

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

MARCUS VINÍCIUS PESSOA SARTINI

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA COMBINAÇÃO DE BENZNIDAZOL E
CURCUMINA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *T. CRUZI***

ALFENAS/MG
2015

MARCUS VINÍCIUS PESSOA SARTINI

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA COMBINAÇÃO DE BENZNIDAZOL E
CURCUMINA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *T. CRUZI***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias. Orientador: Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes.

ALFENAS/MG
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Sartini, Marcus Vinícius Pessoa

Avaliação pré-clínica da combinação de benznidazol e curcumina no tratamento etiológico da infecção por T. Cruzi / Marcus Vinícius Pessoa Sartini -- Alfenas/MG, 2015.

55 f.

Orientador: Rômulo Dias Novaes.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Coração. 2. Inflamação. 3. Cardiomiopatias. 4. Quimioterapia.
I. Novaes, Rômulo Dias. II. Título.

CDD-616.96

MARCUS VINÍCIUS PESSOA SARTINI

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA COMBINAÇÃO DE BENZNIDAZOL E
CURCUMINA NO TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Aplicada à Saúde pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em 17/12/2015

Professor(a) ALINE SILVA DE MIRANDA
Instituição UFMG

Assinatura Aline Silva de Miranda

Professor(a) Rômulo Elias Novais
Instituição UNIFAL

Assinatura Rômulo Elias Novais

Professor(a) Alessandro Antonio Costa Pereira
Instituição UNIFAL-MG

Assinatura Alessandro Antonio Costa Pereira

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmão, familiares, amigos, professores, além das pessoas que passaram rapidamente por minha vida mas que contribuíram de alguma maneira pro meu processo de formação não só acadêmico e profissional, mas principalmente moral. Tudo que sou hoje foi moldado através da presença, dos ensinamentos e das trocas de experiências de cada universo individual que é cada ser humano. Agradeço a todos vocês e também a essa força que não se mede, não é tangível, que a ciência não explica, ao menos ainda, que é a essência de cada um de nós e que nos auxilia nas escolhas e possibilidades que a vida vai nos apresentando pelo caminho.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas representa uma doença tropical negligenciada causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença de Chagas representa a principal causa de cardiomiopatia não isquêmica em todo o mundo. Embora a quimioterapia com benznidazol seja indicada como referência no tratamento etiológico da doença, após o parasito se instalar em múltiplos órgãos do hospedeiro vertebrado, a cura geralmente não é alcançada. Assim, novas drogas e esquemas terapêuticos têm sido testados na busca por estratégias mais eficientes e toleráveis no tratamento da doença. Devido a sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora, a curcumina tem mostrado efeitos promissores no tratamento de doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose. Entretanto a aplicabilidade da curcumina no manejo terapêutico da doença de Chagas ainda é pouco conhecida. Dessa forma, o presente estudo foi delineado para investigar a influência do tratamento com benznidazol e curcumina sobre o parasitismo sanguíneo e cardíaco, resposta inflamatória, dano oxidativo e remodelamento morfológico do miocárdio em camundongos infectados por *T. cruzi*. Oitenta e quatro camundongos suíços fêmeas com oito semanas de vida foram igualmente divididos em sete grupos: **G1**, não infectados; **G2**, infectados; **G3**, infectados + benznidazol (100 mg/kg); **G4**, infectados + benznidazol (50 mg/kg); **G5**, infectados + curcumina (100 mg/kg); **G6**, infectados + benznidazol (100 mg/kg) + curcumina (100 mg/kg); **G7**, infectados + benznidazol (50 mg/kg) + curcumina (100 mg/kg). Os animais infectados foram inoculados intraperitonealmente com 2000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. O benznidazol e a curcumina foram oralmente administrados uma vez a dia, durante 20 dias, por meio de gavagem. Os resultados indicaram que a curcumina apresentou efeitos antiparasitários limitados, mas que quando combinada ao benznidazol, essa molécula potencializou a ação terapêutica da quimioterapia de referência. Aparentemente, esse efeito foi mediado por uma maior redução da parasitemia, carga parasitária, processo inflamatório e dano oxidativo cardíaco, bem como bloqueio da reativação da infecção após o término do tratamento. Além de aumentar a sobrevivência e taxa de cura em camundongos infectados, o tratamento combinado também atenuou a toxicidade hepática induzida pelo benznidazol, impedindo a reativação da infecção mesmo quando os animais foram tratados com a metade da dose terapêutica recomenda para o benznidazol.

Palavras-chave: Coração. Inflamação. Cardiomiopatia. quimioterapia experimental.

ABSTRACT

The American trypanosomiasis or Chagas disease is a neglected tropical disease caused by protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Chagas' disease is the leading cause of non-ischemic cardiomyopathy worldwide. Although chemotherapy with benznidazol is recommended as a reference in the etiological treatment of the disease, after the parasite settling in multiple organs of the vertebrate host, healing is usually not achieved. Thus, new drugs and therapeutic schedules have been tested in the search for more tolerable and effective strategies for the treatment of disease. Due to its anti-inflammatory activity, antioxidant and immunomodulatory, the curcumin has shown promising effects on the treatment of parasitic diseases such as malaria, leishmaniasis and schistosomiasis. However, the applicability of curcumin in the therapeutic management of Chagas disease is still unknown. Thus, the present study was designed to investigate the influence of treatment with benznidazol and curcumin on blood and cardiac parasitism, inflammatory response, oxidative damage and morphological myocardial remodeling in mice infected with *T. cruzi*. Eighty-four Swiss female mice eight weeks of life were equally divided into seven groups: G1, uninfected; G2, infected; G3 infected benznidazol + (100 mg / kg); G4 infected benznidazol + (50 mg / kg); G5, infected + curcumin (100mg / kg); G6 infected benznidazol + (100 mg / kg) + curcumin (100mg / kg); G7 infected benznidazol + (50 mg / kg) + curcumin (100mg / kg). The infected animals were inoculated intraperitoneally with 2000 trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain. The benznidazol and curcumin were administered orally once daily for 20 days by gavage. The results showed that curcumin had limited antiparasitic effects, but when combined with benznidazol, this molecule enhanced the therapeutic action of the reference chemotherapy. Apparently, this effect was mediated by a greater reduction in parasitemia, parasite load, inflammation and cardiac oxidative damage and block the reactivation of the infection after completion of treatment. In addition to increasing the survival and cure rate in infected mice, the combined treatment also attenuated hepatic toxicity induced by benznidazol, preventing reactivation of infection even when the animals were treated with half the therapeutic dose recommended for benznidazol.

Keywords: Heart. Inflammation. Cardiomyopathy. Experimental chemotherapy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis de parasitemia e taxa de sobrevivência.....	29
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curvas de parasitemia.....	30
Figura 2 -	Reativação da infecção após o tratamento.....	31
Figura 3 -	Carga parasitária no tecido cardíaco e cura parasitológica por (qPCR)	32
Figura 4 -	Imunoreatividade de anticorpos séricos anti- <i>T. cruzi</i>	33
Figura 5 -	Níveis séricos de citocinas avaliados por ELISA	34
Figura 6 -	Fotomicrografias representativas do miocárdio do ventrículo direito.....	35
Figura 7 -	Densidade de número de núcleos de células intersticiais (QA_{inf}) no miocárdio	36
Figura 8 -	Níveis cardíacos e hepáticos de MDA e PCN.....	37
Figura 9 -	Níveis séricos das enzimas de função hepática.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	A Doença de Chagas.....	10
1.2	Quimioterapia utilizada para o tratamento da Doença de Chagas.....	11
1.3	Papel do estresse oxidativo na patogênese da cardiomiopatia chagásica.....	13
1.4	<i>Curcuma longa</i> L.....	15
1.5	Atividade antiparasitária da Curcumina.....	17
1.6	Justificativa e relevância do estudo.....	18
1.7	Objetivos.....	20
1.7.1	Objetivos gerais.....	21
1.7.2	Objetivos específicos.....	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1	Animais e infecção.....	22
2.2	Estratégia de tratamento e grupos experimentais.....	22
2.3	Análise de parasitemia e mortalidade.....	23
2.4	Análise de toxicidade hepática.....	24
2.5	Ensaio de reativação da infecção.....	24
2.6	Análise de carga parasitária e cura parasitológica por qPCR para DNA de <i>T. Cruzi</i>.....	25
2.7	Ensaio para imunoglobulinas.....	26
2.8	Ensaio para citocinas.....	26
2.9	Análise histopatológica e estereológica.....	27
2.10	Avaliação do dano oxidativo tecidual.....	28
2.11	Análise estatística.....	28
3	RESULTADOS.....	29
4	DISCUSSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Esta introdução traz, separadamente, tópicos para melhor entendimento das justificativas e objetivos deste trabalho:

1.1 A Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Trypanosoma cruzi*. Em humanos, a infecção por *T. cruzi* afeta a estrutura e função principalmente do sistema cardiovascular, gastrointestinal, muscular e nervoso, podendo levar a morte do hospedeiro (HIGUCHI *et al.*, 2003; RASSI JR *et al.*, 2010). A doença de Chagas persiste como um problema médico-social grave de difícil abordagem clínica devido a sua característica infecciosa sistêmica e a variabilidade de manifestações clínicas que se desenvolvem ao longo de sua evolução (HOTEZ *et al.*, 2008; BIOLO *et al.*, 2010). Atualmente, a doença de Chagas representa uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), com aproximadamente 13 milhões de indivíduos infectados na América Latina e Caribe (HOTEZ *et al.*, 2012). No Brasil, a prevalência é de 200.000 novos casos anuais e 50.000 óbitos/ano segundo a World Health Organization (WHO, 2013). Em regiões não endêmicas como na América do Norte, Europa e Pacífico Ocidental, a doença se apresenta em ascensão. Na América do Norte ela é responsável por cerca 1 milhão de casos já notificados. Na Europa Ocidental o número de casos relatados já alcança mais de 40.000 (RASSI JR *et al.*, 2010; DNDI, 2012).

O homem é o principal hospedeiro acidental do *T. cruzi* e a transmissão vetorial desse parasito, que ocorre por meio de insetos hematófagos (triatomíneos), é a mais proeminente, representando 80 a 90% dos casos (CHAGAS, 1916; RASSI JR *et al.*, 2010). A doença de Chagas se desenvolve em duas fases distintas e sucessivas, aguda e crônica (ANDRADE, 2000). A fase aguda tem início quando o protozoário penetra no organismo do hospedeiro vertebrado. Frequentemente ela é assintomática e pode não ser diagnosticada, embora as formas alongadas (tripomastigotas) circulantes possam ser detectadas no sangue. Nessa fase, tripomastigotas se distribuem pelo organismo e proliferam principalmente nas células do sistema mononuclear fagocitário, diferenciando-se em formas ovóides (amastigotas)

(MARIN-NETO *et al.*, 2007; BIOLO *et al.*, 2010; RASSI-JR *et al.*, 2010). As formas amastigotas do *T. cruzi* frequentemente se alojam em múltiplos órgãos, ocasionando lesão e destruição celular associada a processos imunoinflamatórios (HIGUCHI *et al.*, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007; BIOLO *et al.*, 2010).

A fase crônica tem início após a 8ª semana de infecção e pode ser assintomática ou indeterminada. Nessa fase, podem ser encontradas formas amastigotas alojadas em diferentes tecidos do hospedeiro, e a presença de parasitos circulantes geralmente não é evidenciada (ANDRADE, 2000). No entanto, a presença de proteínas e ácidos nucleicos teciduais pode ser detectada por meio de testes imunológicos e moleculares como imunistoquímica e PCR (*Polymerase Chain Reaction*), respectivamente (WHO, 2012). Em alguns casos pode ser observado processo patológico relacionado a distribuição das formas amastigotas nos tecidos, como destruição celular, infiltrado inflamatório e fibrose tecidual (HIGUCHI *et al.*, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007; BIOLO *et al.*, 2010). A fase crônica desenvolve-se em 30 a 40% dos pacientes infectados. Nessa fase, a cardiomiopatia chagásica representa o evento com maior morbimortalidade e mais incapacitante, sendo resultante do progressivo dano ao miocárdio e de miocardite fibrosante, característica da doença (COURA, 2013).

Apesar do protozoário ser capaz de infectar vários órgãos, ele apresenta intenso tropismo pelo músculo cardíaco. Assim, a doença de Chagas caracteriza-se como a causa mais comum de cardiomiopatia não isquêmica em todo o mundo (MELO *et al.*, 2011), levando a morte de milhares de pacientes a cada ano, principalmente devido a cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca congestiva, disritmias e eventos tromboembólicos que ocorrem em aproximadamente 30% dos indivíduos infectados (MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI-JR *et al.*, 2009, 2010). Estudos prévios indicaram que em 2001 a cardiomiopatia chagásica foi responsável por um terço dos casos de insuficiência cardíaca no Brasil (MENDEZ; COWIE, 2001), constituindo a terceira maior causa de indicação para transplante de coração (BOCCHI *et al.*, 2001).

1.2 Quimioterapia utilizada para o tratamento da Doença de Chagas

A doença de Chagas acarreta elevados custos para os serviços de saúde. Atualmente, não existe vacina para a doença e, embora existam medicamentos como o benznidazol e o Nifurtimox para o seu tratamento, essas drogas apresentam elevada toxicidade e não garantem

a cura após a disseminação e instalação do parasito nos órgãos e tecidos do hospedeiro vertebrado (RASSI-JR *et al.*, 2010; WHO, 2012; NOVAES *et al.*, 2015).

