.*, 2017; GONZAGA; SIMPLICIO; TIRAPELLI, 2016).

4.6.11 Quantificação de proteína carbonilada

Os danos oxidativos a proteínas são eventos que podem ocorrer por meio de reações diretas com ERO ou de maneira indireta, pela reação com alguns subprodutos formados pela peroxidação lipídica ou açúcares redutores. Poucas são as modificações proteicas derivadas do estresse oxidativo que podem ser reversíveis, de modo geral, a maioria delas leva à inativação de proteínas, o que tem efeitos prejudiciais a manutenção da viabilidade celular (DALLE-DONNE *et al.*, 2006). A carbonilação de proteínas representa uma das reações irreversíveis desse processo, onde o grupo carbonil formado caracteriza-se por ser estável constituindo assim um importante biomarcador de dano oxidativo proteico (DALLE-DONNE *et al.*, 2003; SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010). Neste sentido, esta análise baseou-se na reação dos grupos carbonil gerados com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A reação forma um produto denominado hidrazona que pode ser medido espectrofotometricamente. As análises foram conduzidas em tecido cardíaco e plasma, onde as amostras foram maceradas ou diluídas em tampão fosfato 50mM, contendo EDTA 1mM e inibidor de protease (pH 7,4). Às amostras foi acrescido uma solução de DNPH (10 mM) dissolvida em ácido clorídrico (HCl) 2N que foram incubadas no escuro por uma hora e vortexadas a cada 15 minutos. Após esse período, foram realizados sucessivos ciclos de lavagem e centrifugação com solução de ácido tricloroacético 20% e ácido tricloroacético 10% juntamente com etanol/acetato de etila (1:1). O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500 μL de hidrocloreto de guanidina 6M, sendo incubado sob agitação a 37°C por 15 minutos. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi finalmente transferido a uma placa de 96 poços e teve a absorvância medida no comprimento de onda de 385 nm. A concentração é obtida usando o coeficiente de absorção molar de $22.000 \text{ M}^{-1} / \text{cm}^{-1}$ (BRUNO

et al., 2009; LEVINE *et al.*, 1990). Os resultados foram expressos em nmol/mg de tecido ou nmol/mL de plasma.

4.6.12 Dosagem proteica

Para todas as análises executadas em tecido cardíaco, realizou-se a dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Bio- Rad Laboratories®, Hercules, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esta mensuração é necessária para que os resultados sejam normalizados de acordo com a quantificação proteica presente em cada amostra.

4.6.13 Detecção de imunoglobulina G (IgG) específica contra *T.cruzi* por *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)

A análise sorológica teve como objetivo avaliar possíveis alterações nos níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) específicas para *T. cruzi*. Na prática clínica, os testes sorológicos são usados para avaliar a eficácia terapêutica (PINTO DIAS *et al.*, 2016; CHATELAIN, 2017). Para isso, foi realizado um teste de ELISA utilizando como antígeno uma proteína recombinante correspondente a trans-sialidase (TS) de *T. cruzi*. A TS é ausente em mamíferos e no parasito atua no processo de invasão celular e na sobrevivência deste no hospedeiro. A obtenção e purificação da TS foi realizada a partir de células de *Escherichia coli*, como previamente descrito por Pereira-Chioccola *et al.*(2003). A pureza e integridade da TS foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com sódio dodecil sulfato -(SDS-PAGE) e sua concentração determinada pelo método de Bradford. Para a técnica de ELISA, placas de 96 poços foram revestidas com a TS recombinante a 2 µg/ml, diluída em PBS e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. O antígeno não ligado foi removido pela lavagem com PBS, seguido de bloqueio por PBS 3% albumina de soro bovino (BSA) e PBS Tween 0.05%. As amostras de soro foram diluídas em PBS 1% BSA nas concentrações 1:500; 1:2000; 1:8000 e 1:16000. Estas diluições foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 1 hora, seguido de lavagem com PBS Tween 0.05%. Foi então adicionado o anticorpo secundário anti-IgG *mouse* (Abcam®, Cambridge, Reino Unido), diluído em PBS 1% BSA (1:5000) e nova incubação de 1h à 37°C. Após um novo ciclo de lavagens PBS Tween 0.05%, a solução de substrato TMB (Ácido cítrico 0,1 M; Na₂HPO₄ 0,2 M; 3,3,5,5 tetrametilbenzidina 0,05%) foi adicionada e incubada no escuro por 2 minutos. A reação foi parada pela adição de H₂SO₄ 2N e teve a absorbância lida a 450 nm. Foi construída uma curva de diluição do soro, testando

as seguintes diluições: 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 e 1:32000. Determinou-se, então, a diluição 1:8000 como a máxima concentração necessária para a avaliação da resposta.

4.7 Análise Estatística

Os resultados do presente estudo foram avaliados por testes estatísticos com auxílio do software *GraphPad Prism* versão 7.05, utilizando-se média e erro-padrão dos dados obtidos. *One* ou *Two-Way* ANOVA foram utilizados para comparação entre os grupos experimentais, seguido de *post hoc* Bonferroni, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de *p* foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).



Perspicácia (René Magritte, 1936)

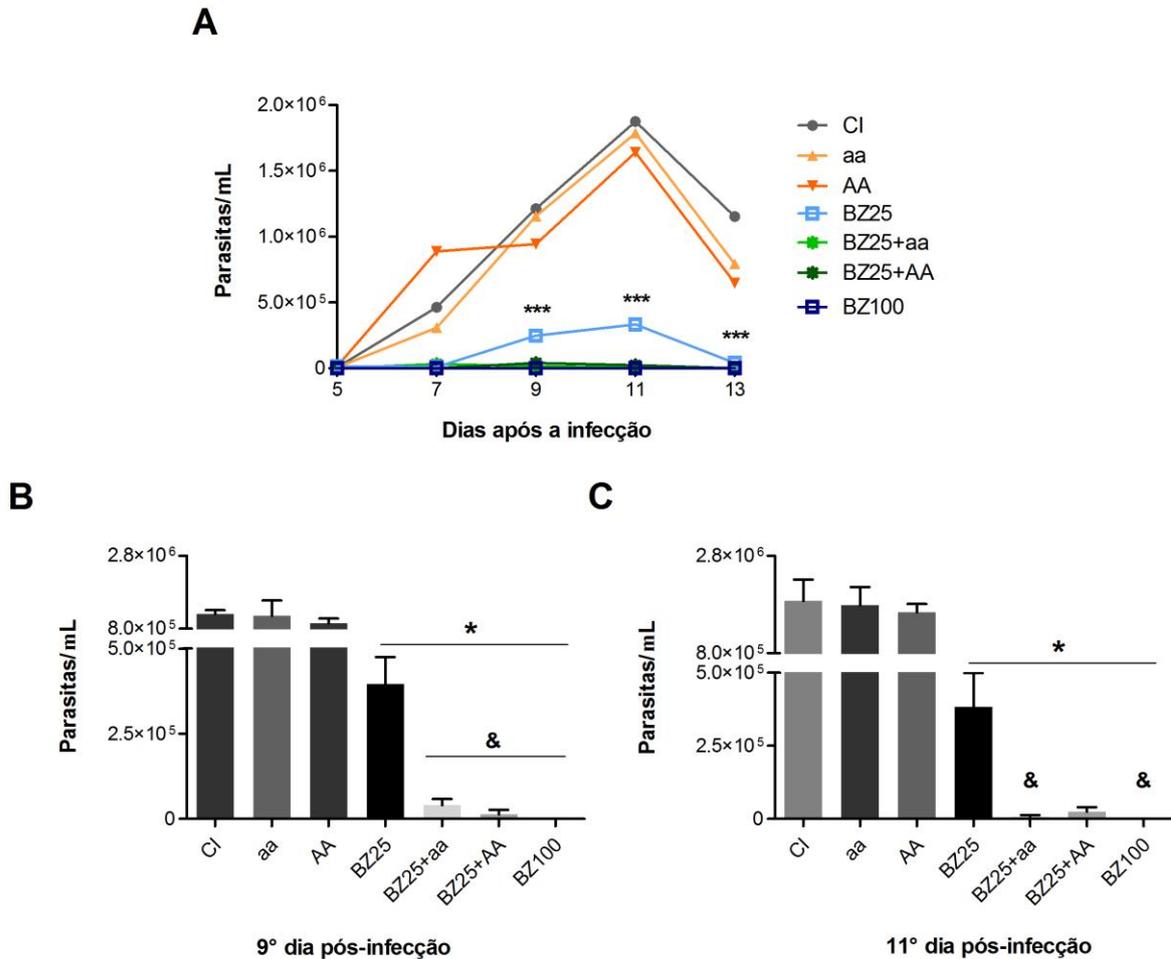
Resultados e discussão

5. RESULTADOS DE FASE AGUDA E DISCUSSÃO

5.1 Parasitemia

Uma curva parasitêmica foi construída a fim de avaliar o desenvolvimento da infecção durante a fase aguda. Na figura 8A é possível observar que o grupo tratado com benznidazol em ambas as doses, bem como as terapias combinadas, promoveram reduções significativas da parasitemia quando comparadas ao grupo controle infectado ($p < 0,0001$). Enquanto que a utilização de ácido ascórbico não associado, em menor ou maior dose, não promoveu redução no número de formas circulantes, quando comparado ao grupo controle infectado. Previsivelmente, BZ100 depurou a parasitemia.

Figura 8. Parasitemia. Animais infectados com 1×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) tiveram a parasitemia avaliada nos dias 5, 7, 9, 11 e 13 pós-infecção. Os dados foram calculados pelo método de Brener. (A) Curva parasitêmica demonstrando a evolução da infecção aguda para todos os grupos experimentais comparando-os estatisticamente ao grupo CI (três símbolos representam $p < 0,0001$). *Two-way* ANOVA seguido por Bonferroni. (B) Representação e análise parasitêmica dos dias 9 e (C) 11 pós-infecção. As barras mostram a média \pm EPM de 5-7 animais/grupo. *One-way* ANOVA seguido por Bonferroni ($p < 0,05$). (*) Representa diferença estatística em relação a CI; (&) em relação a BZ25.



Os dados parasitêmicos do 9° e 11° dias pós-infecção foram evidenciados e avaliados estatisticamente em 8B e 8C, respectivamente. Nota-se que no 9° dia pós-infecção, ambas as terapias combinadas reduziram a parasitemia mais eficientemente que BZ25 (Figura 8B); no entanto, no 11° dia pós-infecção apenas BZ25+aa promoveu uma redução estatisticamente significativa em relação a BZ25 (Figura 8C).

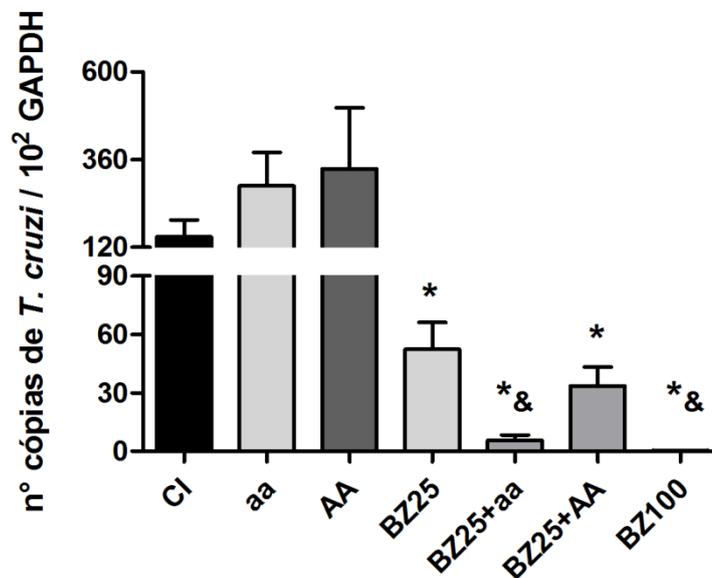
Nosso grupo demonstrou previamente que benznidazol na dose de 10 mg/kg/dia reduz a parasitemia em aproximadamente 41%, promove redução do parasitismo e a inflamação cardíaca (PROVIDELLO *et al.*, 2018). Enquanto Cevey *et al.* (2016) mostraram que animais tratados com BZ 25 mg/kg/dia apresentavam depuração do parasitismo tecidual e 100% de

sobrevivência. Assim, no presente trabalho, fomos movidos pela pretensão de aprimorar o tratamento anteriormente realizado, usando a dose de 25 mg/kg/dia e testando sua associação a duas diferentes doses de ácido ascórbico, uma vez que nossos dados prévios mostraram também que alguns parâmetros foram otimizados na terapia combinada.

5.2 Parasitismo cardíaco

A quantificação do parasitismo em tecido cardíaco na fase aguda foi realizada por meio de PCR em tempo real (qPCR) e os dados obtidos foram representados na Figura 9. Nota-se que os grupos CI, aa e AA apresentaram os maiores níveis de parasitismo tecidual, corroborando os dados observados na parasitemia.

Figura 9. Quantificação de material genético de *T. cruzi* no tecido cardíaco. A análise foi realizada por qPCR após 17 dias de infecção. Os resultados obtidos foram normalizados usando o gene controle gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e representados em n° de cópias de *T.cruzi*/10² GAPDH. As barras representam média ± EPM. One-way ANOVA post hoc Bonferroni (p<0.05). (*) representa diferença estatística em relação a CI e (&) em relação a BZ25.



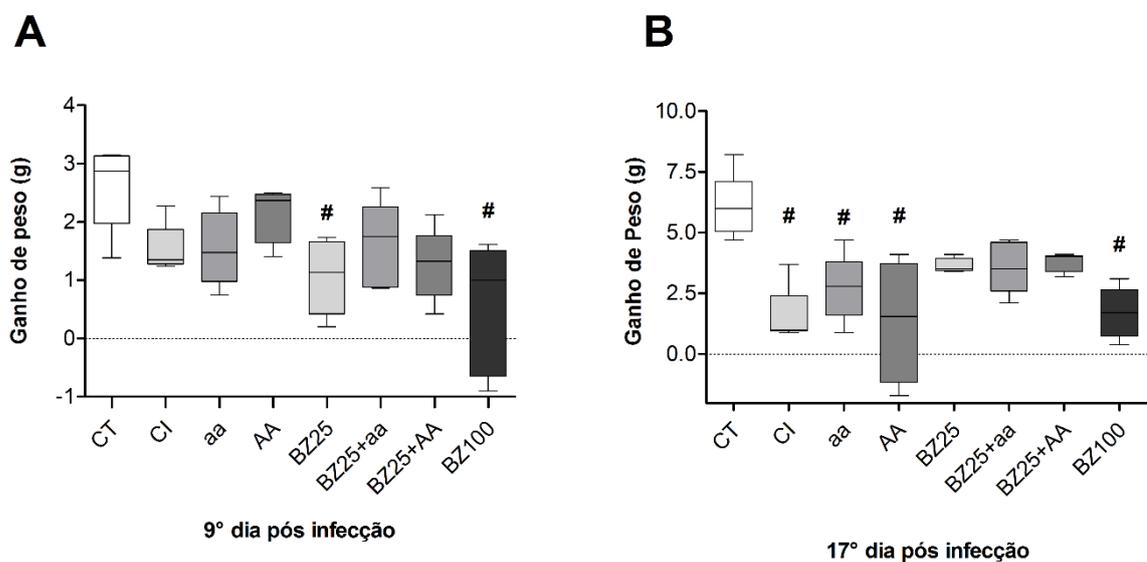
Por outro lado, BZ em maior ou menor dose, sozinho ou associado ao ácido ascórbico, promoveu redução na carga parasitária cardíaca em relação ao grupo controle infectado (CI). Em percentuais, BZ25 apresentou diminuição aproximada de 65%, em BZ25+AA houve redução média de 77% e a associação BZ25+aa teve 96% de redução no parasitismo cardíaco (todos comparados ao grupo CI).

Ainda, considerando a análise estatística, vimos que os valores médios observados em BZ25+aa e BZ100 são inferiores a BZ25 (p<0.05).

5.3 Ganho de peso

O ganho de peso nos grupos experimentais foi avaliado no 9° e 17° dia pós-infecção e foram representados nas figuras 10A e 10B, respectivamente. Observou-se que no 9° dia os grupos tratados com BZ25 e BZ100 tiveram ganho de peso inferior quando comparado ao grupo CT (Figura 10A).

Figura 10. Ganho de peso durante a fase aguda. O ganho de peso em gramas foi representado em (A) 9° dia pós-infecção e (B) 17° dia pós-infecção. *One way ANOVA* seguido por Bonferroni. Média \pm EPM e a análise estatística foram representadas nas figuras. Foi considerado um valor de $p < 0.05$ para a comparação estatística entres os grupos. (#) Representa diferenças significativas para o grupo CT.



Por outro lado, com o avanço da fase aguda, no 17° dia pós-infecção, os animais do grupo BZ25 parecem ter reestabelecido o ganho de peso, enquanto os grupos CI, aa e AA, bem como BZ100 demonstraram alterações negativas neste parâmetro (Figura 10B). De maneira complementar, a análise do 17° dpi revela que além de BZ25, as associações com ácido ascórbico apresentaram ganho de peso inalterado pela infecção.

Estes resultados demonstram que as terapias combinadas e a redução de dose trouxeram alguns benefícios quando comparadas ao tratamento com BZ100. A alteração observada nos animais tratados com a dose clínica experimental de BZ parece refletir possíveis efeitos tóxicos do medicamento, corroborando a um estudo no qual foi observado ganho de peso insuficiente em crianças chagásicas tratadas com o medicamento (RODRIGUEZ-GUERINEAU *et al.*, 2014).

Para Calvet *et al.* (2020), embora camundongos C57/B16 infectados com a cepa Sylvio X10/4 ganharam peso após o tratamento com BZ100, essa evolução se deu de maneira mais lenta. É provável que a discrepância neste parâmetro entre o presente estudo e o trabalho de

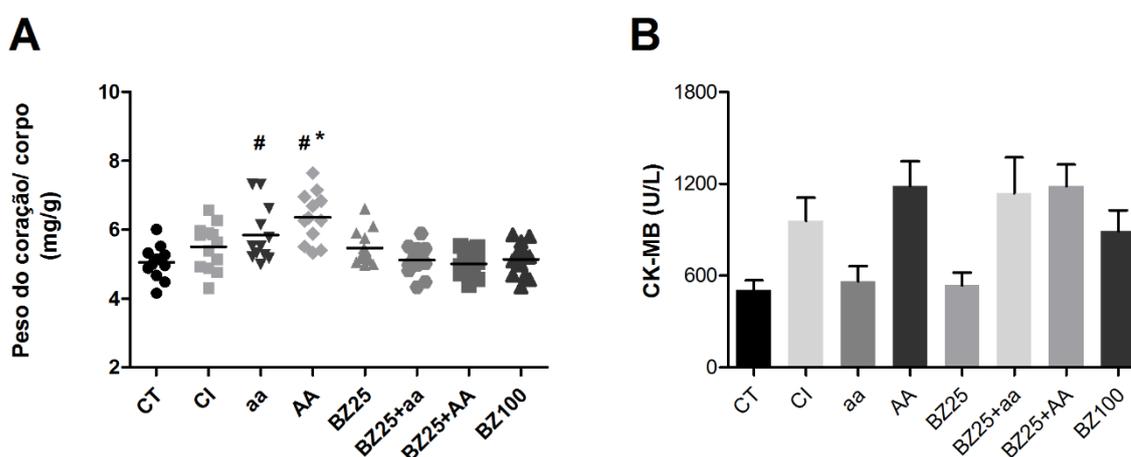
Calvet e colaboradores seja influenciada pela cepa parasitária utilizada; a cepa Y, utilizada neste estudo, é admitida como macrofagotrópica, produzindo infecção aguda e com rápida multiplicação (MELO; BRENER, 1978), enquanto a cepa Sylvio X10/4 é tida como de evolução mais lenta e parasitismo sub-patente durante a fase aguda (MARINHO *et al.*, 2009).

A perda de peso maior que 5% e perda de apetite também já foram relatadas em estudos clínicos avaliando o nifurtimox (FORSYTH *et al.*, 2016).

5.4 Avaliação do peso relativo do coração e dosagem plasmática de CK-MB

A análise da relação entre o peso do coração e o peso corporal evidenciou aumento nos grupos tratados apenas com ácido ascórbico, em ambos os protocolos de tratamento quando comparados ao grupo CT (Figura 11A). O grupo tratado com AA ainda apresentou maior peso cardíaco do que o grupo CI. Não houve diferenças significativas entre os demais grupos para esse parâmetro.

Figura 11. Análise do peso relativo do coração e dosagem de CK-MB. (A) Peso do coração/corpo. Ao final da experimentação, os animais foram pesados antes da eutanásia e após, tiveram o peso do coração averiguado. A relação entre estes valores foi determinada. Os dados foram representados em mg/g. **(B) Dosagem de CK-MB plasmática.** Para obtenção do plasma o sangue foi colhido com heparina por punção cardíaca. As barras demonstram média \pm EPM. *One-way ANOVA post-hoc Bonferroni.* (#) representa diferenças significativas quando comparado ao grupo CT; (*) comparado ao grupo CI.



Este resultado poderia indicar uma resposta dependente do tratamento com ambas as doses do antioxidante associada a infecção não controlada nestes grupos. Uma possível explicação seria a reconhecida habilidade do ácido ascórbico em aumentar a atividade endotelial da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e com isso deflagrar uma série de alterações na permeabilidade dos vasos (MAY, 2000). O aumento no peso relativo do

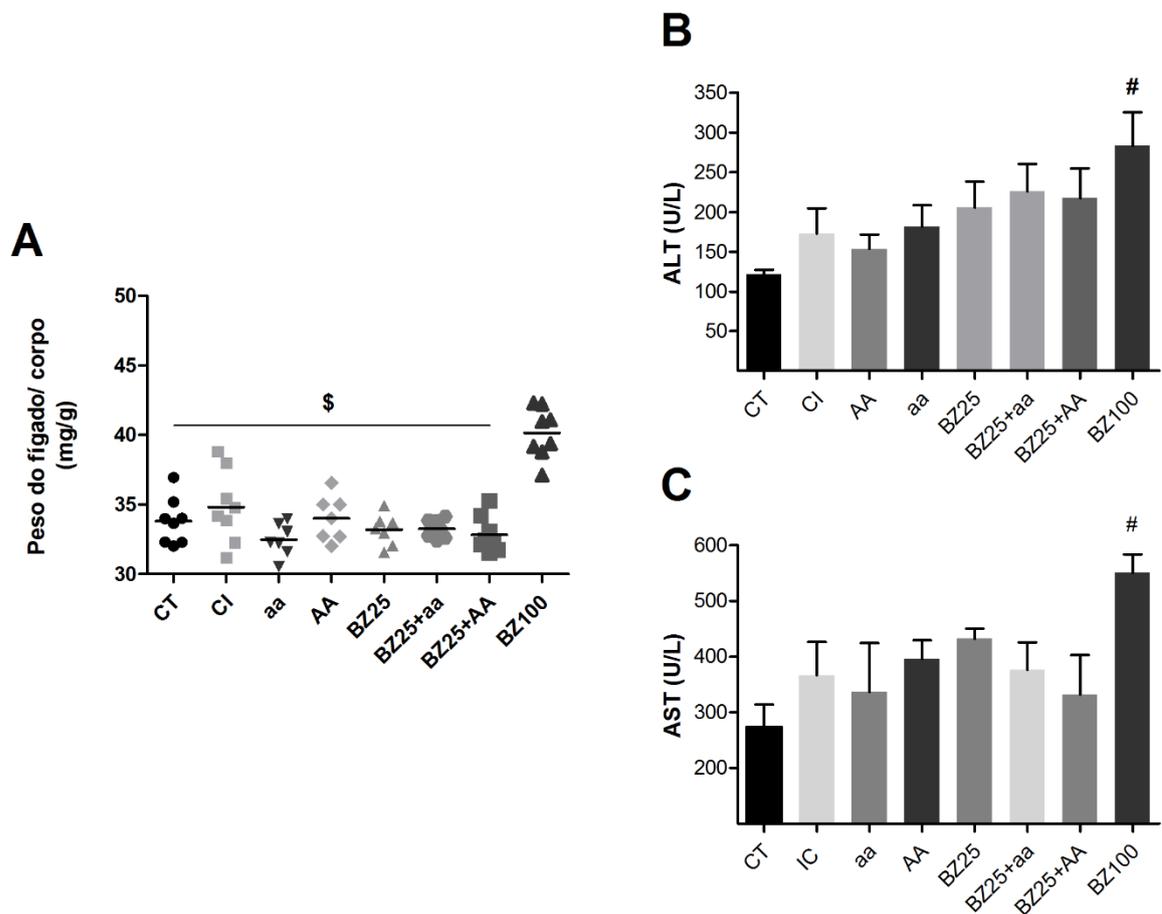
coração para os grupos tratados com ambas as doses do antioxidante seria consequência da maior permeabilidade vascular desencadeada, representando uma maior presença de infiltrado inflamatório local e consequente aumento do órgão.

No entanto, os níveis plasmáticos de CK-MB foram igualmente dosados e não demonstraram diferenças entre os grupos (Figura 11B).

5.5 Avaliação do peso relativo hepático e dos níveis plasmáticos de transaminases

A relação entre o peso do fígado e peso do corpo dos animais em experimentação foi calculada e representada na figura 12A. Observou-se que o tratamento com BZ100 aumentou o peso relativo hepático quando comparado aos demais grupos experimentais. A infecção por si parece não alterar este parâmetro, visto que não foram detectadas diferenças entre os grupos CT e CI.

Figura 12. Determinação do peso relativo do fígado e dos níveis plasmáticos de transaminases. (A) Relação peso do fígado/corpo (mg/g). No gráfico foi demonstrada a média obtida para cada grupo e cada símbolo representa um animal. (B) Dosagem plasmática de ALT e (C) AST. Os resultados foram expressos em U/L e as barras demonstram média \pm EPM de 5-8 animais/grupo. A análise estatística da figura foi demonstrada por símbolos: (#) representa diferenças significativas para o grupo CT; (\$) para o grupo BZ100. One-way ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni.



As transaminases ALT e AST tiveram seus níveis plasmáticos dosados e foram representados nas figuras 12B e 12C, respectivamente. Em ambas foi possível observar elevados índices para BZ100 quando comparado a CT. Por outro lado, entre os demais grupos não foi detectado diferenças significativas tanto para ALT quanto para AST.