Apesar das recentes pesquisas na busca de drogas capazes de inibir o parasitismo, a instalação e o desenvolvimento da doença, os alvos terapêuticos atuais apresentam eficácia limitada (MUÑOZ *et al.*, 2011). Na ausência de drogas mais eficientes, a quimioterapia convencional permanece como a principal estratégia de tratamento etiológico da doença de Chagas (CANÇADO, 2002; SOSA-ESTANI *et al.* 2009, MUÑOZ *et al.*, 2011). A quimioterapia específica introduzida para uso há quatro décadas baseia-se no Nifurtimox (3-metil-4 [(5-nitrofurfurilidene) amino] tiomorfoline-1,1-dióxido) comercializado com o nome de (LampitTM), e o benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamida) comercializado desde o ano de 1978 até 2003 com o nome Rochagan[®] pela indústria farmacêutica Roche. O mecanismo de ação do Nifurtimox relaciona-se a redução do grupamento nitro com subsequente produção de radicais livres principalmente radicais hidroxila (OH[•]), o qual é tóxico para o parasito (URBINA, 2003). Essa droga se tornou inconveniente para o uso em humanos devido à alta toxicidade e efeitos colaterais como reações de hipersensibilidade, anorexia, vômitos, polineurite e depressão da produção de células pela medula óssea (URBINA, 2003; DOCAMPO, 1990). Atualmente Nifurtimox não é mais comercializado no Brasil e o benznidazol é a única droga disponível e clinicamente prescrita para tratamento de pacientes chagásico nas últimas décadas (MUÑOZ *et al.*, 2011; NOVAES *et al.*, 2015). Após 2003, a empresa Roche transferiu os direitos e a tecnologia de fabricação do benznidazol para o governo brasileiro, o qual a partir de 2008 passou a ser o único produtor mundial da droga e a fornecer o medicamento à população (OPAS 2011).

Benznidazol é uma droga nitroeterocíclica que atua por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos pela redução do grupo nitro. A droga distribui-se no meio extra e intracelular, agindo sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito (DOCAMPO; MORENO, 1984; SILVEIRA *et al.*, 2000; URBINA, 2003). Embora o mecanismo de ação do benznidazol ainda não esteja completamente elucidado, é amplamente reconhecido que espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) produzidos durante o metabolismo (principalmente OH[•] e o óxido nítrico [NO]) estão envolvidas no efeito tripanocida da droga. Entretanto, essas espécies reativas também interagem com biomoléculas celulares causando a oxidação de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos; culminando em lesão ou morte de células do hospedeiro (MAYA *et al.*, 2006; NOVAES *et al.*, 2015). A elevada toxicidade e os efeitos colaterais associadas à terapia de referência para a doença de Chagas representam importantes limitações ao uso do

benznidazol. Uma série de efeitos colaterais decorrentes do uso da droga tem sido descritos, dentre esses destacam-se: hepatite tóxica, imunossupressão, polineuropatia periférica, intolerância digestiva, anorexia, e neoplasias (BOCCHI *et al.*, 1993, PEREZ-MOLINA *et al.*, 2009; MARIN-NETO *et al.*, 2009). Apesar do amplo espectro de efeitos colaterais associados ao uso do benznidazol, a relação risco benefício ainda se mostra favorável na fase aguda da doença, uma vez que estudos clínicos têm demonstrado eficácia aceitável da droga em reduzir a parasitemia, o parasitismo e as lesões em órgãos alvo (especialmente no músculo cardíaco), mesmo nos casos em que a cura não é alcançada (CANÇADO, 2002; PEREZ-MOLINA *et al.*, 2009; MUNOZ *et al.*, 2011).

Tendo em vista a elevada morbidade e mortalidade causada pela doença de Chagas, a toxicidade e eficiência limitada do tratamento atualmente disponível, é de extrema importância desenvolver novos métodos e esquemas terapêuticos menos nocivos e mais eficientes (MUNOZ *et al.*, 2011). Uma alternativa em potencial no tratamento da infecção por *T. cruzi* envolve o uso de compostos naturais derivados de plantas, como a curcumina, a qual apresenta um amplo espectro de atividade biológica, incluindo ação antiparasitária direta sobre diferentes espécies de parasitos protozoários bem como potente propriedade imunomodulatória, anti-inflamatória e antioxidante (CUI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008; ALLAM *et al.*, 2009; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; VATHSALA *et al.*, 2012; ZORAIMA NETO *et al.*, 2013).

1.3 Papel do estresse oxidativo na patogênese da cardiomiopatia chagásica

Na última década, foi amplamente investigada e demonstrada a participação do estresse oxidativo na deterioração da estrutura e função cardíaca na doença de Chagas. Em animais, foi identificada a instalação de um status pró-oxidante de intensidade progressiva ao longo da infecção por *T. cruzi*, indicando que o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica também está associado ao acúmulo de lesões oxidativas no músculo cardíaco (WEN; GARG, 2008; GUPTA *et al.*, 2009a). Foi demonstrado que as células inflamatórias recrutadas produzem grande quantidade de espécies reativas como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), moléculas que participam dos mecanismos de defesa contra

a infecção parasitária (GUPTA *et al.*, 2009a,b). Essas espécies reativas também são produzidas pelos próprios cardiomiócitos infectados, evento que não representa um mecanismo de defesa contra o parasito, mas sim uma alteração funcional das mitocôndrias que ocorre durante o parasitismo celular. Assim, a produção de espécies reativas pelos cardiomiócitos constitui um fator de susceptibilidade para a lesão do miocárdio, morte celular, agravamento do processo inflamatório e disfunção do músculo cardíaco na cardiomiopatia chagásica (WEN *et al.*, 2004, 2006; GUPTA *et al.*, 2009a,b).

Sabe-se que as citocinas e quimiocinas podem alterar o equilíbrio redox do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; GUPTA *et al.*, 2009a). Existe evidência de que a infecção por *T. cruzi* induz a expressão das citocinas TNF, IL-1 e IL-6, as quais participam no controle do parasita estimulando a síntese de agentes citotóxicos como as espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (GUPTA *et al.*, 2009 a,b). Em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*, a produção de espécies reativas pode ser aumentada pelas citocinas TNF, IFN- γ e IL1- β , o que não ocorre quando cardiomiócitos não infectados são tratados com essas moléculas (GUPTA *et al.*, 2009a,b). Têm sido relatado um papel chave do TNF e IFN- γ na indução da síntese de NO em animais infectados por *T. cruzi*, molécula diretamente envolvida na resistência do hospedeiro à infecção e no controle da parasitemia e parasitismo celular (GAZZINELLI *et al.*, 1992; MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994). Em humanos, os níveis de TNF e NO foram inversamente correlacionados com os níveis das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), e diretamente correlacionados com a severidade da cardiomiopatia chagásica (PÉRES-FUENTES *et al.*, 2003). Além da produção aumentada de espécies reativas, também foi demonstrada redução gradual da atividade das enzimas SOD, GPX e glutathione S-transferase (GST) em elementos sanguíneos ao longo da evolução da doença em humanos (PÉRES-FUENTES *et al.*, 2003). Como a menor expressão dessas enzimas foi observada nos graus mais avançados de lesão cardíaca, a redução da defesa antioxidante endógena parece contribuir para a progressão da cardiomiopatia chagásica (PÉRES-FUENTES *et al.*, 2003; WEN *et al.*, 2004).

Estudos prévios demonstraram que a utilização de agentes anti-inflamatórios e antioxidantes são potencialmente aplicáveis e eficientes em atenuar os danos cardíacos induzidos por *T. cruzi* (WEN; GARG, 2008). Dessa forma, diferentes substâncias sintéticas e naturais estão sendo investigadas na tentativa de se identificar compostos capazes de atenuar a progressão e a gravidade da cardiomiopatia chagásica (URBINA; DOCAMPO, 2003; MAYA

et al., 2006, MELO *et al.*, 2011; MUÑOZ *et al.*, 2011). Recentemente, a *Curcuma longa* L. tem se destacado como um recurso natural aplicável no manejo terapêutico de doenças parasitárias, incluindo malária, esquistossomose, leishmaniose e doença de Chagas (CUI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008; ALLAM, 2009; MIMCHE *et al.*, 2011; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Embora a *C. longa* L. apresente amplo espectro de atividade biológica, sua ação imunomodulatória, anti-inflamatória e antioxidante tem se destacado em investigações recentes, sendo consideradas importantes características que fazem dessa planta uma potencial candidata para o desenvolvimento de novas drogas com ação antiparasitária (YADAV *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2007; VATHSALA *et al.*, 2012).

1.4 *Curcuma longa* L.

A *C. longa* L., uma planta da família Zingiberaceae, é comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo amplamente cultivada em países asiáticos, principalmente na Índia e China (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Na Malásia, Indonésia e Índia tem sido sistematicamente estudada devido à sua importância econômica e aplicação na medicina popular. Como um pó, chamado de açafrão, é utilizado na preparação de alimentos como um tempero por seu aroma e propriedades digestivas (GOVINDARAJAN, 1980; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Evidências etnobotânicas indicaram a utilização do pó de *C. longa* L. na medicina tradicional indígena contra desordens biliares, anorexia, coriza, tosse, feridas diabéticas, doença hepática, reumatismo e sinusite (AMMON *et al.* 1992; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Na medicina Hindu, é comumente utilizado no tratamento de entorse e inchaços causados por lesão e na medicina tradicional Chinesa a *C. longa* L. é comumente utilizada no tratamento de doenças associadas a dores abdominais. (AMMON; WAHL, 1991).

A curcumina (1*E*,6*E*)-1,7-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), comumente chamada diferuloilmetano, é um composto fenólico que constitui o princípio corante do açafrão, o qual é extraído a partir dos rizomas da *C. longa* L. Com cor amarela-alaranjada, constitui o principal componente ativo da planta responsável por uma variedade de efeitos biológicos e farmacológicos (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; DAS *et al.*, 2008). Diversos estudos demonstraram a segurança da curcumina e dos seus derivados em modelos animais (CHIU *et al.*, 2009; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Devido ao baixo potencial de

toxicidade, foi previamente demonstrado que a administração da curcumina, mesmo em doses elevadas (2 g/kg de peso corporal), é segura e não apresenta evidências de toxicidade orgânica em camundongos (ZORAIMA NETO *et al.*, 2013).

O crescente interesse científico na curcumina fundamenta-se no seu amplo espectro de ação biológica que envolve efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, imunomoduladores, anti-angiogênicos, anti-infecciosos, capacidade para regular a apoptose, e propriedades anticancerígenas. Tem sido amplamente demonstrado que esses efeitos estão relacionados com a capacidade da curcumina de inibir a expressão e/ou atividade de moléculas alvo, incluindo vários fatores de crescimento, fatores de transcrição, citocinas e enzimas envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças (CHIU *et al.* 2009; KANG; CHEN 2009; KUTTAN *et al* 2007; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Estudos prévios indicaram que a curcumina pode modular a expressão de genes que regulam a homeostase cardíaca e que estão envolvidos na progressão de doenças do coração. Nesse contexto, estudo prévio demonstrou o potencial da curcumina para prevenir e reverter a hipertrofia e insuficiência cardíaca em modelos animais (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; GHOSH *et al.* 2010).

A curcumina tem sido utilizada em estudos pré-clínicos como um potente inibidor de inflamações agudas e crônicas. Existem indícios de que sua ação inibitória sobre a formação de leucotrienos por neutrófilos peritoneais em ratos é superior à antinflamatórios esteróides como a hidrocortisona (AMMON *et al.*, 1992; MIMCHE *et al.*, 2011). Sabe-se que a curcumina pertence a classe dos curcuminóides e é muito semelhante aos diarilheptanoides, moléculas que apresentam comprovada atividade antinflamatória (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Além disso, a atividade inflamatória da curcumina também tem sido associada a redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ (efeito mediado pela inibição da via de sinalização do NF- κ B); e a inibição da expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular, reduzindo a taxa migração de células do sistema imune e a intensidade da inflamação (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; MIMCHE *et al.*, 2011).

Têm sido demonstrado que a curcumina apresenta importante atividade antioxidante capaz de inibir o estresse oxidativo em múltiplos órgãos (PULLA; LOKESH, 1994; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008), o qual apresenta papel fundamental na inflamação. A ação antioxidante da curcumina têm sido associada a neutralização direta e redução da síntese de radicais livres por células inflamatórias, bem como modulação do sistema enzimático antioxidante endógeno. Dessa forma, existem diversas evidências de que a curcumina é capaz de neutralizar espécies reativas derivadas do oxigênio (como o peróxido de hidrogênio, ânion

superóxido e radicais hidroxila) e do nitrogênio (como o óxido nítrico), que estão diretamente envolvidos nos danos oxidativo às biomoléculas celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; MIMCHE *et al.*, 2011). A curcumina tem sido foco de interesse no combate ao estresse oxidativo, uma vez que seu potencial antioxidante pode superar os efeitos encontrados para o α -tocoferol, composto com reconhecida atividade antioxidante (PULLA; LOKESH, 1994).

1.5 Atividade antiparasitária da curcumina

A atividade antiparasitária da curcumina têm sido comprovada em estudos *in vitro* (CUI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008) e *in vivo* (ALLAM, 2009; VATHSALA *et al.*, 2012; ZORAIMA NETO *et al.*, 2013). Quando administrados à camundongos, a curcumina foi capaz de induzir aumento significativo atividade de macrófagos, células T e B (RANJAN *et al.*, 2004; ALLAM, 2009), neutrófilos (JAGETIA; AGGARWAL, 2007), células dendríticas e natural killer (YADAV *et al.*, 2005). O efeito antiparasitário da curcumina também foi relacionado ao sistema de β -dicarbonílico, o qual possui ligações duplas conjugadas (dienos) (ARAÚJO *et al.* 1999). Este sistema parece ser responsável não apenas pela ação antiparasitária, mas também pela atividade anti-inflamatória da curcumina (CLAESON *et al.* 1996).

Foi demonstrado *in vitro*, que a curcumina apresenta atividade antiparasitária contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ($LD_{50} = 24 \mu\text{M}$ ou 9 mg/ml). Em testes *in vivo* em ratos esse composto indicou uma inibição de 65,5% do tamanho de lesões da pata de camundongos inoculados com esses parasitos (ARAÚJO *et al.*, 1999). Além disso, foi previamente descrita atividade da curcumina contra *Leishmania donovani*, o agente etiológico da leishmaniose visceral. Aparentemente esse efeito é mediado pela indução de dano oxidativo às citomembranas do parasito, liberação de cálcio dos estoques intracelulares, influxo de cálcio do meio extracelular, despolarização da membrana mitocondrial mediada por excesso de cálcio, liberação do citocromo c e indução de vias de morte celular por meio da ativação de enzimas intracelulares e fragmentação do DNA (DAS *et al.*, 2008).

Diversos estudos demonstraram a atividade esquistomicida da curcumina. Em estudo *in vitro*, Magalhães *et al.* (2009) encontrou marcante efeito citotóxico da curcumina em doses elevadas (50 e 100 μM) sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, e uma taxa de

eliminação de 100% dos parasitos em cultura. Nesse mesmo estudo, em doses menores (5 a 20 μ M) a curcumina também foi efetiva em separar os casais de vermes adultos em formas isoladas e reduzir a produção de ovos em 50%. Em um estudo *in vivo*, a administração intraperitoneal de curcumina na dose de 400 mg/kg foi efetiva em reduzir a produção de IL-12, TNF, carga parasitária, a produção de ovos, volume do granuloma e a fibrose hepática camundongos infectados pelo *S. mansoni*. O tratamento também foi eficiente em restaurar a atividade das enzimas hepáticas e a aumentar atividade da enzima antioxidante catalase no fígado desses mesmos animais (ALLAM, 2009).

Estudos prévios demonstraram que a associação terapêutica de curcumina e artemisina, ambos compostos de origem natural, foi eficiente no controle parasitário de *Plasmodium berghei*, aumentando a taxa de sobrevivência e prevenindo a reativação da infecção em camundongos infectados (NANDAKUMAR *et al.*, 2006). Em estudo semelhante, a associação entre curcumina o derivado da artemisina α,β -arteether também foi efetivo em prevenir a esplenomegalia e reduzir os níveis de IL-12 e INF- γ causada pela infecção, com os melhores efeitos sendo observados nos grupos de associação (VATHSALA *et al.*, 2012). Foi ainda demonstrado que o extrato etanólico de *C. longa* L. é capaz de inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* e *L. Major in vitro* (RASMUSSEN *et al.*, 2000). Em *Plasmodium falciparum* a curcumina parece interferir no metabolismo do parasito e exercer um efeito citotóxico direto mediado pela indução da produção de ERO. Esse efeito foi relacionado com interferência na acetilação de histonas pela inibição da enzima histona acetiltransferase (HAT) e regulação da replicação do parasito, sendo efetivo mesmo em cepas resistentes à cloroquina (CUI *et al.*, 2007). Em outro estudo, quando a curcumina e Piperina foram combinadas com a cloroquina o efeito sobre a redução da parasitemia foi potencializado em camundongos infectados por *Plasmodium chabaudi* quando comparado ao uso isolados desses compostos (ZORAIMA NETO *et al.*, 2013).

1.6 Justificativa e relevância do estudo

O tratamento de doenças humanas utilizando plantas medicinais e os seus derivados é uma prática antiga que atualmente tem ganhado popularidade em todo o mundo (FARNSWORTH, 1994; YADAV *et al.*, 2005; VATHSALA *et al.*, 2012). Até o momento existe considerável interesse em produtos naturais derivados de plantas, particularmente

aqueles utilizados na medicina tradicional (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000; MAYA *et al.*, 2006; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; ZORAIMA NETO *et al.*, 2013). Esses produtos tem potencial aplicabilidade para serem utilizados no desenvolvimento de novas drogas e aplicações, incluindo o tratamento de doenças parasitárias (MUELAS-SERRANO *et al.*, 2000; MAYA *et al.*, 2006; ALLAM, 2009; MIMCHE *et al.*, 2011; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012;). Esse tipo de investigação tem se mostrado como uma estratégia efetiva para selecionar plantas medicinais para o desenvolvimento de novas drogas desde que cerca de 80% da população utiliza produtos derivados de plantas no seu cuidado básico de saúde (FARNSWORTH, 1994; KAUR *et al.* 2005).

Até o presente momento, a maior parte dos estudos e das drogas testadas para o tratamento da doença de Chagas tem como objetivo inibir vias metabólicas específicas. Entretanto, na maioria dos casos, mesmo após o tratamento o *T. cruzi* ainda é capaz estabelecer o parasitismo uma vez que aciona múltiplos mecanismos envolvidos na invasão celular, sobrevivência e replicação (URBINA *et al.*, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2011). Possivelmente, essa característica relaciona-se com a baixa eficácia de drogas que bloqueiam uma única via metabólica. Assim, o desenvolvimento de esquemas terapêuticos com a associação de drogas para bloquear simultaneamente múltiplas vias metabólicas associadas ao parasitismo e dano tecidual têm representado uma estratégia promissora no combate a diversas doenças parasitárias (NANDAKUMAR *et al.*, 2006, VATHSALA *et al.*, 2012; ZORAIMA NETO *et al.*, 2013) incluindo a doença de Chagas (DINIZ *et al.*, 2013).

Considerando eficácia limitada e elevada toxicidade da quimioterapia de referência (benznidazol), torna-se relevante definir esquemas terapêuticos eficientes e melhor toleráveis para o tratamento da doença de Chagas. Nesse contexto, a associação terapêutica do benznidazol com a curcumina se apresenta como uma estratégia complementar e viável com múltiplos propósitos como: 1) inibir simultaneamente mais de uma via metabólica associada ao parasitismo celular, 2) reduzir a toxicidade do benznidazol pela atenuação da inflamação e estresse oxidativo tecidual, 3) modular a resposta imunológica do hospedeiro e reduzir os danos teciduais associados ao processo inflamatório e estresse oxidativo induzido por *T. cruzi*. Admitindo-se um efeito positivo, mesmo que limitado, da associação entre benznidazol e curcumina na redução da parasitemia, parasitismo celular, estresse oxidativo, processo inflamatório e lesão tecidual, essa estratégia ainda pode ser relevante caso possibilite reduzir a dose terapêutica do benznidazol ao mesmo tempo em que mantém o grau de proteção do hospedeiro, diminuindo a toxicidade e os efeitos colaterais causados por essa droga. Assim,

essa associação pode ser relevante uma vez que a curcumina, além da atividade antiparasitária direta, também apresenta elevado potencial imunomodulatório, antiinflamatório e antioxidante, o qual pode contribuir para atenuar os danos teciduais induzidos pelo parasito e pela toxicidade determinada pelo benzimidazol.

Na doença de Chagas, o estabelecimento de uma resposta inflamatória é fundamental no controle do intenso parasitismo característico da fase aguda, entretanto, essa resposta frequentemente conduz à instalação de uma cardiomiopatia inflamatória na fase crônica (BIOLO *et al.*, 2010; RASSI JR *et al.*, 2010). Visto que a cardiomiopatia chagásica evolui para um pior prognóstico comparado à cardiomiopatias não inflamatórias, e que a principal diferença entre estas patologias é a presença do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de chagásicos (MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI-JR *et al.*, 2009; 2010), é possível inferir que intervenções capazes de modular o processo inflamatório podem atenuar a severidade da cardiomiopatia chagásica. Assim, identificar o perfil de mediadores inflamatórios e oxidativos expressos durante a infecção por *T. cruzi* pode contribuir para elucidar se a curcumina pode oferecer resistência à infecção e quais os mecanismos podem estar associados à atenuação da severidade da cardiomiopatia chagásica.

A curcumina parece constituir um composto natural promissor para ser utilizado em combinação com o quimioterápico de referência para o tratamento da doença de Chagas, especialmente devido a sua abundância, baixo custo, natureza não tóxica e amplo espectro de efeitos terapêuticos, os quais tem sido observados em uma ampla variedade de doenças parasitárias humanas. Até o momento, foram encontrados apenas dois estudos que investigaram o efeito da curcumina sobre o *T. cruzi* (NOSE *et al.*, 1998; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012), sendo que apenas um deles avaliou o efeito desse composto *in vivo* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Apesar de terem sido descritos resultados positivos no controle do parasito em ambos os estudos, a atividade tripanocida da curcumina ainda é pouco explorada, e o potencial terapêutico desse composto no manejo terapêutico da doença de Chagas permanece desconhecido.

1.7 Objetivos

Os objetivos foram organizados segundo a sequência abaixo:

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento isolado e combinado com benznidazol e curcumina sobre o parasitismo sanguíneo e cardíaco, resposta inflamatória, dano oxidativo e remodelamento morfológico do miocárdio em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

1.7.2 Objetivos específicos

- a) Investigar o efeito da associação da quimioterapia convencional (benznidazol) com a curcumina sobre a parasitemia, carga parasitária e mortalidade de camundongos infectados por *T. cruzi*;
- b) Avaliar o efeito da associação da quimioterapia convencional (benznidazol) com a curcumina sobre os níveis de citocinas e reatividade de imunoglobulinas no plasma de camundongos infectados por *T. cruzi*;
- c) Avaliar o efeito da associação da quimioterapia convencional (benznidazol) com a curcumina sobre o dano oxidativo do miocárdio de camundongos infectados por *T. cruzi*;
- d) Avaliar o efeito da associação da quimioterapia convencional (benznidazol) com a curcumina sobre o remodelamento morfológico do miocárdio de camundongos infectados por *T. cruzi*.

2 MATERIAS E MÉTODOS

Toda a metodologia assim como os materiais utilizados para a realização do experimento estão relacionadas abaixo:

2.1 Animais e infecção

Sete grupos com 12 camundongos suíços fêmeas com oito semanas de vida foram utilizados. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas e mantidos durante todo o experimento no Biotério do Departamento de Patologia e Parasitologia da mesma instituição. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (60-70%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) controladas e foram alocados em caixas coletivas de polipropileno. Água e ração foram fornecidos a vontade. A infecção com *T. cruzi* foi induzida por meio de um inóculo padronizado por via intraperitoneal contendo 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do parasito. Os parasitos foram obtidos a partir do sangue coletado em animais previamente infectados (CALDAS *et al.*, 2008a).

2.2 Estratégia de tratamento e grupos experimentais

Para avaliar o efeito da associação entre a droga de referência (benzonidazol) e a curcumina os animais foram tratados durante 20 dias consecutivos (CALDAS *et al.*, 2008a). O benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida[®], Roche) e a curcumina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foram suspensos em solução aquosa de carboximetilcelulose à 2% (veículo) e administrados em uma dose diária por via oral por meio de gavagem. Os experimentos foram realizados considerando a dose terapêutica do benzonidazol para camundongos, que é 100mg/kg de peso corporal (CALDAS *et al.*, 2008a). A partir dessa

dosagem foram testadas diferentes associações terapêuticas com as seguintes dosagens do benzonidazol: (i) dose terapêutica, (ii) a metade da dose terapêutica. A curcumina foi administrada em dose fixa de 100 mg/kg, a qual demonstrou efeito tripanocida para a cepa Brasil de *T. cruzi* (NAGAJYOTH *et al.*, 2012). Os tratamentos foram administrados imediatamente após a confirmação, por meio da identificação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sangue, e estabelecimento da infecção, 4 dias após a inoculação (CALDAS *et al.*, 2008a). A distribuição dos grupos e os esquemas terapêuticos foram definidos da seguinte forma:

Grupo 1: (controle negativo): não infectados;

Grupo 2: (controle positivo): infectados;

Grupo 3: infectados + benzonidazol (100 mg/kg);

Grupo 4: infectados + benzonidazol (50 mg/kg);

Grupo 5: infectados + curcumina (100 mg/kg);

Grupo 6: infectados + benzonidazol (100 mg/kg) + curcumina (100 mg/kg);

Grupo 7: infectados + benzonidazol (50 mg/kg) + curcumina (100 mg/kg).

2.3 Análise de parasitemia e mortalidade

A parasitemia foi avaliada diariamente. O número de parasitos foi determinado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962) por meio da quantificação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em 5 µl de sangue periférico coletado por punção venosa na cauda dos animais. Foi avaliada e traçada a curva de parasitemia de todos os animais infectados. A taxa de mortalidade foi calculada por meio de registro diário de todos os animais que morreram durante o período experimental (CALDAS *et al.*, 2008a).

2.4 Análise de toxicidade hepática

A toxicidade hepática de cada tratamento e das associações terapêuticas foi avaliada por meio da quantificação dos níveis séricos das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT). As análises enzimáticas foram realizadas por meio de espectrofotometria utilizando kits enzimáticos comerciais e as instruções fornecidas pelo fabricante (Human in Vitro Diagnostics, Belo Horizonte, MG, Brasil).

2.5 Ensaio de reativação da infecção

Após 20 dias de tratamento, os animais que apresentaram negatificação da parasitemia foram submetidos a um protocolo para avaliar a reativação da infecção. Para isso, três ensaios independentes foram realizados. **Ensaio 1:** A parasitemia dos animais foi avaliada diariamente durante 20 dias após o tratamento para determinar a reativação natural da infecção. **Ensaio 2:** Os animais que não apresentaram reativação da parasitemia nesse período foram submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida (Genuxal, Baxter Oncology GmbH, Westfalen, Alemanha). Essa droga foi dissolvida em tampão fosfato estéril (pH 7,2) e administrado em 3 ciclos de 50mg de ciclofosfamida /kg de peso corporal durante quatro dias consecutivos com intervalo de de 3 dias entre cada ciclo (CALDAS *et al.*, 2008b). A parasitemia destes animais foi avaliada durante os ciclos de imunossupressão, bem como nos 5 dias seguintes ao fim do protocolo de imunossupressão. **Ensaio 3:** Os animais que permaneceram com a parasitemia negatificada após imunossupressão foram avaliados por meio de hemocultura. Para isso, 400µL de sangue foram coletados por meio de punção do plexo orbital e igualmente divididos em dois tubos contendo 3 mL do meio de cultura LIT. Os tubos foram incubados à 28 °C durante 90 dias e examinados mensalmente para detecção de parasitos. Em todos os ensaios a detecção de parasitos foi realizada de acordo com a técnica de Brener (1962).