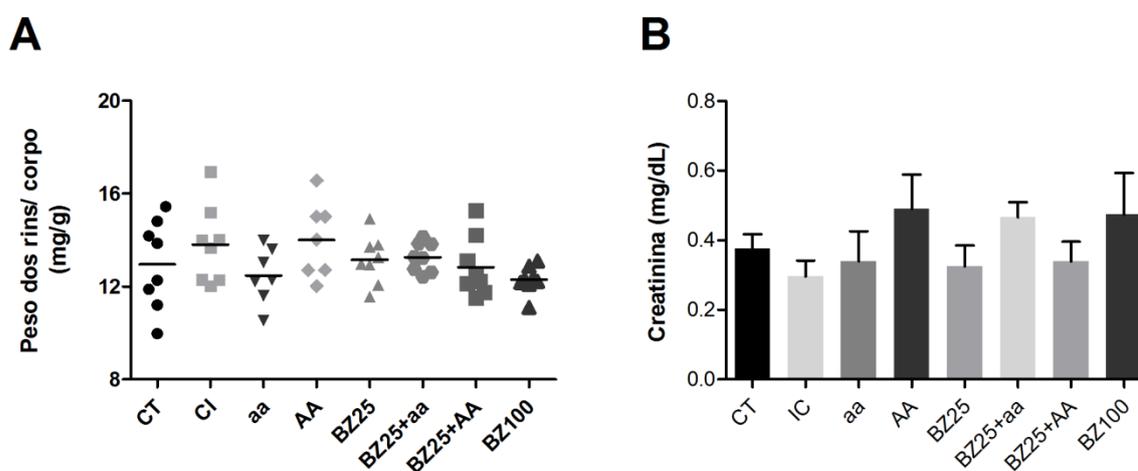
Esse aumento nos níveis de transaminases observado nos animais tratados com a dose clínica experimental corrobora estudos anteriores demonstrando que a terapia com BZ100 pode elevar os níveis de AST e ALT, independentemente da infecção por *T. cruzi* (NOVAES *et al.*, 2015, 2016). O papel do órgão no metabolismo do fármaco poderia ser uma explicação para este achado, mas cabe ressaltar que os valores não alterados observados nos grupos que

receberam baixas doses de BZ deflagram a dose-dependência de sua toxicidade e a validade de uma revisão dos protocolos terapêuticos.

5.6 Avaliação do peso relativo dos rins e dos níveis plasmáticos de creatinina

Devido à habilidade de infectar qualquer célula nucleada, pesquisadores já relataram a presença de *T. cruzi* em células renais, no entanto, a condição é trazida como não usual e foi ainda pouco explorada. Em contrapartida, danos estruturais na funcionalidade do órgão correlacionadas à infecção já foram descritos devido ao aumento da permeabilidade vascular renal e a presença de infiltrado inflamatório local (DA SILVA JUNIOR *et al.*, 2017; LEMOS *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo, não foram percebidas alterações no peso relativo dos rins ao 17º dia pós-infecção (Figura 13A).

Figura 13. Análise do peso relativo dos rins e determinação dos níveis plasmáticos de creatinina. (A) Peso dos rins/corpo. Animais experimentais tiveram o peso de seus rins normalizados pelo peso corporal (mg/g). Na figura cada símbolo representa o valor obtido para um animal e a média é representada pela barra horizontal. **(B) Dosagem de creatinina plasmática.** No gráfico foram representadas a média \pm EPM de cada grupo (5-8 animais/grupo). *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni foi usado em ambos os testes para a comparação entre os grupos, considerando a diferença significativa quando $p < 0.05$.



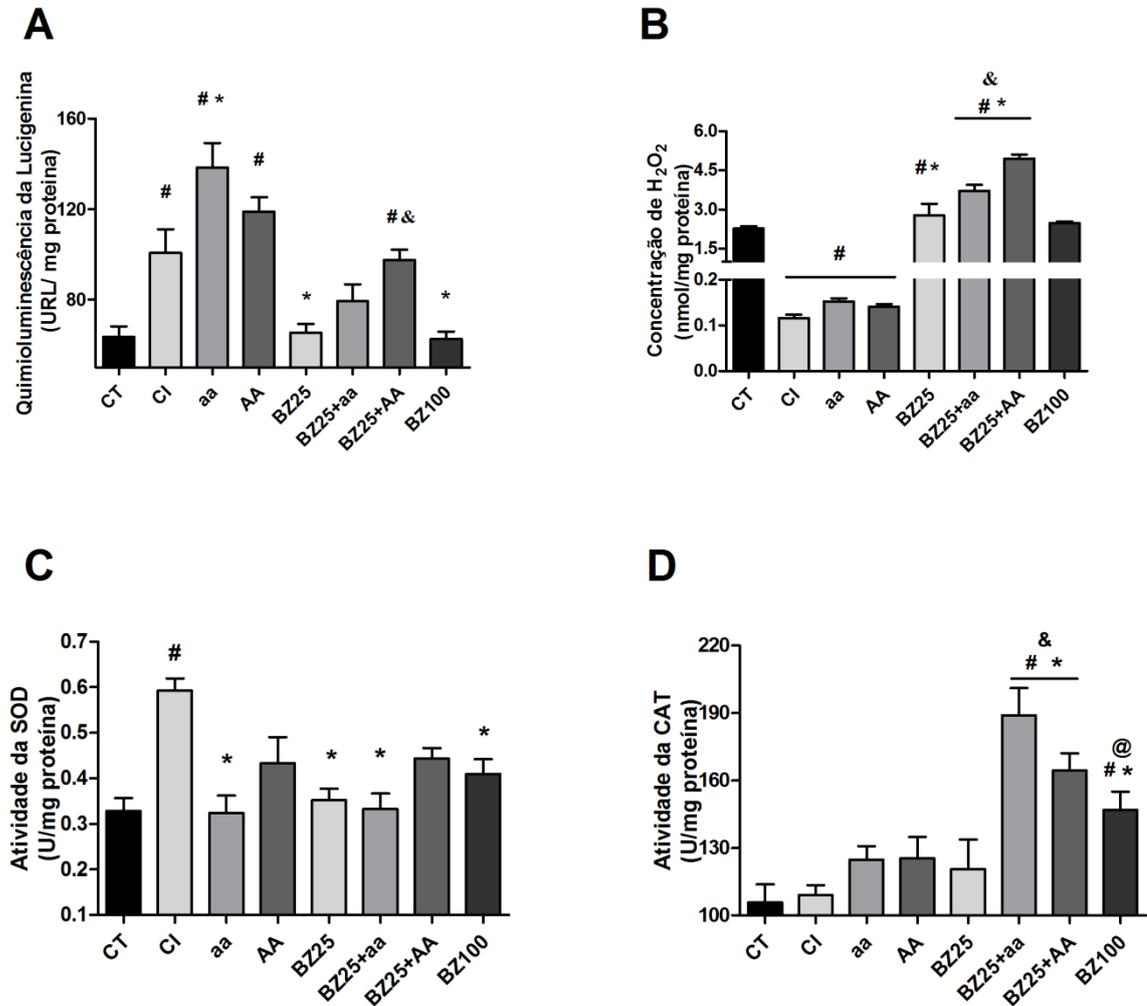
Os níveis de creatinina foram dosados no plasma (Figura 13B) e igualmente não evidenciaram qualquer diferença entre os grupos.

Além das alterações provocadas pela infecção, correlaciona-se a ingestão de altas doses de ácido ascórbico e a formação de cálculos renais, pois o antioxidante é parcialmente convertido em oxalato durante a sua metabolização e é eliminado pelos rins, portanto, a ingestão excessiva poderia culminar na formação de cristais de oxalato de cálcio (KNIGHT *et al.*, 2016). Todavia, os dados apresentados sugerem que as doses empregadas são seguras, não provocando alterações na funcionalidade do órgão.

5.7 Avaliação da geração de superóxido pela quimioluminescência da lucigenina e concentração de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco

Os efeitos da infecção ou das terapias empregadas sobre a geração de ERO durante a fase aguda foram verificados. A análise da produção de radical superóxido no ventrículo esquerdo (Figura 14A) revelou que a infecção por *T. cruzi* é responsável por um aumento substancial nos níveis deste biomarcador, uma vez que os grupos CI, aa e AA, nos quais um maior parasitismo cardíaco foi detectado, apresentaram também os maiores índices de geração de superóxido. Por outro lado, esse aumento não foi observado em BZ25 e BZ100, grupos que apresentaram níveis inferiores comparados a CI.

Figura 14. Efeitos da infecção e/ou terapias empregadas na produção de superóxido, concentração de peróxido de hidrogênio e atividade das enzimas SOD e CAT em homogenatos de ventrículo esquerdo. Níveis cardíacos de (A) $O_2^{\cdot-}$ (B) H_2O_2 e a atividade enzimática de (C) SOD e (D) CAT foram representadas na figura. Média \pm EPM de 5-8 animais/grupo ($p < 0.05$; ANOVA *post hoc* Bonferroni). Diferenças estatísticas foram demonstradas por símbolos: (#) em relação ao grupo CT; (*) grupo CI (&) grupo BZ25 e (@) grupo BZ25+aa.



Para o grupo aa, um aumento na geração de superóxido foi observado em relação ao grupo CI, embora alguns estudos tenham mostrado que a vitamina C pode diminuir a ativação da enzima NADPH oxidase e conseqüentemente os níveis de $O_2^{\cdot-}$ (ÜLKER; MCKEOWN; BAYRAKTUTAN, 2003). Neste sentido, percebe-se que a infecção foi o fator essencial para este aumento, uma vez que em uma infecção mais deflagrada nestes grupos, espera-se também altos níveis de neutrófilos e macrófagos no local, levando a maior geração do radical livre. Com isso, presume-se que este efeito não pode ser neutralizado apenas com a terapia antioxidante se a infecção não for totalmente controlada.

Na Figura 14B foi apresentada a concentração de peróxido de hidrogênio dosada no ventrículo esquerdo. Em oposição à dosagem de radical superóxido, os grupos com infecção mais deflagrada (CI, aa e AA) apresentaram taxas reduzidas desta ERO. Neste caso, duas explicações seriam plausíveis: a conhecida “*up-regulação*” de glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione oxidase ocorrida durante a fase aguda da infecção permitindo uma maior neutralização de H_2O_2 a água (MACHADO; TANOWITZ; RIBEIRO, 2013); ou ainda devido ao fato destes três grupos apresentarem as mais altas cargas parasitárias, poderia ocorrer uma esperada liberação de íons Fe^{+2} pela destruição de células musculares cardíacas favorecendo a conversão deste intermediário reativo a OH^- , através da reação de Fenton (MCCORD, 2004; PAIVA *et al.*, 2012; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Por outro lado, resultados inversos foram vistos em todos os grupos recebendo benznidazol em ambas as doses, sozinho ou em associação ao ácido ascórbico, onde altos índices de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco foram detectados. De acordo com os aspectos supracitados, este resultado poderia ser reflexo da melhor depuração parasitária observada nestes grupos. E ainda, é possível observar que para ambas as associações, BZ25+aa e BZ25+AA, os níveis cardíacos deste biomarcador foram superiores a BZ25 ($p < 0.0001$).

5.8 Determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no coração

A atividade da enzima SOD foi determinada em homogenatos de ventrículo esquerdo e os resultados foram representados na figura 14C. Esta enzima que tem por função neutralizar o radical $O_2^{\bullet-}$ apresentou atividade elevada para o grupo CI, se comparado a CT. Por outro lado, os grupos aa, BZ25, BZ25+aa e BZ100 apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo CI.

A atividade da enzima catalase foi igualmente avaliada e revela um aumento para os grupos BZ100 e ambas as associações (Figura 14D). Este resultado poderia ser explicado pela ação da CAT em neutralizar o H_2O_2 , que se encontrava elevado nestes grupos; no entanto, essa lógica não se aplica ao grupo BZ25, onde o aumento da concentração cardíaca do radical livre foi detectado, mas não acompanhado pelo aumento da atividade enzimática. E, de maneira complementar, Santos *et al.* (2015) demonstraram que BZ100 eleva a atividade de CAT, independentemente da infecção.

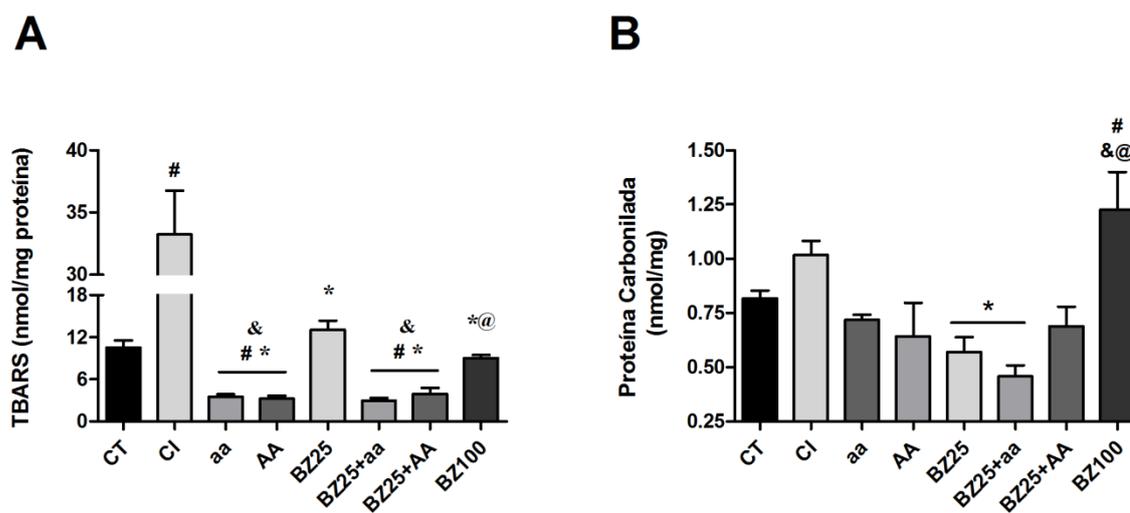
Não coincidentemente, os grupos com maiores atividades de CAT apresentaram importantes reduções na parasitemia e/ou parasitismo tecidual, corroborando os achados de Dias *et al.* (2017), cujo trabalho demonstrou que a adição de catalase em cultura primária de cardiomiócitos inibe o crescimento de *T. cruzi*.

Valendo-se de que a alta atividade da enzima estaria correlacionada com menor infecção de células cardíacas, nossa análise permite avaliar ainda que os níveis observados em BZ25+aa foram maiores do que aqueles detectados para o grupo BZ100, o que poderia ser considerado uma resposta positiva na terapia associada.

5.9 Análise de peroxidação de lipídios e carbonilação de proteínas

Foram investigados os danos oxidativos a lipídios no tecido cardíaco (Figura 15A). Observou-se que a infecção eleva expressivamente os níveis deste marcador, dado o aumento detectado no grupo CI. Por outro lado, BZ25 e BZ100 não apresentaram aumento significativo em relação ao grupo CT.

Figura 15. Avaliação de danos oxidativos a lipídios e proteínas durante a infecção chagásica aguda. (A) A peroxidação lipídica foi mensurada após 17 dias de infecção pela quantificação de TBARS. (B) O conteúdo carbonil de proteínas foi dosado afim de avaliar danos oxidativos a esta biomolécula. Nas figuras foram representadas a média±EPM de 6-8 animais/grupo e a análise estatística que considerou significativo $p<0.05$. One-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni foram usados e as diferenças estatísticas foram representadas pelos símbolos: (#) comparação ao grupo CT; (*) grupo CI; (&) grupo BZ25; (@) grupo BZ25+aa e (\$) BZ100.



Animais tratados com ácido ascórbico em ambas as dosagens, sozinho (grupos aa e AA) ou em associação (grupos BZ25+aa e BZ25+AA), apresentaram os mais baixos níveis, sendo estatisticamente inferiores a CT e CI. Este resultado poderia ser associado a já

reconhecidas propriedades cardioprotetoras e antioxidantes do ácido ascórbico (BUTTROS *et al.*, 2009; VISWANATHA SWAMY *et al.*, 2011)

Já a análise da carbonilação proteica (Figura 15B) mostra que animais infectados e tratados com BZ100 apresentaram elevação nos níveis deste biomarcador. O valor médio obtido neste grupo é superior a todos os grupos experimentais, com exceção de CI. Por outro lado, nos grupos BZ25 e BZ25+aa nota-se a redução nos índices de proteína carbonilada em relação ao grupo CI.

Alguns estudos têm demonstrado o papel das alterações mitocondriais em cardiomiócitos na geração de ERO e conseqüentemente na carbonilação de proteínas. De fato, a infecção por *T. cruzi* parece desencadear o dano à biomolécula, mas este parece ser diretamente proporcional ao avanço da infecção (WEN, ; GARG, 2004). Neste sentido, corroborando estes dados, não observamos danos oxidativos proteicos provocados exclusivamente pela infecção aguda, uma vez que não houve diferença entre os grupos CT e CI. Este dado demonstra que algumas terapias, mas não a infecção propriamente dita, afetaram esse parâmetro.

De maneira específica ao aumento percebido em animais tratados com BZ100, essa resposta indicaria um efeito pró-oxidante do fármaco, quando administrado em sua dose clínica. Novaes *et al.* (2015) haviam demonstrado altos índices de carbonilação proteica no fígado de camundongos C57BL/6 recebendo o medicamento na dose 100mg/kg/dia, independentemente da infecção por *T. cruzi*. Os resultados destes autores evidenciam a toxicidade hepática de BZ e no presente estudo observamos similaridades no tecido cardíaco.

6. RESULTADOS DE FASE CRÔNICA E DISCUSSÃO

6.1 Averiguação da parasitemia

Uma amostra escolhida de forma aleatória (n=10) teve sua parasitemia verificada no 9°, 14° e 16° dia pós-infecção com o objetivo de confirmar a infecção nos animais usados na experimentação de fase crônica. No 9°dpi, 40% das amostras já apresentavam formas tripomastigotas circulantes, enquanto no 14° e 16° dpi, 100% de positividade foi atingida, confirmando assim a infecção (Tabela 3).

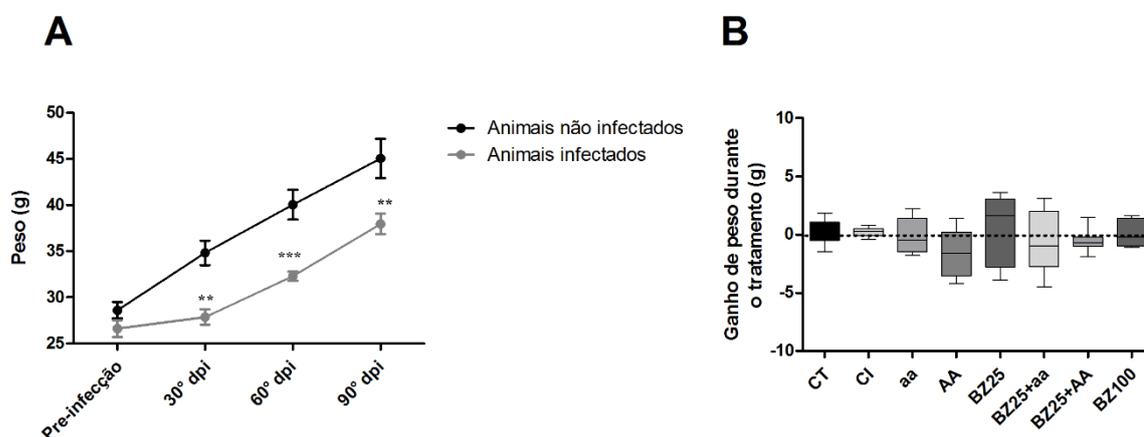
Tabela 3. Averiguação da parasitemia em uma amostra aleatória.

Dias pós-infecção	9	14	16
Animais Positivos n (%)	4/10 (40%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

6.2 Ganho de Peso

Assim como na experimentação em fase aguda, o peso dos animais foi também verificado durante o desenvolvimento da fase crônica. Os resultados demonstram que passados 30 dias de infecção já se percebia menor ganho de peso nos animais infectados (Figura 16A). Enquanto animais não infectados aumentaram seu peso corporal em aproximadamente 21% nos primeiros trinta dias, aqueles infectados por *T. cruzi* tiveram ganho médio de 1,7% ($p < 0.01$). Resultados similares foram detectados após 60 e 90 dias da infecção, onde camundongos não infectados apresentaram aumento médio do peso corporal equivalente a 40% e 63%, respectivamente, e aqueles infectados tiveram acréscimos aproximados de 22% e 44% (ambos $p < 0.05$).

Figura 16. Avaliação do ganho de peso de animais experimentais durante o processo de cronificação e durante o tratamento. (A) Camundongos foram pesados ao início da experimentação e após 30, 60 e 90 dias da infecção. Resultados demonstrados em (g). (B) Ganho de peso durante o tratamento. Resultado (em gramas) obtido pela subtração do peso ao fim do tratamento (dia 105) e ao início (dia 90). Gráficos demonstram média \pm EPM de 6-8 animais/grupo. *Two-way* ANOVA foi aplicado na figura A e *One-way* ANOVA na figura B, para ambos *post hoc* Bonferroni. (*) representa diferença estatística em relação a animais não infectados. Dois símbolos: $p < 0.01$; três símbolos: $p < 0.0001$.



O mesmo parâmetro foi avaliado durante o tratamento, pesando-se os animais ao início e término da administração das terapias, entretanto não se observou qualquer alteração significativa entre os grupos neste período (Figura 16B).

Apesar da nítida alteração provocada pela infecção durante a cronificação dos animais, diferentemente do que foi observado em fase aguda, os tratamentos aqui não alteraram o ganho de peso dos animais.

6.3 Análise anatômica e parasitológica do coração e níveis plasmáticos de CK-MB

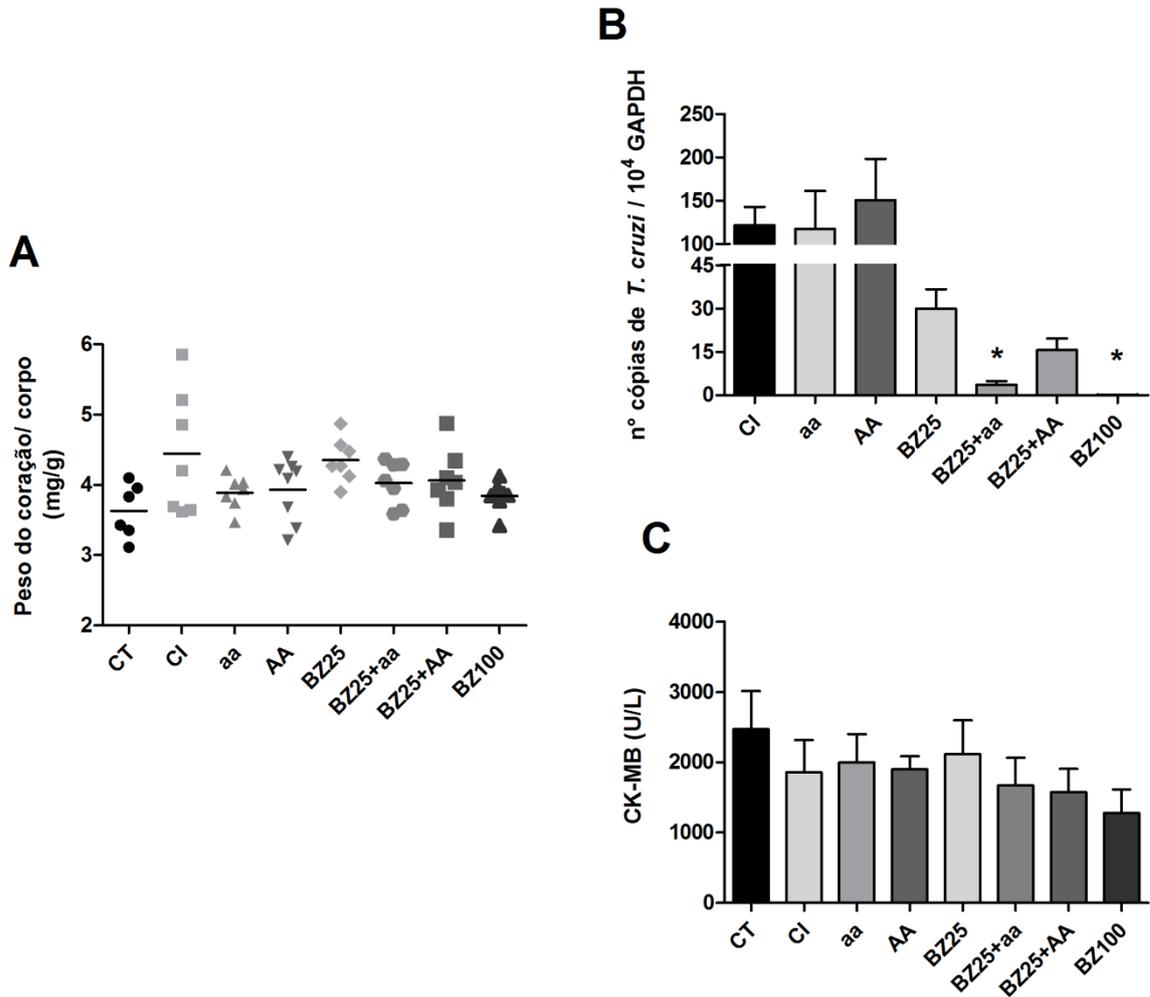
Devido ao coração ser considerado um dos “órgãos-alvo” no estágio crônico da doença de Chagas, avaliamos a infecção tecidual e possíveis alterações funcionais nesse órgão.

Diferentemente do que se observa em fase aguda, a carga parasitária na circulação sanguínea, em fase crônica, cai expressivamente. Isso ocorre porque a resposta imune deflagrada na infecção inicial ajuda a controlar esses níveis e, nos indivíduos que sobrevivem a este período, a resposta imune mediada por células auxilia no controle da replicação parasitária tecidual (BERN, 2015; BUSTAMANTE *et al.*, 2020; LIDANI *et al.*, 2019).

Essa é a chave do entendimento pela qual a maioria dos pacientes chagásicos crônicos permanecem por décadas ou toda sua vida sem a manifestação de quaisquer sintomas, a chamada fase indeterminada. As condições que determinam quem irá apresentar alterações em órgãos-alvo da doença permanecem incertas, mas extremamente importantes para auxiliar na intervenção clínica precoce nestes indivíduos.