2.6 Análise de carga parasitária e cura parasitológica por qPCR para DNA de *T. cruzi*

A carga parasitária média foi estimada por meio da quantificação dos níveis de DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco. Animais que apresentaram resultados positivos em qualquer ensaio de reativação da infecção ou aqueles em que o DNA do parasito foi detectado no tecido cardíaco foram considerados não curados (CALDAS *et al.*, 2008a). A extração de DNA genómico total de camundongos controle e infectados com *T. cruzi* foi realizada utilizando kit comercial (Assistente[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega) de acordo com a Caldas *et al.* (2012). O DNA foi quantificado por espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e as concentrações foram ajustadas para 25 ng / mL. A reacção de PCR foi realizada num volume de 10 uL contendo 50 ng de DNA genómico, 5 µL de SYBR Green[®] PCR Mastermix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e 0,35 µL de primers contendo 195 pares de bases (pb) específicos do DNA *T. cruzi* ou 0,50 µL de primers para o factor de necrose tumoral- α (TNF- α). Os primers para *T. cruzi* (TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', em que M = A ou C e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') amplificam um fragmento de 182 pb. Os primers para TNF- α (TNF-5241 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3') amplificam um produto de 170 pb (CUMMINGS; TARLETON, 2003). O programa de ciclos consistiu de uma desnaturação inicial à 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos à 94 °C durante 15s e 64,3 °C durante 1 min, com aquisição de fluorescência a 64,3 °C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de fusão com uma desnaturação inicial de 15 segundos a 95 °C, arrefecimento a 60 °C durante 1 min e, em seguida, um aumento de temperatura de 0,3 °C/s a partir de 60 à 95 °C. Cada placa de 96 poços de reacção continha uma curva padrão e dois controles negativos. Os controles negativos consistiram de uma mistura de reacção com os iniciadores específicos para *T. cruzi* ou camundongo sem o DNA e também com DNA de tecido obtido a partir de camundongos não infectados. Os valores médios para a quantificação de DNA de *T. cruzi* foram normalizados pelos dados obtidos com os iniciadores específicos TNF- α como se segue: valor normalizado = (média de DNA de *T. cruzi* / média de DNA de TNF- α) \times 1000, onde "1000" corresponde ao valor esperado para o TNF- α a partir de 30 mg de tecido cardíaco. As eficiências de amplificação foram determinadas automaticamente pelo Software StepOne TM v2.0 (eficiência [E] = $10^{[-1 / \text{inclinação}]}$) (Stordeur *et al.*, 2002).

2.7 Ensaio para imunoglobulinas

Amostras de sangue dos animais a partir do seio orbital venoso (0,5 mL) foram centrifugadas em tubos heparinizados a 3000×g durante 10 min para obtenção do plasma. Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* foram detectados pela técnica descrita por Voller *et al.* (1976). O ensaio foi realizado utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Microplacas de poliestireno (96 poços) foram sensibilizados durante 12 horas a 4 °C com 100 µL de antígenos da cepa Y de *T. cruzi* (4,0 ug / mL) preparado a partir extração alcalina de parasitos em crescimento exponencial em meio LIT (CALDAS *et al.*, 2008). Após lavagem e bloqueio com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 1% de soro fetal bovino, 100µL do soro diluído de cada animal (1:20) foi adicionado aos poços e a placa foi incubada durante 45 min à 37 °C. Após lavagem com PBS-Tween 20 (0,05%), 100 µL anticorpos de coelho anti-IgG de camundongo (anti-IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) conjugados com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada durante 45 min à 37 °C. A placa foi lavada e os poços incubados com o substrato contendo O-fenilenodiamino-OPD (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) como cromógeno. A densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro à 490 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, UK). A absorvância média para dez amostras de controle negativo (não infectado) mais dois desvios padrão foram utilizados como o ponto de corte para discriminar resultados positivos e negativos (CALDAS *et al.*, 2008).

2.8 Ensaio para citocinas

A concentração de citocinas no soro foi avaliada por ELISA sandwich utilizando kit comercial (PreproTech, Rocky Hill, NJ, EUA). As medições foram realizadas para todos os animais em plasma coletado 24 horas após a última administração dos tratamentos. Nove semanas depois da inoculação com *T. cruzi*, as citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-4 e a quimiocina MIP-1 α foram mensuradas de acordo com as instruções do fabricante (PreproTech, Rocky Hill, NJ, EUA). A reação foi revelada com anticorpo conjugado com estreptavidina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), seguido por incubação com o substrato contendo 3,3',5,5"-tetrametilbenzidina (Promega, Madison, WI, EUA) como cromógeno. As densidades ópticas (DO) das amostras foram detectadas em espectrofotômetro a 450 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, UK), e as concentrações de citoquinas

foram calculadas por extrapolação da DO obtida a partir de uma curva padrão para cada citocina recombinante.

2.9 Análise histopatológica e estereológica

Fragmentos do coração de cada animal foram fixados e solução de paraformaldeído tamponado (pH= 7,2) à 4% preparado em tampão fosfato 1M. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol e incluídos em resina histológica glicolmetacrilato (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Para cada bloco, foram obtidos 6 cortes histológicos de 3µm de espessura em micrótomo rotativo com o auxílio de facas de vidro. Para evitar a análise da mesma área histológica foi coletado um a cada 20 cortes, os quais foram corados com hematoxilina e eosina e montados sobre lâmina histológica e lamínula. Para cada corte histológico foram capturadas 6 imagens histológicas por meio de câmera digital acoplada ao um microscópio de luz (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha). Na análise histopatológica foi realizada de forma descritiva por meio da avaliação da organização e tamanho dos cardiomiócitos, distribuição do estroma cardíaco, celularidade tecidual e presença de infiltrado inflamatório, presença de formas amastigotas de *T. cruzi* no tecido cardíaco e evidências de cardiomiocitólise associada à necrose tecidual.

A intensidade da inflamação do miocárdio foi avaliado pelo método estereológico. Para tal, foi aplicada uma sistema de teste quadrático (At) sobre as imagens histológicas com área de 0,0423 mm². O número de núcleos celulares na área de teste (QA_{inf}) foi determinado por meio se software de análise de imagens Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). O número de núcleos celulares por unidade de área (células / mm²) foi determinado pela relação $QA_{inf} = \Sigma_{inf} / At$, onde Σ_{inf} representa somatório do número de perfis de núcleos de células intersticiais na área de teste, e At corresponde dimensão da área de teste (CALDAS *et al.*, 2008a,b).

2.10 Avaliação do dano oxidativo tecidual

O dano oxidativo aos lipídios celulares foi avaliado ao final do experimento por meio da quantificação dos níveis teciduais de malondialdeído (MDA). Os fragmentos do coração e do fígado foram homogeneizados em tampão de fosfato (pH 7,2) e centrifugados a 10000 g, à 4 °C durante 10 min. O sobrenadante resultante foi incubado com uma solução de ácido tiobarbitúrico (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico a 0,375% e 0,25 N de HCl) durante 15 minutos. A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi monitorada a 535 nm em espectrofotômetro (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) (BUEGE; AUST, 1978).

O dano oxidativo às proteínas celulares foi determinado por meio da quantificação do conteúdo proteínas carboniladas (PCN). Para tal, após centrifugação do homogenato do tecido cardíaco e hepático foi adicionado ao pelet 0,5 mL de dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM. A reação envolveu a derivatização do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), o que leva à formação do produto estável 2,4-dinitrofenil hidrazona (DNP), que indica o conteúdo tecidual de proteínas carboniladas. A presença de proteínas carboniladas foi monitorizada a 370 nm em espectrofotômetro (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) (LEVINE *et al*, 1990).

2.11 Análise estatística

Os dados foram relatados de utilizando-se valores de média e desvio padrão. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada pelo teste D'Agostino-Pearson. Os valores de média foram comparados entre os grupos por meio do teste One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Foi fixado em 95% ($p < 0,05$) o nível de confiança dos testes.

3 RESULTADOS

Os resultados de parasitemia e mortalidade são apresentados na Tabela 1. Os animais infectados sem tratamento apresentaram elevada parasitemia média e mortalidade comparadas aos demais grupos ($p < 0,05$). O tratamento com ambas as doses de benznidazol administradas isoladamente ou em combinação com a curcumina reduziu significativamente a parasitemia média comparado ao grupo infectado sem tratamento ($p < 0,05$). Os grupos tratados com a associação terapêutica apresentaram resultados de parasitemia significativamente menores comparados aos grupos tratados apenas com o benznidazol ($p < 0,05$). Dentre os animais tratados, houve mortalidade ($n=3$, 25,0%) no grupo que recebeu apenas a curcumina.

Tabela 1 - Níveis de parasitemia e taxa de sobrevivência em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*.

Grupos	Parasitas $\times 10^3$ (0,1 mL de sangue)	BPC (n/n, %)	Sobrevivência (n/n)	Mortalidade (%)
<i>Controle</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	12/12	0
<i>INF</i>	39.50 ± 26.62^a	0/12 (0%)	5/12	58.33
<i>B100</i>	2.75 ± 0.60^b	12/12 (100%)	12/12	0
<i>B50</i>	4.93 ± 1.56^c	12/12 (100%)	12/12	0
<i>C100</i>	22.41 ± 10.19^d	9/12 (75%)	9/12	25.00
<i>B100 + C100</i>	1.38 ± 0.36^e	12/12 (100%)	12/12	0
<i>B50 + C100</i>	1.45 ± 0.47^e	12/12 (100%)	12/12	0

Fonte: Do autor

Legenda: BPC, “blood parasitemia clearance” (supressão de parasitos no sangue) após 20 dias de tratamento (exame de sangue a fresco). Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg / kg) isoladamente ou combinado com curcumina (C, 100 mg / kg) durante 20 dias. Controle, não infectado; INF, infectados sem tratamento. ^{a,b,c,d,e} Diferentes letras na coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A evolução da parasitemia ao longo do período de tratamento encontra-se representada na Figura 1. Os animais infectados sem tratamento e aqueles tratados apenas com a curcumina apresentaram lento decaimento do parasitismo sanguíneo. Além disso, nesses grupos foi identificado elevado pico de parasitemia comparado aos demais grupos. Nos demais grupos tratados com benznidazol isolado ou combinado com a curcumina, o completo “clearance” da parasitemia foi identificado a partir do nono dia de tratamento.

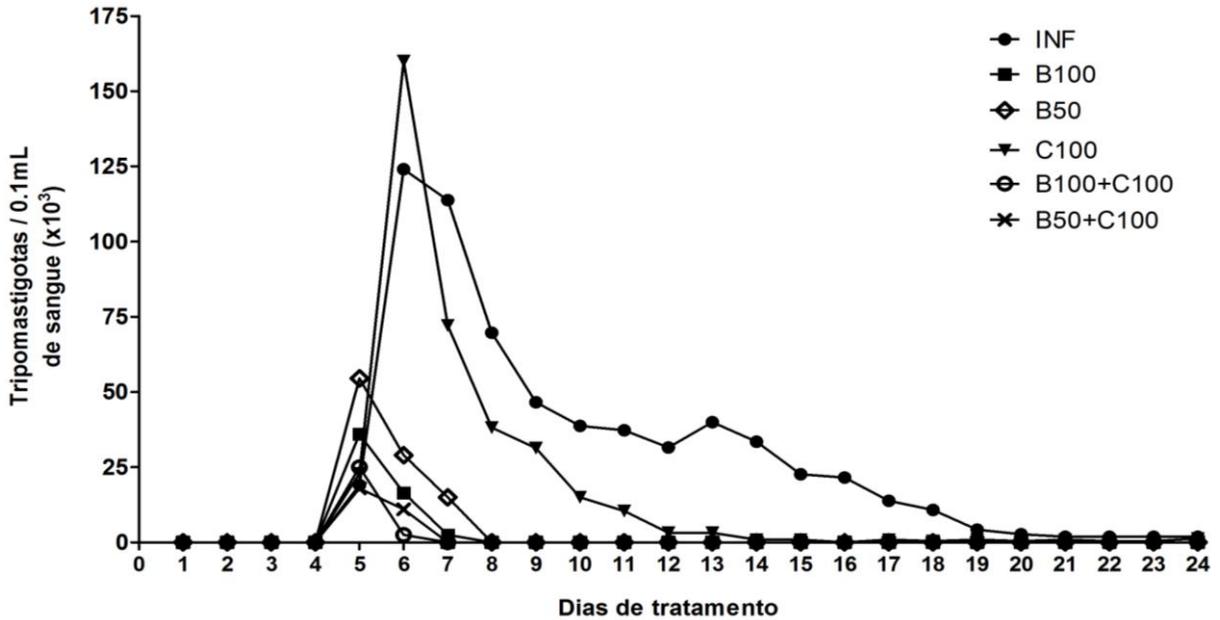


Figura 1- Curvas de parasitemia

Fonte: Do autor

Legenda: Curva de parasitemia em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 or 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento.

A análise do sangue a fresco demonstrou que os animais infectados e não tratados não apresentaram negatização da parasitemia ao final dos 20 dias de tratamento. Nesse mesmo momento, parasitemia positiva foi observada em 25,0% (n= 3) dos animais tratados apenas com a curcumina (Figura 2 e Tabela 1). Ao final do tratamento não foram identificados parasitos circulantes nos demais grupos. Por meio de 3 diferentes ensaios parasitológicos, reativação da infecção foi identificada em todos os animais (75,0%, n= 9) tratados apenas com a curcumina que apresentaram parasitemia negativa. Nos grupos tratados com benznidazol 50mg/kg e 100 mg/kg foi encontrada taxa de reativação igual a 66,67% (n= 8) e 25,0%, respectivamente. Não houve reativação da infecção em ambos os grupos tratados com benznidazol e curcumina combinados (Figura 2).

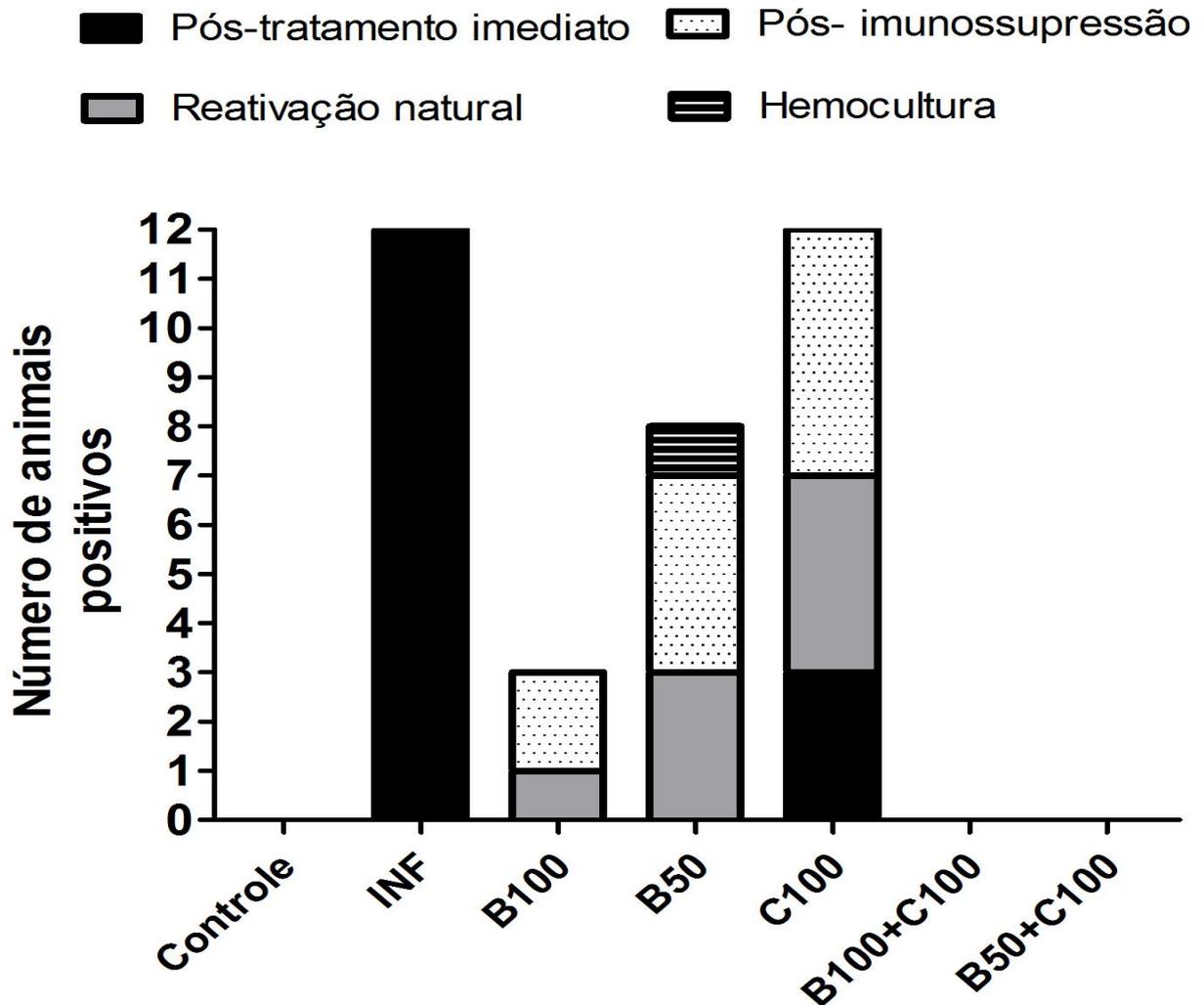


Figura 2 - Reativação da infecção após o tratamento

Fonte: Do autor

Legenda: Reativação da infecção após o tratamento de camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento.

A análise de PCR demonstrou elevada carga parasitária nos animais infectados sem tratamento, a qual foi semelhante ao grupo tratado apenas com a curcumina ($p > 0,05$). O tratamento com benznidazol reduziu drasticamente a carga parasitária ($p < 0,001$). A redução da carga parasitária foi ainda maior quando os animais foram tratados com benznidazol e curcumina combinados, comparado aos grupos que receberam apenas o benznidazol ($p < 0,01$), Figura 3a.

A análise de cura parasitológica, complementada pelo ensaio de PCR, revelou uma taxa de 58,33% ($n= 7$) e 8,33% ($n= 1$) de cura nos grupos tratados apenas com 100 ou 50 mg/kg de benznidazol, respectivamente. Quando a dose terapêutica de benznidazol (100 mg/kg) ou

metade dessa dose (50 mg/kg) foi combinada à curcumina, a taxa de cura foi aumentada para 83,33% (n= 10) ou 41,67% (n= 5), respectivamente (Figura 3b).

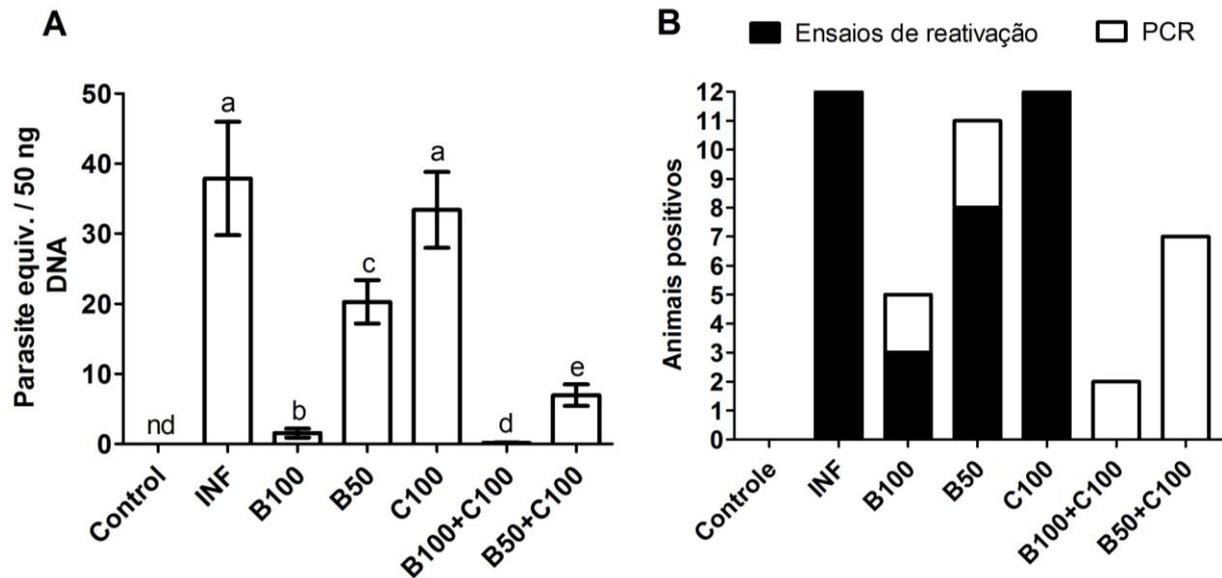


Figura 3 - Carga parasitária no tecido cardíaco e cura parasitológica por (qPCR)

Fonte: Do autor

Legenda: Carga parasitária no tecido cardíaco (A) e cura parasitológica (B) avaliada por reação de cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) em camundongos infectados por *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. Os ensaios de reativação da infecção foram baseados no exame a fresco do sangue periférico (antes ou após imunossupressão com ciclofosfamida) e hemocultura (detalhado na metodologia). ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

A reatividade plasmática de IgG anti-*T. cruzi* foi significativamente reduzida em todos os grupos tratados com benznidazol sozinho ou combinado com a curcumina comparados ao grupo infectado não tratado e aquele tratado apenas com a curcumina. Os melhores resultados foram encontrados nos grupos tratados com benznidazol combinado à curcumina, que apresentaram reatividade negativa (abaixo do valor discriminante) para a IgG1 e IgG2a, semelhantes ao grupo não infectado. Mesmo para resultados acima do valor discriminante, o tratamento combinado reduziu significativamente a reatividade plasmática de IgG total e IgG2b comparado ao grupo infectado não tratado e aquele tratado apenas com a curcumina. A curcumina isolada apresentou resultados semelhantes ao grupo infectado e não tratado (Figura 4).

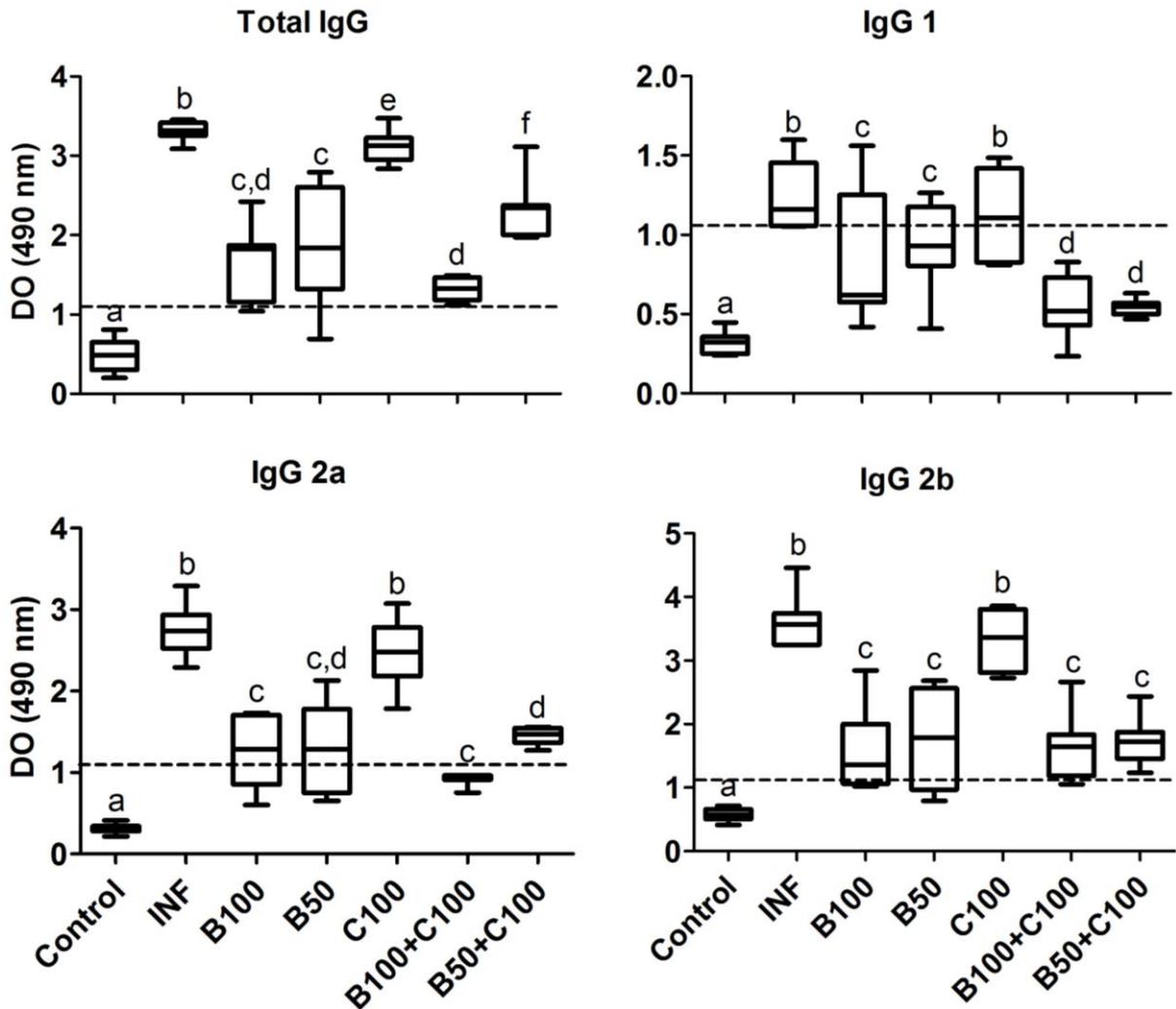


Figura 4 - Imunoreatividade de anticorpos séricos anti-*T. cruzi*

Fonte: Do autor

Legenda: Imunoreatividade de anticorpos séricos anti-*T. cruzi* avaliada por ELISA em camundongos controle não infectados e aqueles infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. As linhas pontilhadas representam o valor discriminante calculado a partir da divisão das absorvâncias individuais pelos valores de corte (média da DO \pm 2 desvios padrão) obtidos em amostras de animais não infectados (controle negativo). As caixas representam o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. ^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Ambos os esquemas terapêuticos foram capazes de modular os níveis plasmáticos de citocinas (Figura 5). Os animais infectados sem tratamento apresentaram aumento significativo de todas as citocinas investigadas (IFN- γ , MIP-1 α , IL-2, e IL-4) em relação aos animais controle não infectados ($p < 0,05$). Os níveis de IFN- γ nos animais infectados sem tratamento e tratados com curcumina foram similares ($p > 0,05$), porém mais elevados comparados aos demais grupos de tratamento ($p < 0,05$). O tratamento com benznidazol,

principalmente quando associado à curcumina, reduziu significativamente os níveis de IFN- γ comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), exceto em relação ao grupo controle não infectado. Independente da associação com a curcumina, animais tratados com a menor dose de benznidazol (50 mg/kg) apresentaram aumento significativo dos níveis de MIP-1 α e IL-4 ($p < 0,05$), parâmetros que foram significativamente reduzidos nos grupos que receberam a maior dose de benznidazol (100 mg/kg) ($p < 0,05$). Os níveis de IL-2 foram elevados nos grupos tratados com a curcumina em relação aos animais controle ($p < 0,05$). Achado semelhante foi observado para os grupos tratados com benznidazol combinado à curcumina comparados aos grupos que receberam apenas o benznidazol ($p < 0,05$).