O modelo experimental empregado neste estudo, seguiu padrões detectados em pacientes chagásicos. Não foram observadas quaisquer alterações entre os grupos experimentais quanto ao peso relativo do coração, bem como nos níveis de CK-MB (Figuras 17A e 17C, respectivamente).

Figura 17. Determinação do peso relativo do coração, da infecção tecidual cardíaca e dosagem de CK-MB. A análise foi conduzida após 90 dias de cronificação, seguidos de 15 dias de tratamento, totalizando 105 dias da infecção. (A) Relação peso do coração/ peso corporal. (B) Determinação dos níveis parasitários no tecido cardíaco por qPCR. Os resultados foram expressos em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. (C) Determinação plasmática da isoenzima CK-MB. Na figura foi representada a análise estatística conduzida por *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni. Foi considerado significância estatística quando $p < 0.05$. (*) Representa diferença estatística em relação ao grupo CI.



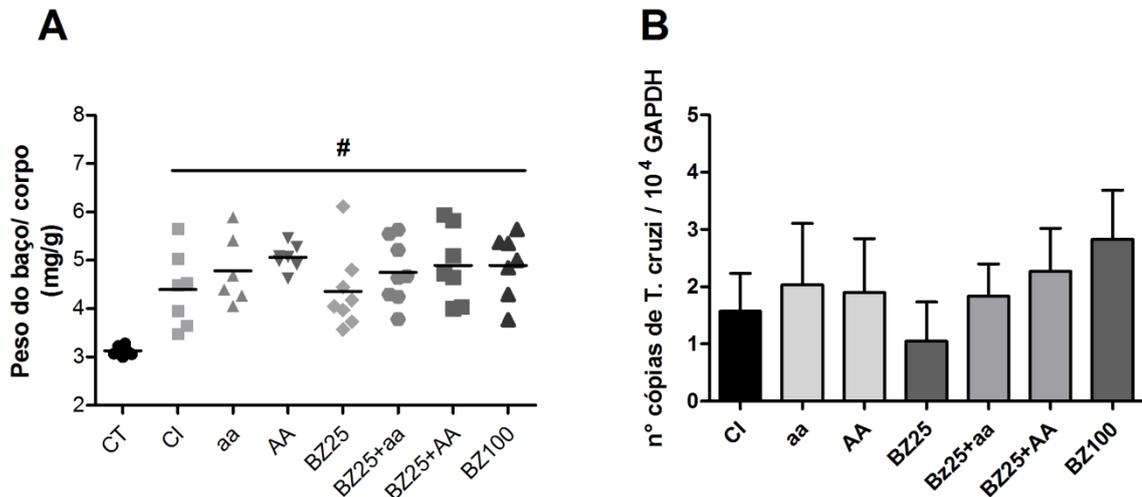
Os níveis de parasitismo cardíaco foram quantificados e representados na figura 17B. Foi possível observar que as terapias BZ25+aa e BZ100 promoveram diminuição deste parâmetro quando comparadas a CI. Com isso, apesar de não terem sido detectadas maiores alterações cardíacas, estes resultados evidenciam que o tratamento com a dose clínica de BZ, bem como BZ25+aa, poderiam trazer benefícios na terapia de fase crônica.

6.4 Análise anatômica e parasitológica do baço

O peso relativo do baço foi demonstrado na figura 18A. Nela observa-se que a infecção crônica, mas não as terapias, alteraram este parâmetro, visto que todos os grupos

infectados por *T. cruzi* apresentaram aumento no peso relativo do baço quando comparados a CT.

Figura 18. Avaliação do peso relativo e carga parasitária do baço. Animais cronicamente infectados por *T. cruzi* foram tratados por 15 dias. (A) Relação peso do baço/corpo, representado em mg/g. (B) Análise do parasitismo esplênico representada em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. One-way ANOVA seguido de *post-hoc* Bonferroni foi usado para avaliar estatisticamente os grupos experimentais. Média de 5-8 animais/ grupo. (#) representa diferença estatística em relação ao grupo CT.



Como discutido no tópico anterior, a resposta imunológica é essencial no controle da multiplicação parasitária que, em fase crônica, apesar de reduzida é persistente. O papel deste órgão linfóide na resposta imune, que se configura duradoura neste estágio da infecção, explica uma manifestação clínica comumente observada: a esplenomegalia.

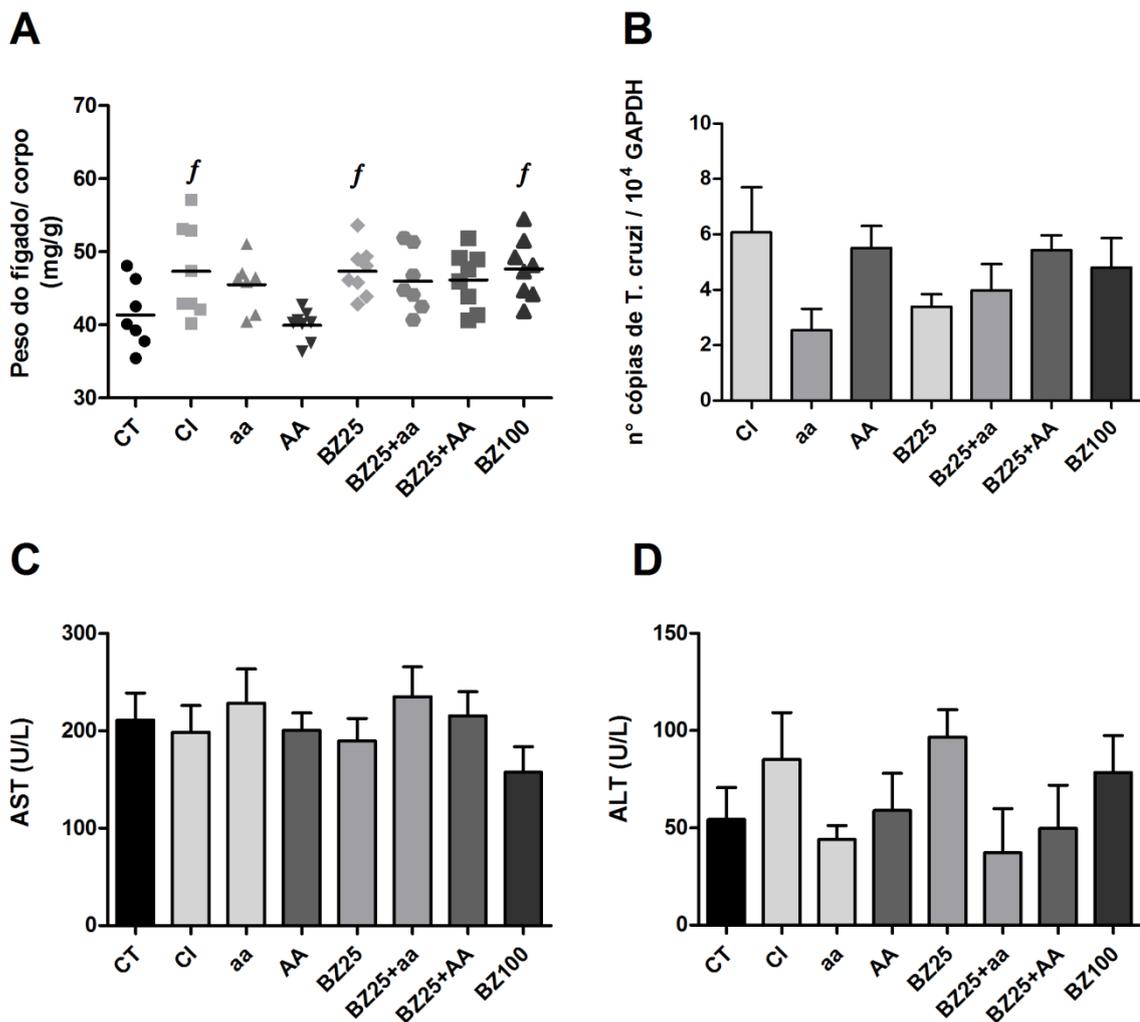
Por outro lado, a quantificação do parasitismo tecidual mostrou baixas taxas de DNA parasitário e reforça que as mudanças no peso do órgão estão relacionadas a ativação da resposta imune e não a multiplicação parasitária neste órgão, a considerar o baixo parasitismo detectado (Figura 18B).

6.5 Análise anatômica e parasitológica do fígado e níveis plasmáticos de transaminases

Assim como o coração e o baço, o fígado foi igualmente analisado quanto ao seu peso relativo, parasitismo tecidual e funcionalidade. Os resultados mostram que a infecção crônica por *T. cruzi* não eleva o peso relativo do órgão, visto que o grupo CI não apresentou aumento quando comparado ao grupo CT (Figura 19A). Por outro lado, animais tratados com AA

apresentaram peso relativo médio significativamente menor se comparado aos grupos CI, BZ25 e BZ100, mas não aos demais grupos.

Figura 19. Averiguação da relação peso do fígado/corpo, parasitismo tecidual hepático e dosagem plasmática de transaminases. (A) Determinação do peso relativo do órgão ao final da experimentação, expresso em mg/g (B) Quantificação de DNA parasitário realizada por qPCR. Resultados demonstrados em n° de cópias de *T. cruzi*/10⁴ GAPDH. (C) Determinação de AST e (D) ALT no plasma dos animais em experimentação. Na figura foi demonstrada a média \pm EPM de 5-8 animais/grupo e a análise estatística considerando $p < 0.05$. *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni. (f) representa significância estatística quando comparado ao grupo AA.



No entanto, quanto ao índice de DNA parasitário no fígado (Figura 19B), não foi possível detectar diferenças significativas entre as terapias empregadas. Além disso, assim como no baço, observou-se baixo parasitismo no órgão.

Níveis plasmáticos de marcadores de dano hepático foram avaliados ao término do tratamento. As dosagens das transaminases AST e ALT foram demonstradas nas figuras 19C e 19D, respectivamente. Nota-se que nem a infecção tampouco as terapias alteraram as

concentrações plasmáticas destes biomarcadores, dado que diferenças significativas não foram observadas entres os grupos, diferente do que foi observado em fase aguda.

Uma explicação plausível a este achado, seria o maior requerimento deste órgão durante a fase aguda. Cabe ressaltar a importância do fígado na imunidade inata, produzindo até 90% das proteínas circulantes e detendo uma grande população de macrófagos e células *natural killers* (GAO, B., 2016). É neste órgão ainda que ocorre a síntese e regulação de alguns antioxidantes, como a glutathione (LIDANI *et al.*, 2019). Com isso, durante a infecção aguda, além da metabolização do fármaco, o fígado atuaria no combate a intensa proliferação parasitária e geração de ERO. Além disso, é possível que na fase aguda possa ter havido uma importante proliferação parasitária no fígado, dado o caráter macrofagotrópico da cepa Y (MELO; BRENER, 1978). Essa alta proliferação parasitária já não ocorre na fase crônica, reduzindo a inflamação e a demanda antioxidante e, desse modo, traria menor comprometimento hepático.

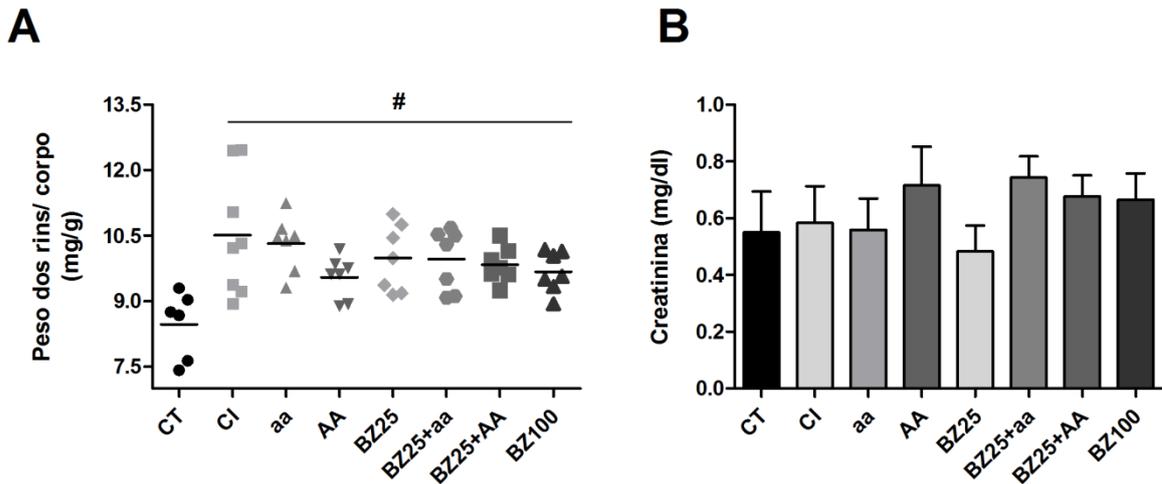
Por fim, a redução no peso relativo hepático detectado no grupo AA quando comparado a CI, BZ25 e BZ100 poderia ser explicado pelos efeitos hepatoprotetores do ácido ascórbico, especialmente relacionados a sua função antioxidante como revisado por Adikwu e Deo (2013). E como o mesmo efeito não foi percebido em fase aguda, reforça-se a hipótese do maior requerimento antioxidante do fígado no estágio inicial da infecção, como supracitado.