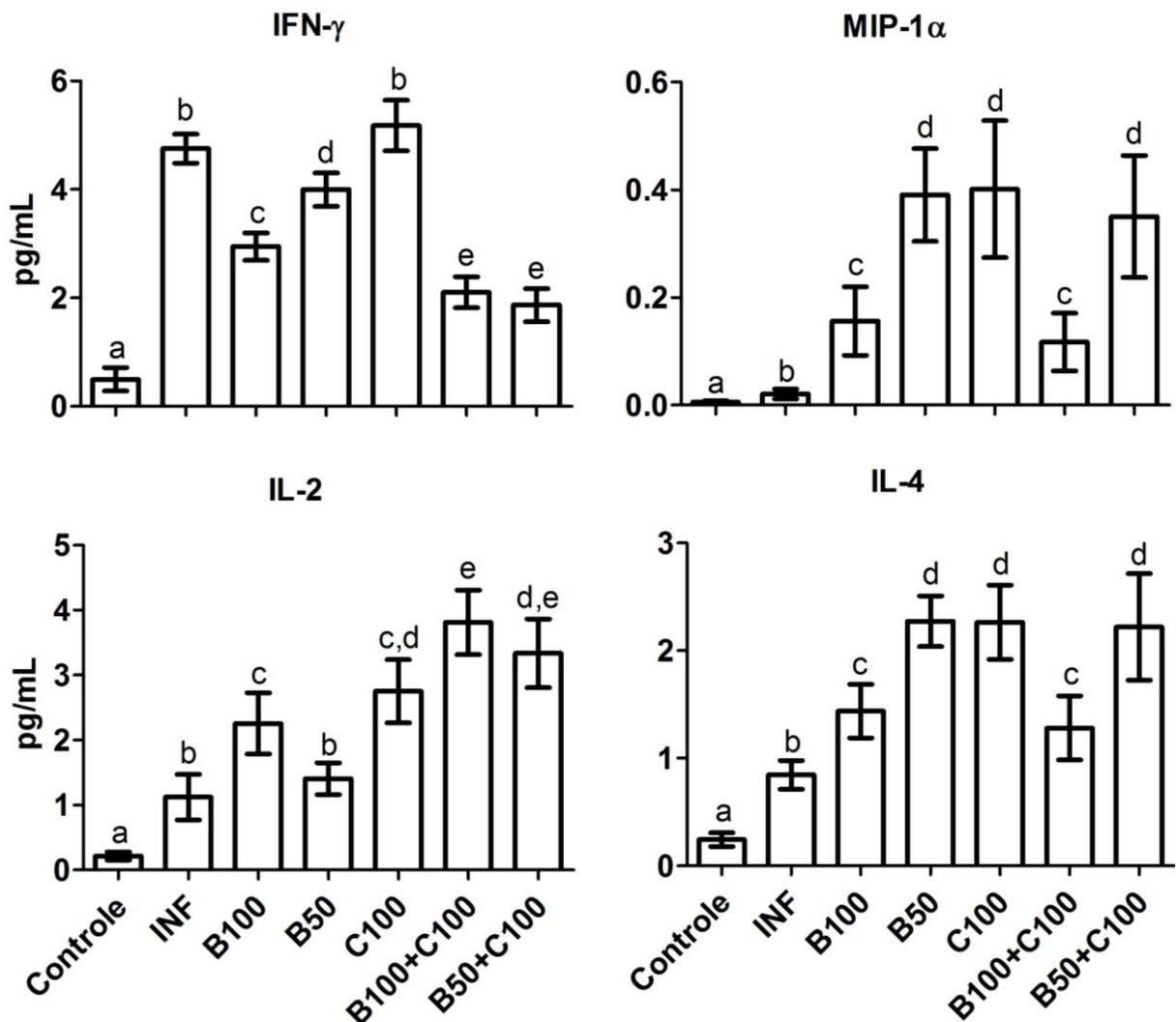


Figura 5 - Níveis séricos de citocinas avaliados por ELISA

Fonte: Do autor

Legenda: Níveis séricos de citocinas avaliados por ELISA em camundongos controle não infectados e aqueles infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado

sem tratamento. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (média \pm SD). ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Como mostrado na Figura 6, os animais infectados não tratados apresentaram intenso infiltrado inflamatório no miocárdio, expansão do tecido conjuntivo, hipertrofia e necrose de cardiomiócitos comparado ao grupo não infectado. Todos os animais tratados, especialmente com benznidazol sozinho ou combinado com a curcumina, apresentaram atenuação do processo inflamatório cardíaco. Nos grupos tratados, evidência de hipertrofia de cardiomiócitos foi observada apenas no grupo que recebeu a curcumina (C 100).

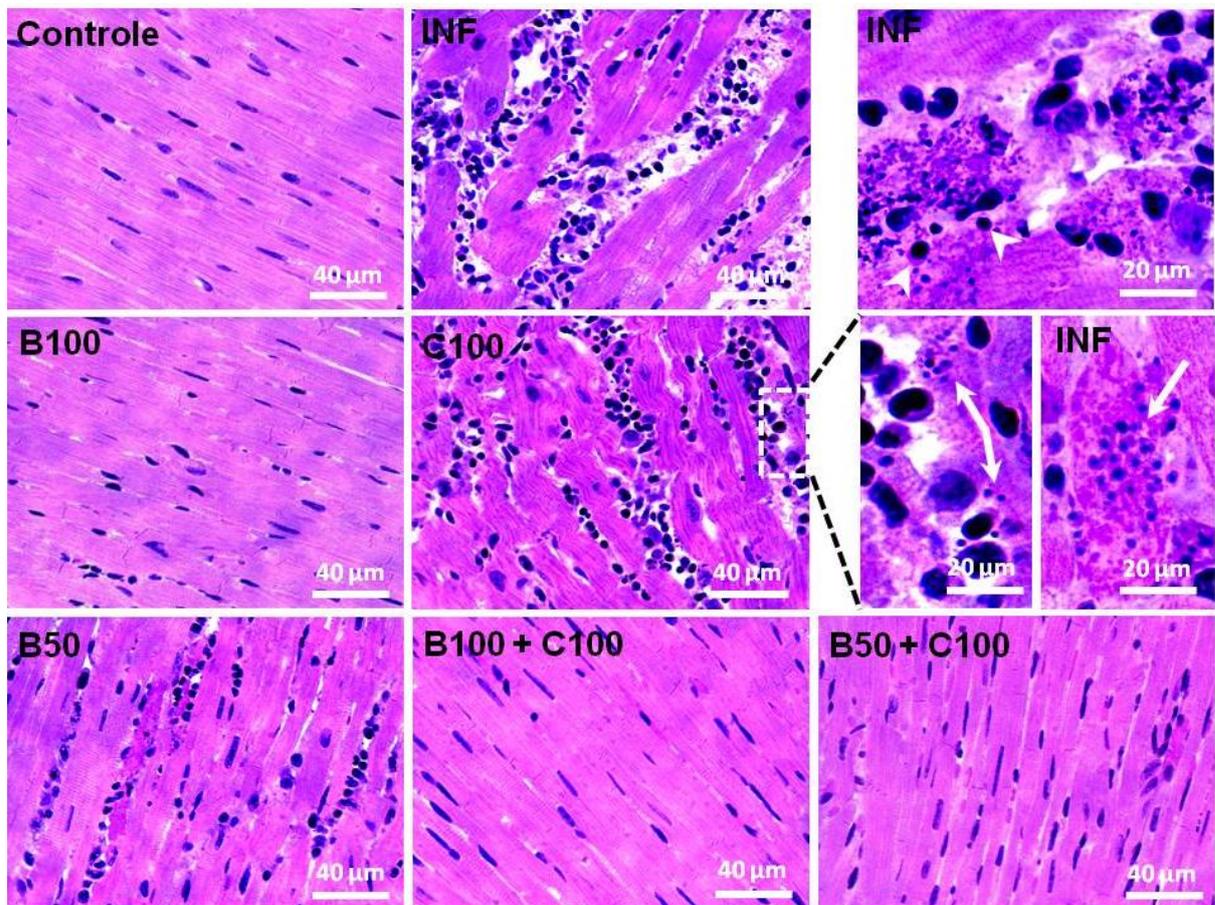


Figura 6 - Fotomicrografias representativas do miocárdio do ventrículo direito

Fonte: Do autor

Legenda: Fotomicrografias representativas do miocárdio do ventrículo direito de camundongos controle não infectados e aqueles infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (Microscopia de campo claro, coloração hematoxilina e eosina). Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. Setas: formas amastigotas de *T. cruzi*. Pannel superior à direita: cardiomiócitos em necrose circundados por células inflamatórias (cabeças de seta= linfócitos).

Corroborando os achados histopatológicos, a análise estereológica do miocárdio (Figura 7) indicou intenso infiltrado inflamatório nos animais infectados não tratados e naqueles

tratados apenas com a curcumina quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). A densidade de número de células inflamatórias no miocárdio dos animais tratados com a maior dose de benznidazol isolado ou combinado com a curcumina foi semelhante ao grupo controle não infectado ($p > 0,05$). Em animais tratados com a metade da dose terapêutica do benznidazol, maior redução do infiltrado inflamatório foi encontrado quando essa droga foi combinada à curcumina ($p < 0,05$).

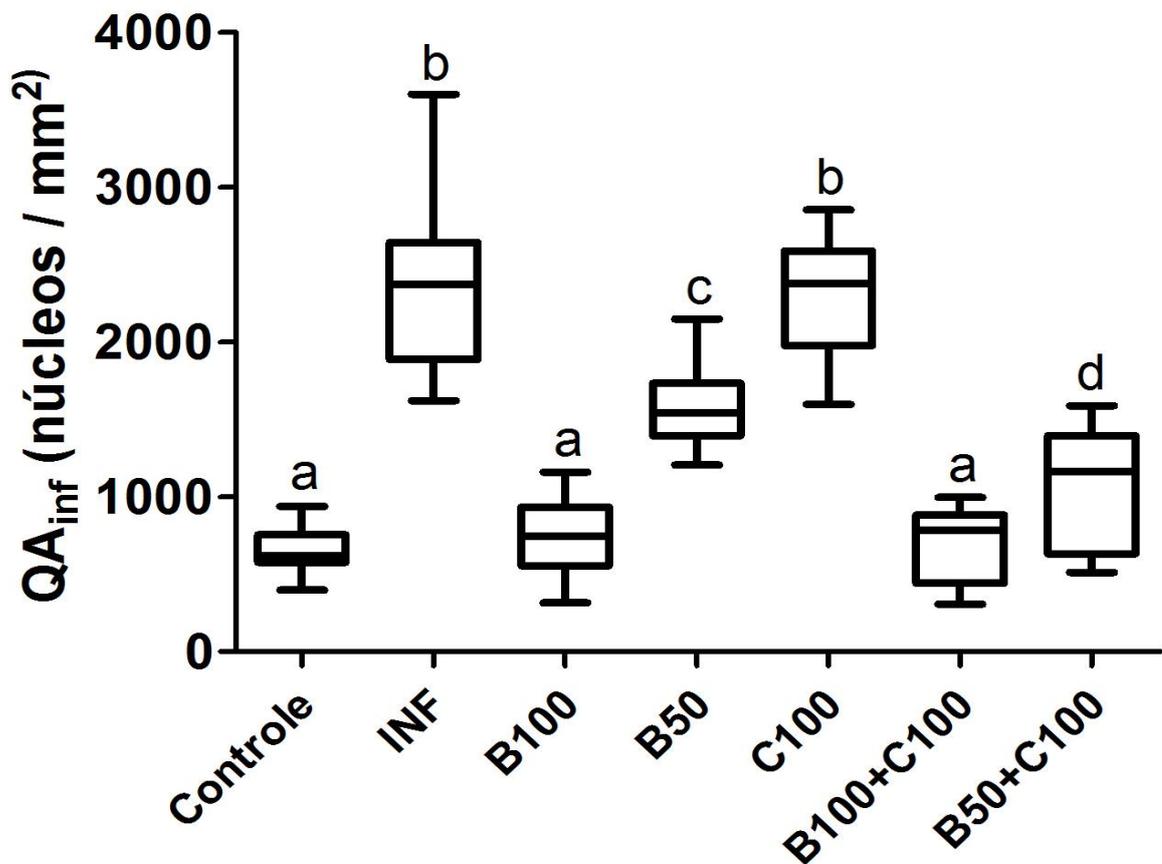


Figura 7 - Densidade de número de núcleos de células intersticiais (QA_{inf}) no miocárdio

Fonte: Do autor

Legenda: Densidade de número de núcleos de células intersticiais (QA_{inf}) no miocárdio de camundongos controle não infectados e aqueles infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. As caixas representam o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. ^{a,b,c,d} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Nos animais infectados sem tratamento foram identificados elevados níveis cardíacos e hepáticos de MDA e PCN comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Esses parâmetros foram significativamente reduzidos no coração e aumentados no fígado nos grupos tratados com

100 mg/kg de Benznidazol ($p < 0,05$). Os animais tratados apenas com a curcumina apresentaram redução dos níveis cardíacos e hepáticos de MDA e PCN comparado ao infectado sem tratamento. Em geral, os grupos tratados com a associação de Benznidazol e curcumina apresentaram níveis teciduais de MDA e PCN similares ao grupo controle (Figura 8).

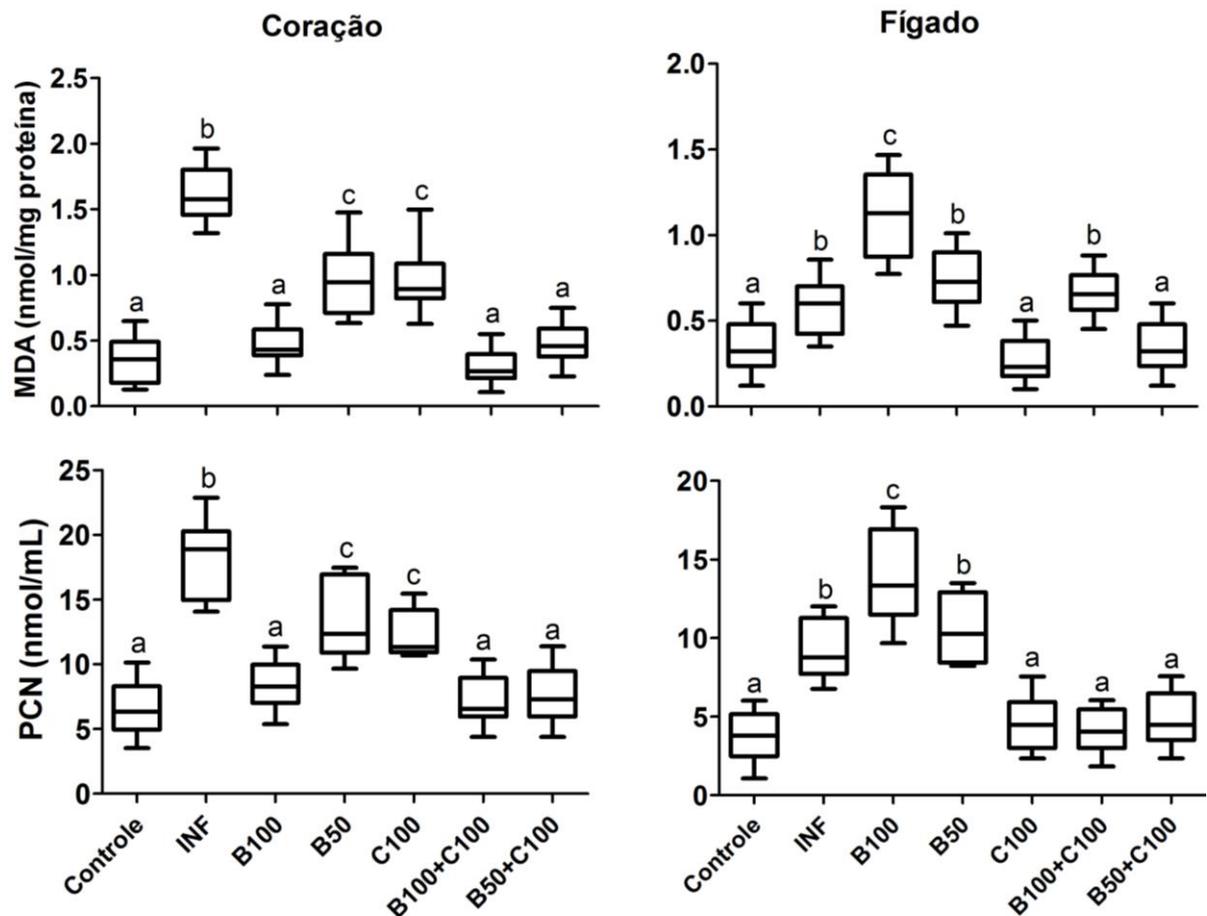


Figura 8 - Níveis cardíacos e hepáticos de MDA e PCN

Fonte: Do autor

Legenda: Níveis cardíacos e hepáticos de MDA e PCN em camundongos controle não infectados e naqueles infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. As caixas representam o intervalo interquartil com a mediana indicada (linha horizontal) e os bigodes representam os quartis superiores e inferiores. ^{a,b,c} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Os níveis séricos das enzimas de função hepática encontram-se representados na Figura 9. Em geral, houve aumento significativo dos níveis de AST e ALT em todos os grupos que receberam benznidazol ($p < 0,05$), com resultados mais elevados naqueles grupos tratados com a maior dose dessa droga. Os grupos que receberam a associação de benznidazol e curcumina

apresentaram níveis reduzidos de AST e ALT comparado aos grupo tratado apenas com 100mg/kg de Benznidazol. Os níveis enzimáticos foram semelhantes no grupo infectado sem tratamento, no grupo tratado apenas com curcumina e no grupo controle.

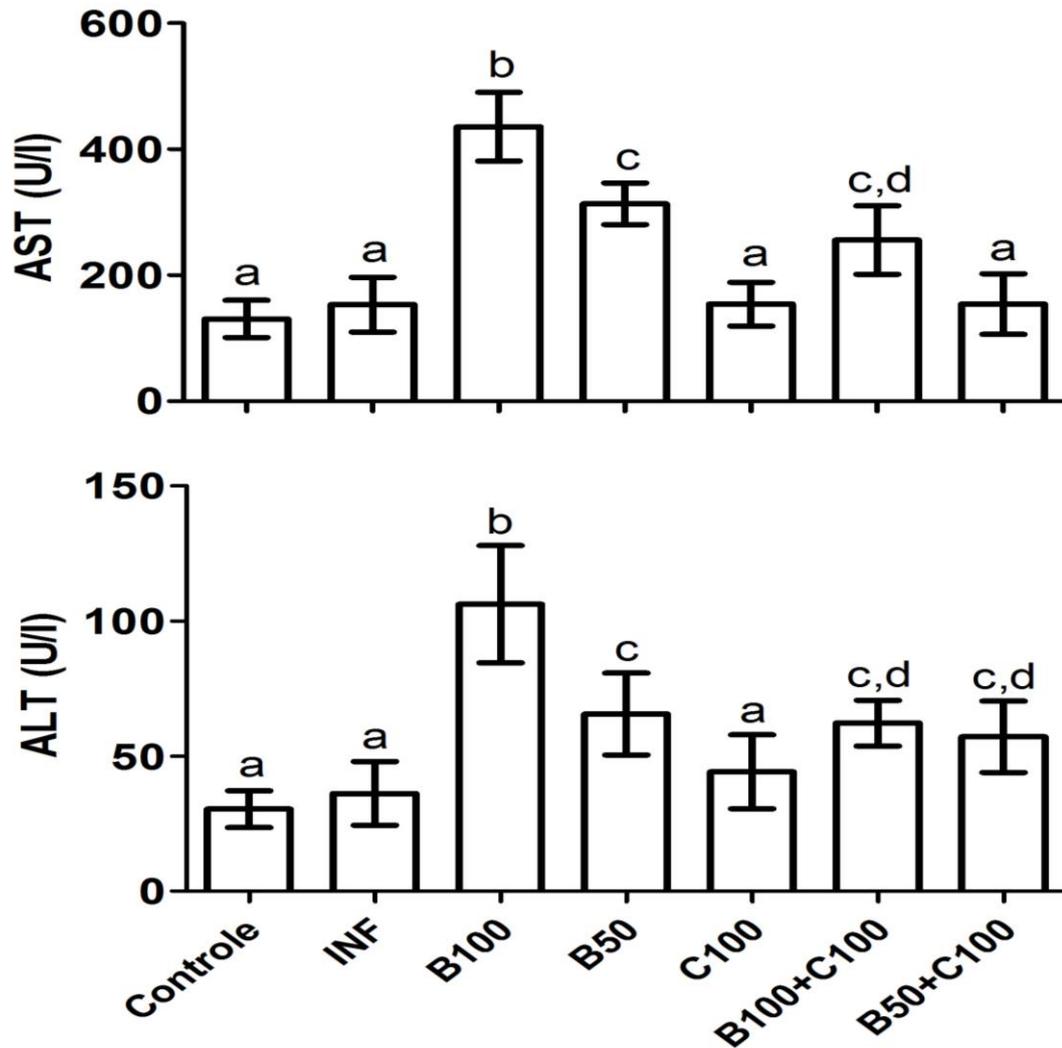


Figura 9 - Níveis séricos das enzimas de função hepática

Fonte: Do autor

Legenda: Níveis séricos das enzimas de função hepática em camundongos controle não infectados e naqueles infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. AST, Aspartato aminotransferase; ALT, Alanina aminotransferase. Os animais foram tratados com benznidazol (B, 100 ou 50 mg/kg) sozinho ou combinado com a curcumina (C, 100 mg/kg) durante 20 dias. INF, infectado sem tratamento. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão (média \pm SD). ^{a,b,c,d} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Embora o efeito terapêutico da curcumina tenha sido descrito para doenças parasitárias como malária e esquistossomose, a sua aplicabilidade no tratamento da doença de Chagas ainda é pouco conhecida. Por outro lado, a efetividade da terapia com benznidazol têm sido sistematicamente comprovada no tratamento da doença de Chagas experimental (DINIZ *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015) e humana (CANÇADO 2002; MARINETO *et al.*, 2009; PEREZ-MOLINA *et al.*, 2009). Embora o mecanismo antiparasitário do benznidazol ainda não tenha sido completamente elucidado, existem fortes indícios de que durante o metabolismo dessa droga no sistema NADPH-citocromo P-450, a produção de metabólitos reativos supera a limitada defesa antioxidante do *T. cruzi*, prejudicando o seu metabolismo e viabilidade (URBINA, 2010; HALL; WILKINSON, 2012). Além disso, foi demonstrado que o benznidazol aumenta a destruição do *T. cruzi* por estimular a atividade fagocítica de macrófagos, induzir a produção da citocina interferon gama (IFN- γ) e inibir a atividade da enzima NADH fumarato redutase, essencial na produção de ATP pelo parasito (DOCAMPO; MORENO, 1984).

Na presente investigação, a curcumina administrada sozinha foi eficaz em reduzir a parasitemia média e a mortalidade, mas não a carga parasitária nos animais infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, embora o tratamento isolado com o benznidazol tenha mostrado efeito terapêutico satisfatório, a maior atenuação da parasitemia, carga parasitária, mortalidade, e maior taxa de cura foi encontrada nos grupos que receberam a associação de curcumina e benznidazol. Entretanto, a presença do *T. cruzi* no sangue de alguns animais ainda foi detectada após imunossupressão ou por hemocultura, o mesmo ocorrendo com ácidos nucleicos do parasito detectados no tecido cardíaco por análise de PCR. Estudos prévios mostraram que apesar do tratamento precoce com benznidazol ser capaz de eliminar a parasitemia em animais infectados com *T. cruzi*, a cura parasitológica nem sempre é conseguida devido à presença de reservatórios do parasito que resistem à quimioterapia e que encontram-se distribuídos em múltiplos órgãos e tecidos (TEIXEIRA *et al.*, 2011; NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Dessa forma, existe evidência suficiente de que além da persistência do parasito nos tecidos, a eficácia do tratamento etiológico é diretamente influenciada pelos perfis de resistências à infecção das linhagens de camundongo investigadas (CALDAS *et al.*, 2008b; BRYAN *et al.*, 2010) e pela sensibilidade diferencial das numerosas cepas de *T. cruzi* ao benznidazol (CALDAS *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2013), aspectos que

representam grande um desafio para o desenvolvimento racional de drogas ou esquemas terapêuticos mais eficientes para o tratamento da doença de Chagas.

Surpreendentemente, nós observamos que mesmo quando a curcumina foi associada a metade da dose terapêutica indicada para o benznidazol (50 mg/kg), não houve reativação da infecção após interrupção do tratamento, como ocorreu nos grupos que receberam apenas o benznidazol. Esse achado indica uma potencial relevância da associação de benznidazol e curcumina no manejo terapêutico da doença de Chagas, uma vez que a reativação da infecção têm sido associada a um pior prognóstico na cardiomiopatia chagásica devido a recorrência e acúmulo de lesões em órgãos alvo, especialmente no coração (BOCCHI *et al.*, 1993; CAMPOS *et al.*, 2008; BACAL *et al.*, 2010). A reativação da infecção ocorre principalmente em pacientes chagásicos transplantados em uso de imunossupressores e indivíduos coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), condições em que o sistema de defesa do hospedeiro não consegue estabelecer mecanismos eficientes para conter o processo de replicação do parasito (CAMPOS *et al.*, 2008; BACAL *et al.*, 2010).

A atividade antiparasitária da curcumina tem sido comprovada em sistemas biológicos *in vitro* (CUI *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2008) e *in vivo* (ALLAM, 2009; VATHSALA *et al.*, 2012; ZORAIMA NETO *et al.*, 2013). Estudos prévios demonstraram que a associação terapêutica de curcumina e artemisina foi eficiente em reduzir a parasitemia em animais infectados pelo *Plasmodium berghei*, aumentando a taxa de sobrevivência e prevenindo a reativação da infecção (NANDAKUMAR *et al.*, 2006). Em estudo semelhante, a associação entre curcumina o derivado da artemisina α,β -arteether também foi efetivo no combate ao *Plasmodium berghei*, conferindo até 95% de prevenção da reativação da infecção (VATHSALA *et al.*, 2012). Embora o espectro de ação da curcumina não esteja completamente esclarecido, foi demonstrado que essa molécula pode modular múltiplas vias de sinalização incluindo da proteína kinase ativadora de mitógeno (MAPKs), COP9 signalossomo (CNS) e a via ubiquitina proteassomo (UPS). Além disso, foram descritos efeitos imunomoduladores da curcumina, os quais estão potencialmente associados à sua atividade antimicrobiana (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; ALLAM, 2009). Quando administrada à camundongos, a curcumina foi capaz de induzir aumento significativo da capacidade de fagocitose de macrófagos, efeito mediado pelo aumento da expressão de CD36 na membrana dessas células (RANJAN *et al.*, 2004; ALLAM, 2009). Além disso, a curcumina demonstrou ação modulatória sobre a ativação de células T e B, neutrófilos (JAGETIA; AGGARWAL, 2007), células dendríticas e natural killer (YADAV *et al.*, 2005). Em um estudo *in vivo*, a curcumina demonstrou efeito tripanocida em um modelo murino de

Tripanossomiase Americana, de modo que foi eficiente em reduzir a parasitemia, a carga parasitária tecidual e aumentar a taxa de sobrevivência de camundongos infectados por *T. cruzi* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). O mecanismo por meio do qual a curcumina exerce seu efeito anti-*T. cruzi* permanece pouco conhecido, entretanto, acredita-se estar associado ao seu efeito inibitório sobre a expressão de receptores para lipoproteínas de baixa densidade (LDLr), reconhecidamente envolvidos na invasão da célula hospedeira pelo parasita. Dessa forma, foi previamente demonstrado que a redução ou interrupção da expressão do LDLr diminui significativamente a carga parasitária em células infectadas por *T. cruzi* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). O mecanismo que limita a expressão dos LDLr pela curcumina foi elucidado em estudos prévios e está associado à inibição da translocação nuclear das proteínas regulatórias de fatores de transcrição lipídicos SREBP-1 e SREBP-2, regulando negativamente a transcrição dos LDLr (KANG; CHEN 2009; YUAN *et al.* 2008).

No presente estudo, foi adicionalmente investigado o efeito do tratamento com benznidazol e curcumina sobre os níveis plasmáticos de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. Como esperado (CALDAS *et al.*, 2008a,b; SANTOS *et al.*, 2015), o tratamento com benznidazol foi efetivo em atenuar a reatividade plasmática de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Esse efeito foi potencializado quando o benznidazol foi combinado com a curcumina, provocando marcante redução dos isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a. Esses achados indicaram que o tratamento combinado atenuou a magnitude da resposta humoral contra o *T. cruzi*. Embora a produção de IgG2a na resposta humoral contra o *T. cruzi* seja dominante, foi previamente relatada atividade lítica semelhante entre IgG2a e IgG1, caracterizados como moléculas efetoras importantes para o controle da parasitemia na doença de Chagas (PYRRHO *et al.*, 1998; BRYAN *et al.*, 2010). Entretanto, existem evidências de que elevados níveis de IgG1 nem sempre são benéficos ao hospedeiro, podendo bloquear a atividade dos diferentes isotipos de anticorpos anti-*T. cruzi* por meio de ligações cruzadas com antígenos irrelevantes na defesa contra o parasito, agindo como um mecanismo que desvia o sistema imunológico para uma resposta humoral inespecífica e ineficaz (POWELL; WASSOM, 1993; BRYAN *et al.*, 2010). A atenuação da resposta humoral observada no presente estudo aparentemente não está associada a maior susceptibilidade à infecção, sendo consistente com um melhor controle parasitológico e marcada redução da carga parasitária induzida pelo tratamento contra o *T. cruzi* (CALDAS *et al.*, 2008a; GUEDES *et al.*, 2004). A análise de IgG têm sido utilizada como marcador de cura, apresentando elevada correlação com a detecção de antígenos do parasito por meio de técnicas de PCR (HYLAND *et al.*, 2007; CALDAS *et al.*, 2008a). De fato, possível relação entre cura parasitológica e níveis de IgG foi

observada no presente estudo, uma vez que os menores níveis de IgG foram encontrados nos animais que não apresentaram reativação da infecção, seguido por aqueles grupos com baixa taxa de reativação.