6.6 Análise anatômica dos rins e níveis plasmáticos de creatinina

Os rins foram analisados quanto ao peso relativo e sua funcionalidade avaliada pela dosagem de creatinina no plasma dos animais ao final da experimentação.

Diferentemente do observado na fase aguda, no modelo de experimentação crônico houve aumento da relação peso dos rins/corpo (Figura 20A). A análise deste dado permite concluir que infecção seria o fator determinante para esta alteração, visto que ela foi detectada em todos os grupos infectados.

Figura 20. Determinação do peso relativo dos rins e níveis plasmáticos de creatinina. (A) Relação peso dos rins/corpo, expresso em mg/g após 105 dias de infecção. (B) Dosagem de creatinina. Resultado representado em mg/dL. *One-way ANOVA* seguido de *post hoc* Bonferroni foi usado para comparação estatística e diferenças entre os grupos foram representadas por símbolos: (#) comparação ao grupo CT. Média \pm EPM de 5-8 animais/grupo.



A avaliação dos níveis plasmáticos de creatinina não apresentou quaisquer alterações significativas, seja pela infecção ou pelos tratamentos propostos (Figura 20B).

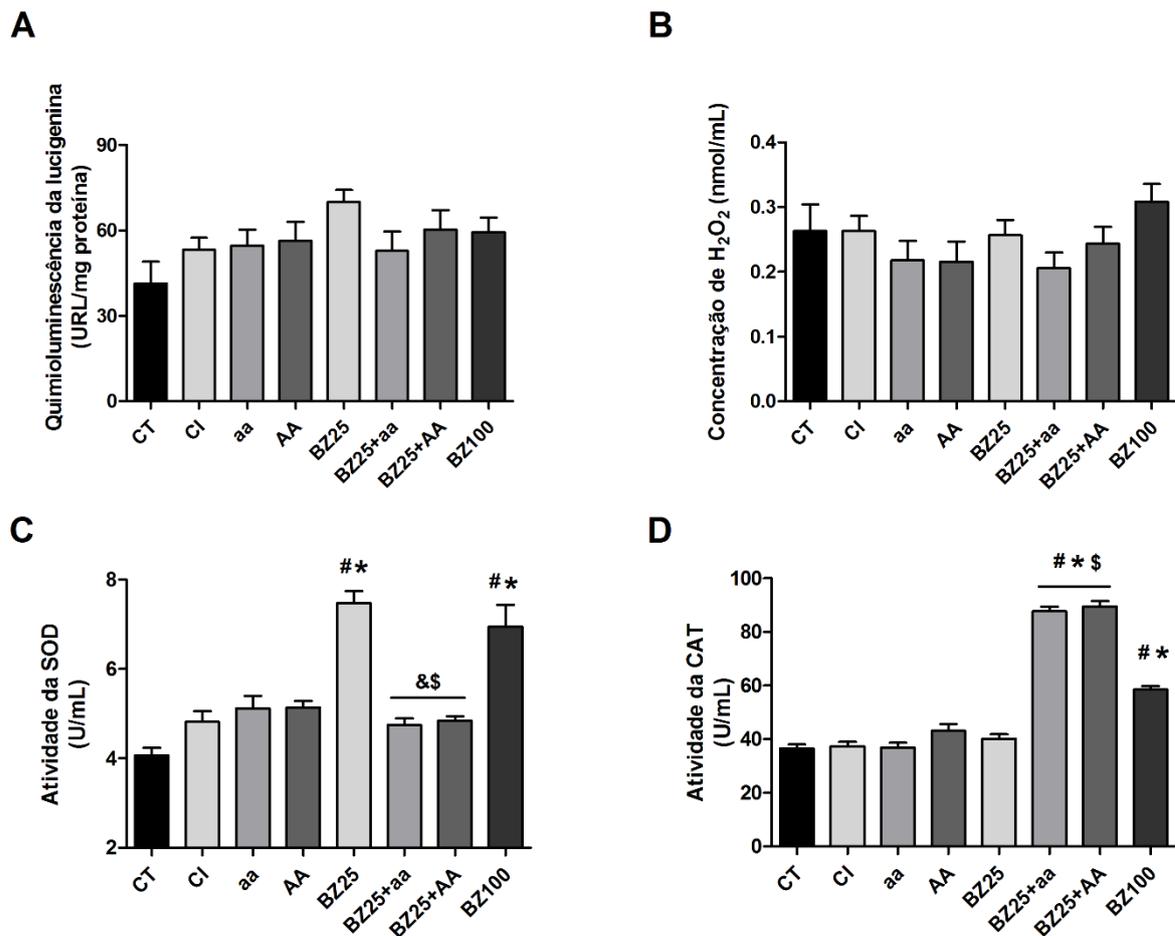
Como previamente citado, a infecção de células renais por *T. cruzi* é uma condição incomum e pouco explorada, no entanto, Oliveira *et al.* (2011) mostraram em um modelo *in vitro* que apesar da baixa taxa de infecção de células renais, em torno de 13%, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico liberados por estas são altos, culminando em inflamação intersticial, congestão vascular, e perfusão renal. Nosso achado que evidencia o aumento do peso relativo dos rins poderia corroborar as alterações inflamatórias mostradas pelos autores do trabalho e deflagra a necessidade de melhor explorar o acometimento do órgão na infecção chagásica.

6.7 Avaliação da geração cardíaca de superóxido pela quimioluminescência da lucigenina e concentração plasmática de peróxido de hidrogênio

Considerando o baixo parasitismo tecidual característico da fase crônica, os parâmetros oxidativos foram avaliados no plasma, afim de se obter uma resposta sistêmica. A única exceção ocorreu para a análise da geração de superóxido, que foi avaliada em homogenatos de ventrículo esquerdo, devido a incompatibilidade da técnica com amostras de

plasma. Essa análise foi representada na figura 21A e mostra que não houve alterações significativas entre os grupos para este parâmetro.

Figura 21. Determinação de ERO e atividade de enzimas antioxidantes em modelo crônico de infecção. (A) Avaliação da geração de superóxido, avaliada por quimioluminescência da lucigenina. (B) Concentração plasmática de peróxido de hidrogênio. (C) Análise da atividade da enzima superóxido dismutase e (D) catalase. Na figura, foi demonstrado a média \pm EPM e diferenças estatísticas foram representadas por símbolos: (#) em relação ao grupo CT; (*) grupo CI; (&) grupo BZ25 e (\$) grupo BZ100.



Em uma revisão publicada, Munoz-Saravia *et al.* (2010) discutem que a incompleta depuração parasitária marcam a fase crônica da doença de Chagas. Uma aparente condição de estabilidade, onde o parasito persiste nos tecidos em baixos índices e atenua a resposta imunológica e oxidativa, caracteriza a condição chamada de fase indeterminada, que pode perdurar por décadas ou até mesmo por toda a vida do indivíduo. Neste estudo pode-se comprovar essa condição: o tecido cardíaco que, em fase aguda, apresentava alta geração de superóxido para aqueles grupos onde não houve controle parasitário (CI, aa e AA), em fase crônica aparece com os níveis não alterados.

Quanto a concentração plasmática de H_2O_2 verifica-se que não houve diferenças significativas promovidas pela infecção ou pelas terapias (Figura 21B).

6.8 Determinação da atividade da SOD e CAT no plasma

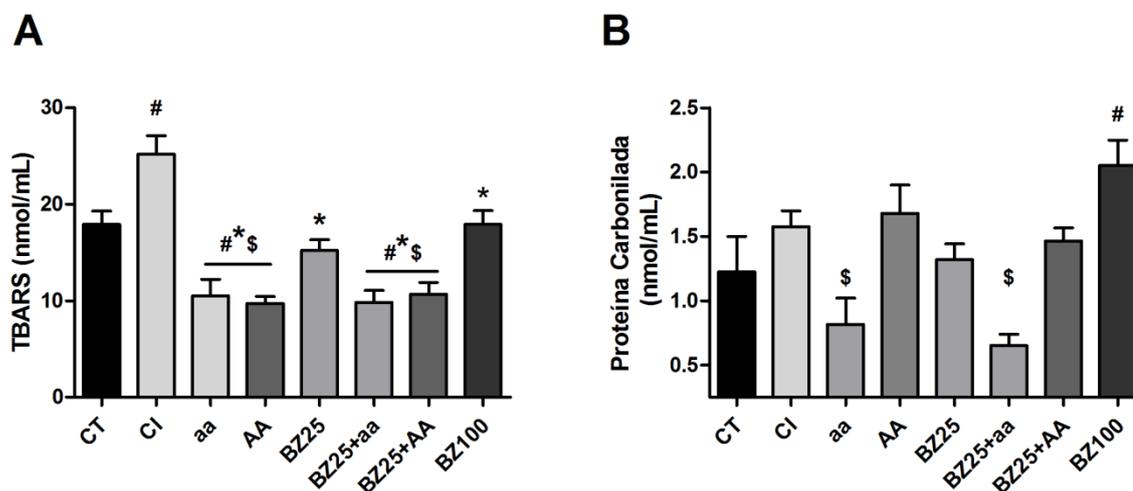
A atividade da enzima SOD foi representada na Figura 21C. Nela, observamos que a atividade enzimática no plasma se encontrava aumentada nos grupos BZ25 e BZ100. Esse resultado, poderia indicar uma possível resposta compensatória à geração de superóxido provocada pelo medicamento, mesmo que em dose reduzida. No entanto, o aumento não foi observado quando o ácido ascórbico é associado ao benznidazol (grupos BZ25+aa e BZ25+AA), resultado que poderia ser explicado pela maior capacidade antioxidante conferida nessa associação.

Em relação a enzima catalase (Figura 21D), detectou-se um aumento da atividade plasmática nos grupos recebendo as terapias combinadas e BZ100. Ainda, avaliando estatisticamente, vimos que o aumento observado em BZ25+aa e BZ25+AA é superior se comparado a BZ100. Este resultado é muito similar ao dado encontrado em tecido cardíaco durante a fase aguda. A correlação entre a terapia com BZ e a atividade da catalase ainda são pouco conhecidos. No entanto, como citado previamente, a considerar trabalhos anteriores que mostraram a inibição da proliferação de *T. cruzi* na presença de CAT (DIAS *et al.*, 2017), os resultados de fase crônica enfatizam que a associação do antioxidante a uma dose reduzida de BZ poderia potencializar a atividade tripanocida do fármaco.

6.9 Mensuração plasmática da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas

Os níveis de TBARS foram determinados no plasma de animais cronicamente infectados e foram mostrados na figura 22A. O aumento observado no grupo CI em comparação a CT revela a maior peroxidação lipídica deflagrada pela infecção. Por outro lado, o tratamento com benznidazol em dose clínica (BZ100) ou subclínica (BZ25) foi capaz de reduzir os níveis deste biomarcador em relação a CI.

Figura 22. Avaliação de danos oxidativos a lipídios e proteínas em modelo crônico de infecção. As análises foram realizadas no plasma após 105 dias de infecção, sendo 90 dias de cronificação e 15 dias de tratamento (A) Peroxidação lipídica determinada pela quantificação de TBARS. (B) Carbonilação de proteínas pela técnica de reação ao DNPH. Nas figuras foram representadas a média±EPM de 6-8 animais/grupo e a análise estatística que considerou significativo $p<0.05$. ANOVA *post hoc* Bonferroni foi usado e as diferenças estatísticas foram representadas pelos símbolos: (#) comparação ao grupo CT; (*) grupo CI e (\$) BZ100.



Ainda, os valores médios apresentados pelos grupos aa, AA, BZ25+aa e BZ25+AA mostraram-se inferiores à CT, IC e BZ100.

Este achado foi muito semelhante ao observado no tecido cardíaco em fase aguda. Ainda que, neste momento mais tardio da infecção, os níveis de ERO dosados e a atividade de enzimas antioxidantes não tenham sido alterados pela infecção por si, a peroxidação lipídica é um achado que se perpetua pela fase crônica, indicando que as defesas antioxidantes hospedeiras, portanto, não são eficazes em combatê-la.

Em conjunto, essa análise revela que a redução da peroxidação lipídica detectada em grupos tratados com ácido ascórbico, a níveis inferiores aos basais, indicaria um efeito protetivo ao hospedeiro e mostra benefícios frente à dose clínica de BZ.

No que se refere a oxidação de proteínas, os índices plasmáticos foram dosados e representados na figura 22B. Diferentemente do que foi visto para a peroxidação lipídica, a infecção por si não promoveu aumento no dano oxidativo proteico, no entanto, o tratamento com BZ100 elevou estes índices, assim como o observado em fase aguda.

Esse resultado corrobora o trabalho de Wen e Garg (2012), que demonstraram o aumento nos níveis plasmáticos de proteína carbonilada em ratos cronicamente infectados e tratados com BZ100. No mesmo trabalho, os autores verificaram que a terapia com um antioxidante (α -fenil-N-tert-butilnitrona) em associação ao BZ prevenia esse efeito.

Similarmente em nosso estudo, os animais tratados com aa e BZ25+aa apresentaram os menores níveis deste biomarcador. Esse dado sugere que ácido ascórbico administrado na

menor dose, poderia prevenir o dano oxidativo à proteínas e, a longo prazo, reduzir a severidade da doença, uma vez que esses produtos oxidados são alvos da resposta imune (DHIMAN *et al.*, 2012).

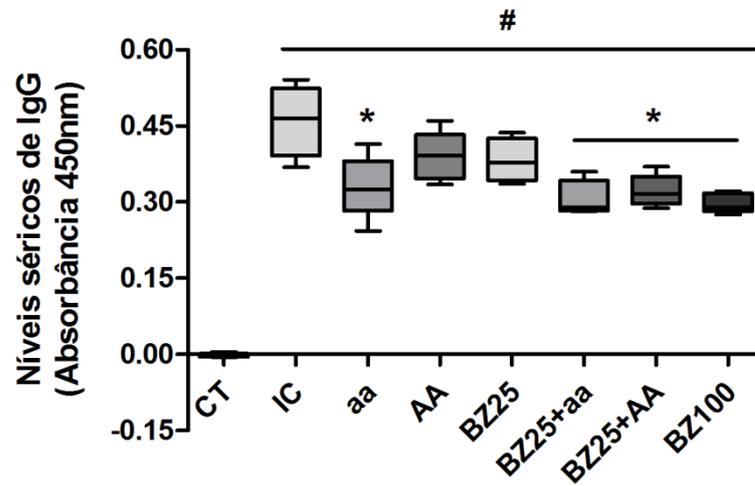
Nossos achados, em conjunto ao trabalho supracitado, reforçam a ideia que o emprego de antioxidantes associados a BZ podem trazer benefícios à terapia em fase crônica. Além disso, esse resultado evidencia que os regimes *drug-sparing* devem ser explorados, pois podem reduzir a citotoxicidade frente ao protocolo terapêutico atual.

6.10 Avaliação dos níveis séricos de imunoglobulinas anti-*T. cruzi*

A sorologia específica para *T. cruzi* apresenta importante papel na prática clínica, sendo empregada não apenas no diagnóstico da doença, mas também para avaliação da eficácia terapêutica e critérios de cura, pela diminuição ou negativação dos níveis séricos de imunoglobulinas específicas, uma vez que, em fase crônica, a baixa carga parasitária comumente gera resultados falsos negativos nos testes moleculares (DIAS *et al.*, 2016; MURPHY *et al.*, 2021).

Com isso, no presente trabalho, a análise da resposta imune humoral foi empregada com o intuito de verificar a eficácia das terapias através do decréscimo de níveis séricos de anticorpos. Como esperado, a presença de IgG específica para *T. cruzi* foi detectada em todos os grupos experimentais infectados, dada a diferença estatística percebida entre estes e o grupo CT (Fig. 23).

Figura 23. Detecção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* pela técnica de ELISA. A análise foi conduzida em amostras de soro de animais cronicamente infectados após o término das terapias. Uma proteína recombinante correspondente a trans-sialidase (TS) de *T. cruzi* foi empregada e a diluição 1:8000 foi aplicada nas amostras. Na figura, foram demonstrados os valores médios de 5-6 animais/grupo. A análise estatística foi representada por símbolos: (#) representa significância estatística em relação a CT; (*) em relação a CI. *One-way* ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni.



Reduções nos níveis de IgG foram detectadas para os grupos aa, BZ25+aa, BZ25+AA e BZ100 em comparação ao grupo CI. Destaca-se que, para este parâmetro, a associação ao ácido ascórbico em ambas as dosagens melhorou a resposta de BZ25, podendo ser equiparado à dose clínica experimental.

Segundo o Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2015), a negatificação sorológica, que no homem pode levar décadas para ocorrer, indicaria a cura da infecção. Contudo, autores concordam que avaliar a eficácia de um tratamento farmacológico para a infecção chagásica seja um dos maiores desafios na atualidade, seja na prática clínica ou na pesquisa.

Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos afim de encontrar novos biomarcadores imunológicos que possam avaliar a eficácia terapêutica, especialmente que não leve anos até a soro conversão, no entanto, pouco avanço nesse campo foi obtido.

Com isso, baseado nos critérios de cura atuais, a redução nos níveis de anticorpos de maneira consistente e progressiva ainda é considerada o “padrão-ouro” e revelaria um bom prognóstico nos casos de doença crônica (PINTO DIAS *et al.*, 2016; MURPHY *et al.*, 2021). Portanto, com base nestes critérios, as análises obtidas no presente estudo demonstram que, a redução no parasitismo cardíaco detectada no grupo BZ25+aa por método molecular em conjunto com a redução nos níveis séricos de imunoglobulinas, indica que a terapia combinada possa trazer benefícios no tratamento da infecção chagásica crônica.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo deflagram os efeitos tóxicos da dose de BZ atualmente empregada. Dentre eles, destaca-se as alterações hepáticas detectadas no modelo de infecção aguda, o comprometimento no ganho de peso dos animais, bem como o aumento na carbonilação de proteínas cardíacas.

É notório que estes efeitos tóxicos observados na fase aguda puderam ser revertidos ao reduzir a dosagem do fármaco para 25mg/kg/dia, o que evidencia a dose-dependência desta toxicidade e valida estudos como este.

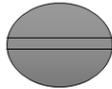
Quando associado ao ácido ascórbico outras vantagens puderam ser percebidas:

- A associação BZ25+aa promoveu maior redução na parasitemia e parasitismo tecidual cardíaco se comparado a BZ25, resultado que indica efeitos benéficos dessa associação em relação a atividade tripanocida do medicamento. Além disso, a redução nos parâmetros de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonilada) revelam que, de maneira geral, esse tratamento combinado promoveria maior controle *redox* ainda em fase aguda.

- A associação BZ25+AA também culminou em uma redução parasitêmica no 9º dpi., mas não foi mantida em 17ºdpi. A carga parasitária no coração observada neste grupo foi reduzida quando comparado ao grupo CI, mas não em relação a BZ25 indicando que, em relação a atividade tripanocida, não houve melhorias promovidas pelo antioxidante na maior dosagem. No entanto, o controle da peroxidação lipídica foi aprimorado por essa combinação terapêutica.

Os principais achados em modelo agudo da infecção foram sumarizados na figura 24.

Figura 24. Sumarização dos resultados de fase aguda. Os principais achados encontrados para os grupos BZ100, BZ25+aa e BZ25+AA foram representados na imagem. Os resultados foram categorizados em: atividade tripanocida, antioxidante e citotoxicidade.

Fase Aguda			
	Atividade Tripanocida	Atividade Antioxidante	Citotoxicidade
 BZ100	Ø Parasitemia Ø Parasitismo Cardíaco	↓ Peroxidação Lipídica ↑ Carbonilação Proteica	↓ Ganho de Peso ↑ ALT e AST e peso relativo hepático
 BZ25+aa	↓ Parasitemia ↓ Parasitismo Cardíaco	↓ Peroxidação Lipídica ↓ Carbonilação Proteica	= Ganho de Peso = ALT e AST
 BZ25+AA	↓ Parasitemia (9º dpi) ↓ Parasitismo Cardíaco	↓ Peroxidação Lipídica = Carbonilação Proteica	= Ganho de Peso = ALT e AST

Legenda: (↑) representa aumento naquele parâmetro; (↓) representa diminuição e (=) representa a não alteração.

Em modelo crônico de infecção, a redução no parasitismo cardíaco e diminuição dos títulos de anticorpos no grupo tratado com BZ100 revelam um bom prognóstico, no entanto, sabe-se que apenas estes resultados não garantem a cura clínica, uma vez que danos aos órgãos já instaurados não podem ser revertidos (MORILLO *et al.*, 2015). Neste trabalho, o aumento na carbonilação proteica também se fez presente nos plasma de animais recebendo BZ em dose clínica, evidenciando uma resposta sistêmica muito similar àquela observada no tecido cardíaco em fase aguda.

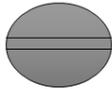
Ao analisarmos as terapias combinadas em fase crônica destacamos alguns achados:

- BZ25+aa reduz o parasitismo cardíaco de maneira mais eficaz que BZ25, indicando benefícios nesta combinação terapêutica. Os níveis plasmáticos de proteínas carboniladas foram inferiores aos observados em BZ100 evidenciando uma boa resposta frente à oxidação de biomoléculas.

- Ambas as terapias combinadas aumentaram a atividade da enzima catalase e reduziram a peroxidação lipídica, assim como a dose clínica de BZ. Entretanto, é válido ressaltar que mesmo se tratando de uma dose 4 vezes menor, a redução nos níveis de anticorpos em ambas as associações indicaria boa resposta antiparasitária.

Estes resultados foram sumarizados e representados na Figura 25.

Figura 25. Sumarização dos resultados de fase crônicos. Os principais achados encontrados para os grupos BZ100, BZ25+aa e BZ25+AA durante a fase crônica foram representados na imagem. Os resultados foram categorizados em: atividade tripanocida, antioxidante e citotoxicidade.

Fase Crônica			
	Atividade Tripanocida	Atividade Antioxidante	Citotoxicidade
 BZ100	↓ Parasitismo Cardíaco ↓ IgG	↓ Peroxidação Lipídica ↑ Carbonilação Proteica	= Ganho de Peso = ALT e AST
 BZ25+aa	↓ Parasitismo Cardíaco ↓ IgG	↓ Peroxidação Lipídica ↓ Carbonilação Proteica	= Ganho de Peso = ALT e AST
 BZ25+AA	↓ IgG	↓ Peroxidação Lipídica = Carbonilação Proteica	= Ganho de Peso = ALT e AST

Legenda: (↑) representa aumento naquele parâmetro; (↓) representa diminuição e (=) representa a não alteração.

Enfim, conclui-se que, considerando as fases aguda e crônica, ambas as associações testadas promoveram alguns benefícios frente ao atual tratamento da doença de Chagas. Na associação BZ25+aa, foi possível observar melhorias na atividade tripanocida, no controle *redox* e redução de alguns efeitos tóxicos.

Os parâmetros estudados revelam, especialmente, a necessidade em reavaliar os atuais protocolos terapêuticos e indicam, complementarmente, que o ácido ascórbico poderia ser empregado como um adjuvante no tratamento de indivíduos chagásicos.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Suporte financeiro

8. SUPORTE FINANCEIRO

Agradecemos ao CNPq (Processo #142136/2019-0) e Capes (Código de Financiamento 001) pelo apoio financeiro que permitiram a realização deste estudo.



Perspicácia (René Magritte, 1936)

Referências bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKWU, E.; DEO, O. Hepatoprotective Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid). *Pharmacology & Pharmacy*, v. 04, n. 01, p. 84–92, 2013.

AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. In: MORALES-GONZALEZ, J. A.; MORALES-GONZALEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLAN, E. O. (Org.). *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2*. [S.l.]: InTech, 2016. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/a-master-regulator-of-oxidative-stress-the-transcription-factor-nrf2/endogenous-antioxidants-a-review-of-their-role-in-oxidative-stress>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

AGUIRRE, R.; MAY, J. M. Inflammation in the vascular bed: Importance of vitamin C. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 119, n. 1, p. 96–103, 1 jul. 2008.

ALEVI, K. *et al.* *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. *Insects*, v. 11, n. 12, p. 830, 26 nov. 2020.

ÁLVAREZ, MARÍA GABRIELA *et al.* New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 2, p. 833–837, fev. 2016.

ÁLVAREZ, M.G. *et al.* Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, n. 10, p. 636–638, out. 2012.

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy. *Cardiology Clinics*, v. 35, n. 1, p. 31–47, fev. 2017.

BERN, C. Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BESTETTI, R. B.; RESTINI, C. B. A.; COUTO, L. B. Carlos Chagas Discoveries as a Drop Back to Scientific Construction of Chronic Chagas Heart Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20160079>>. Acesso em: 3 jun. 2020.

BHAKUNI, P.; CHANDRA, M.; MISRA, M. K. Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Certain Oxidative Stress Parameters in the Post Reperfusion Patients of Myocardial Infarction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 290, n. 1, p. 153–158, 1 out. 2006.

BILATE, A. M. *et al.* Distinct Outcomes of *Trypanosoma cruzi* Infection in Hamsters Are Related to Myocardial Parasitism, Cytokine/Chemokine Gene Expression, and Protein Expression Profile. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 198, n. 4, p. 614–623, 15 ago. 2008.

BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 14, n. 1, p. 421–447, 24 jan. 2019.

BRENER, Z. Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 4, n. 6, p. 389–96, 1962.

BRUNO, M. *et al.* Protein carbonyl formation in response to propiconazole-induced oxidative stress. *Journal of Proteome Research*, v. 8, n. 4, p. 2070–2078, 2009.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* A modified drug regimen clears active and dormant trypanosomes in mouse models of Chagas disease. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 567, p. eabb7656, 28 out. 2020.

BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 7, n. 3, p. 317–325, maio 2014.

BUTTROS, J. B. *et al.* Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *Pharmacology*, v. 84, n. 1, p. 29–37, 2009.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 13 out. 2019.

CALVET, C. M. *et al.* Long term follow-up of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease manifestations in mice treated with benznidazole or posaconazole. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 9, p. e0008726, 24 set. 2020.

CARLOS PINTO DIAS, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, v. 25, n. 8, p. 471–479, 1 ago. 2006.

CEVEY, Á. C. *et al.* Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 6, n. 1, p. 12–22, abr. 2016.

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

CHEN, Q. *et al.* Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 32, p. 11105–11109, 12 ago. 2008.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 4, p. 549–554, jul. 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2 dez. 2014.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

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

DAKHALE, G. N.; CHAUDHARI, H. V.; SHRIVASTAVA, M. *Supplementation of Vitamin C Reduces Blood Glucose and Improves Glycosylated Hemoglobin in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind Study*. Research Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/aps/2011/195271/>>. Acesso em: 22 jul. 2020.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, v. 329, n. 1–2, p. 23–38, mar. 2003.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 10, n. 2, p. 389–406, 2006.

DE BONA, E. *et al.* Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1842, 6 ago. 2018.

DE GODOY, L. M. F. *et al.* Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *PROTEOMICS*, v. 12, n. 17, p. 2694–2703, ago. 2012.

DE OLIVEIRA, G. M. *et al.* Induction of proinflammatory cytokines and nitric oxide by *Trypanosoma cruzi* in renal cells. *Parasitology Research*, v. 109, n. 2, p. 483–491, ago. 2011.

DE OLIVEIRA, R. B.; MENEGHELLI, U. G. Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease. v. 93, n. 6, p. 6, 1998.

DE TULLIO, M. C.; ARRIGONI, O. Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, v. 61, n. 2, p. 209–219, 1 jan. 2004.

DE TULLIO, MARIO C. Beyond the Antioxidant: The Double Life of Vitamin C. In: STANGER, O. (Org.). *Water Soluble Vitamins: Clinical Research and Future Application*. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 49–65. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2199-9_4>. Acesso em: 21 jul. 2020.

DHIMAN, M. *et al.* Cardiac-Oxidized Antigens Are Targets of Immune Recognition by Antibodies and Potential Molecular Determinants in Chagas Disease Pathogenesis. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. e28449, 4 jan. 2012.

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

DIAS, P. P. *et al.* Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 8, p. e0005852, 23 ago. 2017.

DO VALE, G. T. *et al.* Nebivolol prevents ethanol-induced reactive oxygen species generation and lipoperoxidation in the rat kidney by regulating NADPH oxidase activation and expression. *European Journal of Pharmacology*, v. 799, p. 33–40, mar. 2017.

DO VALE, G. T. *et al.* Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis*, v. 274, p. 67–76, jul. 2018.

DROUIN, G.; GODIN, J.-R.; PAGE, B. The Genetics of Vitamin C Loss in Vertebrates. *Current Genomics*, v. 12, n. 5, p. 371–378, 1 ago. 2011.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES. *Phase 2 Randomized, Multicenter, Safety and Efficacy Trial to Evaluate Different Oral Benznidazole Monotherapy and Benznidazole/E1224 Combination Regimens for the Treatment of Adult Patients With Chronic Indeterminate Chagas Disease*. Clinical trial registration, n° NCT03378661. [S.l.]: clinicaltrials.gov, 14 dez. 2017. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03378661>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

DUARTE, T. L.; LUNEC, J. Review Part of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene Expression Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, v. 39, n. 7, p. 671–686, jul. 2005.

FORSYTH, C. J. *et al.* Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 8, p. 1056–1062, 15 out. 2016.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Challenges in Chagas Disease Drug Development. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 2799, 17 jun. 2020.

GAO, B. Basic liver immunology. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 13, n. 3, p. 265–266, maio 2016.

GAO, F. *et al.* Enhancement of Glutathione Cardioprotection by Ascorbic Acid in Myocardial Reperfusion Injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 301, n. 2, p. 543–550, 1 maio 2002.

GOES, G. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. e0004555, 1 abr. 2016.

GONZAGA, N. A.; SIMPLICIO, J. A.; TIRAPELLI, C. R. 332 - Ethanol Withdrawal Induces Oxidative Damage and Hypertension: Role of AT1 Receptor Activation. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 100, p. S142–S143, 1 nov. 2016.

GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 197–221. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128010297000095>>. Acesso em: 8 jun. 2020.

GUEDES, P. M. *et al.* Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 9, n. 5, p. 609–620, 1 maio 2011.

GULLO, C. E. *et al.* Digestive forms of Chagas disease and carcinogenesis: a study of association. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 39, n. 2, p. 146–150, abr. 2012.

GUPTA, S.; WEN, J.-J.; GARG, N. J. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696642/>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 502, n. 2, p. 183–186, jul. 2018.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 115–123, jan. 2012.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 75, n. 3, p. 637–644, 2013.

JIMÉNEZ, P. *et al.* A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, v. 146, n. 3, p. 269–283, mar. 2019.

KNIGHT, J. *et al.* Ascorbic acid intake and oxalate synthesis. *Urolithiasis*, v. 44, n. 4, p. 289–297, ago. 2016.

LEMOS, J. R. D. *et al.* Influence of Parasite Load on Renal Function in Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e71772, 12 ago. 2013.

LEVINE, R. L. *et al.* [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1990. v. 186. p. 464–478. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/007668799086141H>>. Acesso em: 3 ago. 2020.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, v. 7, p. 166, 2 jul. 2019.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, v. 13, p. 757–772, 26 abr. 2018.

LIU, Y.; ZENG, H.; XU, J. Recent Advance on Drug Therapy Related to Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 12, n. 2, p. 299–305, 1 fev. 2022.

LOPEZ, M.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Current Clinical Microbiology Reports*, v. 5, n. 1, p. 45–54, mar. 2018.

MAÇAO, L. B. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, v. 123, n. 1, p. 43–49, 2007.

MACHADO, F. S.; TANOWITZ, H. B.; RIBEIRO, A. L. Pathogenesis of Chagas Cardiomyopathy: Role of Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of the American Heart*

Association, v. 2, n. 5, 26 set. 2013. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.113.000539>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

MACHADO-SILVA, A. *et al.* How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 767, p. 8–22, 2016.

MARINHO, C. R. F. *et al.* Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 13, p. 1037–1045, nov. 2009.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation*, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 6 mar. 2007.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, v. 58, n. 2, p. 85–90, 1 maio 2010.

MASON, S. A. *et al.* Ascorbic acid supplementation improves postprandial glycaemic control and blood pressure in individuals with type 2 diabetes: Findings of a randomized cross-over trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 674–682, 2019.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clinics*, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, dez. 2009.

MATTOSO-BARBOSA, A. M. *et al.* Physiology and Pathology of Infectious Diseases: The Autoimmune Hypothesis of Chagas Disease. In: REZAEI, N. (Org.). *Physiology and Pathology of Immunology*. [S.l.]: InTech, 2017. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/physiology-and-pathology-of-immunology/physiology-and-pathology-of-infectious-diseases-the-autoimmune-hypothesis-of-chagas-disease>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

MAY, J. M. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, n. 9, p. 1421–1429, maio 2000.

MCCORD, J. M. Iron, free radicals, and oxidative injury. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 11, p. 3171S–3172S, nov. 2004.

MEDINA-RINCÓN, G. J. *et al.* Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. *Pathogens*, v. 10, n. 11, p. 1493, nov. 2021.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *The Journal of Parasitology*, v. 64, n. 3, p. 475–482, jun. 1978.

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

MEŠČIĆ MACAN, A.; GAZIVODA KRALJEVIĆ, T.; RAIĆ-MALIĆ, S. Therapeutic Perspective of Vitamin C and Its Derivatives. *Antioxidants*, v. 8, n. 8, p. 247, ago. 2019.

MONFORT, A.; WUTZ, A. Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO reports*, v. 14, n. 4, p. 337–346, 1 abr. 2013.

MORETTI, M.; FRAGA, D. B.; RODRIGUES, A. L. S. Preventive and therapeutic potential of ascorbic acid in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 23, n. 12, p. 921–929, 2017.

MORILLO, C. A. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, out. 2015.

MURPHY, N. *et al.* Assessing antibody decline after chemotherapy of early chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors*, v. 14, n. 1, p. 543, dez. 2021.

NOVAES, R. D. *et al.* Curcumin Enhances the Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Benznidazole-Based Chemotherapy in Acute Experimental Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 6, p. 3355–3364, 1 jun. 2016.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. *Parasitology Research*, v. 114, n. 8, p. 2873–2881, 2015.

OLIVEIRA CORREIA, J. P. S. *et al.* *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. *Insects*, v. 13, n. 7, p. 591, 28 jun. 2022.

OLIVERA, M. J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, p. 1–13, 2017.

PAIVA, C. N. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, n. 7, p. 2531–42, 2012.

PEDROSA, R. C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox Report*, v. 6, n. 4, p. 265–270, ago. 2001.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Enzyme-Linked Immunoassay Using Recombinant trans-Sialidase of *Trypanosoma cruzi* Can Be Employed for Monitoring of Patients with Chagas' Disease after Drug Treatment. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10, n. 5, p. 826–830, set. 2003.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. *The Lancet*, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 7, p. 723–734, set. 2013.

PIRON, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, v. 103, n. 3, p. 195–200, set. 2007.

PORCEL, B. M. *et al.* Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, n. 4, p. 526–529, 1 out. 1998.

PROVIDELLO, M. V. *et al.* Benefits of Ascorbic Acid in Association with Low-Dose Benznidazole in Treatment of Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 9, p. e00514-18, 1 set. 2018.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, abr. 2010.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2007.

RODRIGUEZ-GUERINEAU, L. *et al.* Pediatric Chagas Disease in Europe: 45 Cases From Spain and Switzerland. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 33, n. 5, p. 458–462, maio 2014.

SCARIM, C. B. *et al.* Hydroxymethylnitrofurazone treatment in indeterminate form of chronic Chagas disease: Reduced intensity of tissue parasitism and inflammation—A histopathological study. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 99, n. 5, p. 236–248, 2018.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 1, p. e931, 11 jan. 2011.

SHENOY, N. *et al.* Ascorbic Acid in Cancer Treatment: Let the Phoenix Fly. *Cancer Cell*, v. 34, n. 5, p. 700–706, 12 nov. 2018.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, dez. 1986.

SIES, H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biology*, v. 41, p. 101867, maio 2021.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, n. 1, p. 715–748, 2017.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363–383, jul. 2020.

SILVA, L. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol Clin Biol*, v. 20, p. 191–207, 1953.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 116–129, jul. 2018.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 12, n. 3, p. 323–325, 1 fev. 2010.

TIBAYRENC, M.; TELLERIA, J. (Org.). *American trypanosomiasis: Chagas disease: one hundred years of research*. 1st ed ed. London ; Burlington, MA, USA: Elsevier, 2010. (Elsevier insights).

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, n. 1–2, p. 211–220, abr. 2004.

TZIZIK, D. M.; BORCHARDT, R. A. Chagas disease: An underrecognized diagnosis. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, v. 31, n. 12, p. 30–33, dez. 2018.

ÜLKER, S.; MCKEOWN, P. P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins Reverse Endothelial Dysfunction Through Regulation of eNOS and NAD(P)H Oxidase Activities. *Hypertension*, v. 41, n. 3, p. 534–539, mar. 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 55–68, 2010.

VELASCO, A.; MORILLO, C. A. Chagas heart disease: A contemporary review. *Journal of Nuclear Cardiology*, v. 27, n. 2, p. 445–451, abr. 2020.

VIÑA, J.; BORRAS, C.; GOMEZ-CABRERA, M. C. A free radical theory of frailty. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 124, p. 358–363, 20 ago. 2018.

VIOTTI, R. *et al.* Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. *Annals of Internal Medicine*, v. 144, n. 10, p. 724–734, 16 maio 2006.

VIOTTI, R. *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease : fears and realities. p. 157–163, 2009.

VISWANATHA SWAMY, A. H. M. *et al.* Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 43, n. 5, p. 507, 2011.

WANG, D. *et al.* Ascorbic acid enhances low-density lipoprotein receptor expression by suppressing proprotein convertase subtilisin/kexin 9 expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 47, p. 15870–15882, 20 nov. 2020.

WEN, J. J.; PORTER, C.; GARG, N. J. Inhibition of NFE2L2-Antioxidant Response Element Pathway by Mitochondrial Reactive Oxygen Species Contributes to Development of Cardiomyopathy and Left Ventricular Dysfunction in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 27, n. 9, p. 550–566, 2017.

WEN, J.-J.; GARG, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 12, p. 2072–2081, dez. 2004.

WEN, J.-J.; GARG, N. J. Proteome Expression and Carbonylation Changes During *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease in Rats. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 11, n. 4, p. M111.010918, abr. 2012.

YOGI, A. *et al.* Acute ethanol intake induces superoxide anion generation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat aorta: A role for angiotensin type 1 receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 470–478, 1 nov. 2012.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology International*, v. 57, n. 2, p. 105–109, 2008.

ZINGALES, B. *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p. 828–833, set. 2014.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240–253, mar. 2012.

ANEXOS

Anexo 1. Autorização emitida pela CEUA.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Estudo sobre o efeito tripanocida e antioxidante do ácido ascórbico no tratamento da doença de Chagas experimental", registrada sob nº 17.1.989.60.4, sob a responsabilidade de Maiara Voltarelli Providello e Sergio de Albuquerque, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 01/03/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	08/02/2018 a 08/07/2020	
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico BALB/c	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	10	220
Peso/Idade	20g/ 6 semanas	20g/ 5 semanas
Sexo	Fêmea	Fêmea
Origem	Biotério Central do Campus USP de Ribeirão Preto	Biotério Central do Campus USP de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 01º de março de 2019.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