Além da reatividade de IgG, o benznidazol e a curcumina também modificaram os níveis circulantes de citocinas. Embora a utilização isolada da curcumina não tenha interferido nos níveis de IFN- γ , quando utilizada em combinação com o benznidazol foi capaz de induzir marcante redução dessa citocina. Como o IFN- γ é requerido para o estabelecimento de uma resposta protetora do tipo Th1 (essencial na defesa contra o *T. cruzi*), a redução de IFN- γ nos animais tratados com benznidazol e curcumina não representa uma resposta Th1 ineficiente, indicando que a redução da carga parasitária é parcialmente dependente do efeito citotóxico direto dos tratamentos investigados. Dessa forma, é natural que a redução da parasitemia e carga parasitária seja acompanhada de redução dos níveis de IFN- γ a medida que o processo inflamatório associado à infecção caminha para uma resolução (MAYA *et al.*, 2010; URBINA, 2010). Um efeito oposto foi observado para IL-4, cujos níveis circulantes foram mais elevados em todos os grupos de tratamento. A IL-4 apresenta reconhecida importância na polarização da resposta imune para um perfil antagônico do tipo Th2 (MARINHO *et al.*, 1999; TALVANI *et al.*, 2000; GOLGHER; GAZZINELLI, 2004). Embora a resposta Th2 aumente a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*, a elevação dos níveis de citocinas desse padrão de resposta também atua no controle homeostático do sistema imune para regular a intensidade da resposta celular Th1, impedindo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada potencialmente lesiva ao hospedeiro (ABEL *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2001). Estudos prévios indicaram que a intensa resposta Th1 disparada por *T. cruzi*, apesar de controlar a parasitemia, é a principal causa de danos teciduais associados ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (GOLGHER; GAZZINELLI, 2004; GUEDES *et al.*, 2009; JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Existe evidência de que animais deficientes em IL-4 e infectados por *T. cruzi* cursam com intensa miocardite, fibrose cardíaca acentuada e maior taxa de mortalidade em relação aos animais que expressam essa citocina, eventos associados ao efeito de IL-4 em atenuar a produção de IFN- γ e a instalação de uma resposta Th1 exacerbada que agrava as lesões cardíacas imuno-mediadas (SOARES *et al.*, 2001; DUTRA; GOLLOB, 2008). Dessa forma, a IL-4 favorece a integridade do músculo cardíaco ao regular o balanço entre parasitismo e a intensidade dos mecanismos inatos e adquiridos de resistência do hospedeiro contra infecções parasitárias (MARINHO *et al.*, 1999, ABEL *et al.*, 2001; GOLGHER; GAZZINELLI, 2004).

Comportamento semelhante à IL-4 foi observado para a quimiocina e MIP-1 α , evento que favorece o controle da carga parasitária, uma vez que essa quimiocina está diretamente envolvida no recrutamento de macrófagos e neutrófilos que atuam na defesa dos órgãos parasitados (PETRAY *et al.*, 2002). De fato, estudo prévio demonstrou que a inibição de MIP-1 α aumenta a carga parasitária tecidual em camundongos infectados com *T. cruzi* (PETRAY *et al.*, 2002). Entretanto, a diminuição dos níveis de MIP-1 α observada nos animais tratados com a maior dose de benznidazol associado ou não à curcumina, é coerente com a menor carga parasitária induzida pelo tratamento, condição que reduz o recrutamento celular e a intensidade do processo inflamatório do miocárdio nos animais infectados (TALVANI *et al.*, 2000). Interessantemente, a associação de benznidazol e curcumina determinou elevados níveis circulantes de IL-2 comparado ao tratamento apenas com benznidazol. Estudos prévios demonstraram que a IL-2 atua como importante factor de crescimento para linfócitos T CD8⁺, ativando suas funções efetoras citotóxicas (MARTIN; TARLETON, 2004). Como uma típica citocina de padrão Th1, existe evidência de que a IL-2 reforça a imunidade celular e humoral contra o *T. cruzi*, contribuindo para reduzir a parasitemia e mortalidade de camundongos infectados (CHOROMANSKI; KUHN, 1985). Além disso, foi comprovada uma relação entre a produção deficiente de IL-2 e o estabelecimento de um estado imunossuprimido ao longo do curso da infecção por *T. cruzi* (CHOROMANSKI; KUHN, 1985; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007). Aparentemente, respostas antiparasitárias sub-ótimas associadas à baixos níveis de IL-2 também estão associada a menor responsividade das células T CD4⁺ auxiliares e atenuação da resposta humoral, uma vez que essa citocina ativa vias moleculares diretamente envolvidas na produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (CHOROMANSKI; KUHN, 1985; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007). Dessa forma, assim como a utilização de IL-2 exógena tem sido considerada como uma estratégia viável para reverter a hiporresponsividade imunológica contra o *T. cruzi* (CHOROMANSKI; KUHN, 1985; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007), ao estimular a produção de IL-2, associação de benznidazol e curcumina torna-se potencialmente benéfica para aprimorar as defesas do hospedeiro contra o parasito, favorecendo o controle da parasitemia e a resolução da infecção.

Devido ao tropismo do *T. cruzi* para tecidos musculares, a lesão cardíaca inflamatória representa a condição clínica mais grave na doença de Chagas (BOCCHI *et al.*, 1993, HIGUCHI *et al.*, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007). No presente estudo, o efeito cardioprotetor tipicamente descrito para o benznidazol contra a miocardite induzida pelo parasitismo cardíaco (MAYA *et al.*, 2006, 2010; NOVAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015)

foi claramente observado. Além disso, relevância da curcumina em atenuar o dano cardíaco, especialmente a necrose tecidual, expansão conjuntiva e o processo inflamatório, foi principalmente observada quando associada ao benznidazol. Mesmo quando a curcumina foi combinada à metade da dose terapêutica do benznidazol, essa estratégia restringiu o dano cardíaco mantendo a estrutura do miocárdio semelhante àquela observada nos animais não infectados. Aparentemente, é possível que a atenuação da inflamação e do remodelamento patológico do miocárdio pelo tratamento com benonidazol isolado ou combinado com a curcumina esteja associado com a modulação do sistema imunológico. Essa proposição é reforçada redução dos níveis de citocinas, tais como IFN- γ e IL-2 e um aumento concomitante na produção de IL-4, achados que indicam que a preservação da estrutura cardíaca pode ser dependente do controle da intensidade do processo inflamatório, o qual é resultante de um balanço adequado entre citocinas de padrão Th1 e Th2 (SOARES *et al.*, 2001; DUTRA; GOLLOB, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Além do efeito imunomodulador, a atividade anti-inflamatória da curcumina tem sido associada à presença de grupos hidroxila e fenol na molécula, essenciais para a inibição da via metabólica da ciclooxigenase e lipoxigenase, com a consequente atenuação da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, potentes mediadores pró-inflamatórios (IWAKAMI *et al.* 1986; KIUCHI *et al.*, 1992). Foi previamente descrito que ao diminuir a expressão de moléculas de adesão pelas células do endotélio vascular, a curcumina reduz a taxa migração de células do sistema imune e a intensidade da inflamação (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; MIMCHE *et al.*, 2011). Assim, considerando que o pior prognóstico da cardiomiopatia Chagásica em relação à cardiomiopatias de etiologia não infecciosa está diretamente ligado ao intenso processo inflamatório do miocárdio (HIGUCHI *et al.*, 2003; DUTRA; GOLLOB, 2008; BIOLO *et al.*, 2010), compostos com ação anti-inflamatória e antioxidante, incluindo a curcumina, podem apresenta potencial aplicabilidade para minimizar a deterioração cardíaca secundária ao ataque inespecífico das citotoxinas liberadas pelas células de defesa do infiltrado inflamatório, incluindo as metaloproteinases de matriz e ERO (MELO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2015).

Um efeito benéfico adicional no tecido cardíaco da utilização da curcumina combinada ao benzonidazol foi a redução do dano oxidativo tecidual, um achado potencialmente relacionado a atenuação do processo inflamatório cardíaco. Foi demonstrado que ao longo da evolução da infecção por *T. cruzi*, as células inflamatórias recrutadas para o tecido cardíaco ativam mecanismos moleculares contra os parasitos (*explosão respiratória*) que culminam em intensa formação de espécies reativas como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH \cdot), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUPTA *et al.*, 2009a,b). Entretanto, a inespecificidade desse

mecanismo está diretamente relacionada aos danos reativos que se acumulam no tecido cardíaco dos hospedeiros infectados (NOVAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015). Dessa forma, agentes antioxidantes têm apresentado resultados promissores em atenuar o estresse oxidativo cardíaco e a progressão da cardiomiopatia Chagásica (MAÇAO *et al.*, 2007; WEN; GARG, 2008). A ação antioxidante da curcumina tem sido associada a três mecanismos principais como a neutralização direta de radicais livres, a inibição da produção de ERO e ERN induzida por citocinas pró-inflamatórias, e a modulação do sistema enzimático antioxidante endógeno. Além disso, a curcumina limita o estresse oxidativo pois induz o aumento da síntese e atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutatona-s-transferase (PULLA; LOKESH, 1994; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Embora a ação varredora direta de radicais livres seja amplamente descrita, o efeito modulador da curcumina sobre o sistema antioxidante endógeno ainda é pouco compreendido, de modo que novos estudos nessa área são necessários.

Considerando a toxicidade do benznidazol e a segurança dos esquemas terapêuticos propostos, foram quantificados os níveis de enzimas de função hepática. Corroborando evidências recentes descritas por nosso grupo de pesquisa (NOVAES *et al.*, 2015), o tratamento com benznidazol aumentou os níveis séricos de ALT e AST, indicando dano hepático morfofuncional. De acordo com Ozer *et al.* (2008), essas enzimas são consideradas altamente sensíveis e específicas como marcadores de hepatotoxicidade em animais e humanos, refletindo a intensidade das lesões morfofuncionais em hepatócitos. Dessa forma, os achados do presente estudo demonstraram que a curcumina foi eficaz em atenuar a toxicidade do benznidazol, efeito potencialmente mediado pela atenuação do processo inflamatório sistêmico e dano oxidativo hepático causado pela infecção por *T. cruzi*. Essa hipótese é reforçada pela redução da oxidação lipídica e proteica no tecido hepático, aspecto consistente com a ação de drogas antioxidantes utilizadas no tratamento de intoxicações por diversos xenobióticos indutores do estresse oxidativo tecidual, incluindo o benznidazol (NOVAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015). Dessa forma, ao limitar os efeitos tóxicos do benznidazol, os resultados indicaram que a associação dessa droga com a curcumina pode ser uma estratégia terapêutica relevante e possivelmente melhor tolerada comparada à quimioterapia de referência que utiliza apenas o benznidazol.

Considerados em conjunto, os resultados do presente estudo permitiram concluir que a curcumina apresentou efeitos antiparasitários limitados, mas que quando combinada ao benznidazol, essa molécula potencializou a ação terapêutica da quimioterapia de referência. Aparentemente, esse efeito foi mediado por uma maior redução da parasitemia, carga

parasitária, aumento a sobrevivência e taxa de cura em camundongos infectados por *T. cruzi*, bem como bloqueio da reativação da infecção após o término do tratamento em camundongos não curados. Além disso, a associação terapêutica reduziu drasticamente o processo inflamatório e o dano oxidativo cardíaco ao mesmo tempo em que atenuou a toxicidade hepática induzida pelo benznidazol. Considerando que a toxicidade do benznidazol é comprovadamente dose-dependente, a associação terapêutica estabelecida no presente estudo apresenta potencial aplicabilidade no tratamento da doença de Chagas. Por meio dessa associação, foi possível atenuar a toxicidade hepática do benznidazol e impedir a reativação da infecção, mesmo quando os animais foram tratados com a metade da dose terapêutica recomendada para o benznidazol.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, p. 99-107, 2001.
- ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? **Scand J Immunol**. v. 66, p. 137-142, 2007.
- ALLAM, G. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. **Immunobiology**, v. 214, p. 712-727, 2009.
- AMMON, H. P. T.; WAHL, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Med**, v. 57, p. 1-7, 1991.
- AMMON, H. P. T. *et al.* Curcumin: a potent inhibitor of Leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). **Planta Med**, v. 58, p. 26, 1992.
- ANDRADE, A. A. Patologia da doença de Chagas. In: ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2^a ed., p. 201-230, 2000.
- ARAÚJO, C. A. C. *et al.* Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 791-794, 1999.
- BACAL, F. *et al.* Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. **Clin Transplant**, v. 24, p. E29-34, 2010.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? **Progr Cardiovasc Dis**, v. 52, p. 300-316, 2010.
- BOCCHI, E. A. *et al.* Long-term follow up after heart transplantation in Chagas' disease. **Transplantation Proceedings**, v. 25, p. 1329-1330, 1993.
- BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report. **J Heart Lung Transplant**, v. 20, p. 637-645, 2001.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. e733, 2010.

BUEGE, J. A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 50, p. 302-310, 1978.

CALDAS, S. *et al.* Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Trop**, v. 123, p. 170-177, 2012.

CALDAS, I. S. *et al.* Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitol Res**, v. 103, p. 413-421, 2008a.

CALDAS, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. **Exp Parasitol**, v. 118, p. 315-323, 2008b.

CALDAS, S. *et al.* Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology**, v. 01, p. 1-10, 2014.

CAMPOS, S. V. *et al.* A. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **J Heart Lung Transplant**, v. 27, p. 597-602, 2008.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CHAGAS, C. Tripanossomíase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1916.

CHIU, J. *et al.* Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor-kappaB. **Nutrition**, v. 25, p. 964-972, 2009.

CHOROMANSKI, L.; KUHN, R. E. Interleukin 2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 50, p. 354-357, 1985.

CLAESON, P. *et al.* Non-phenolic linear diarylheptanoids from *Curcuma xanthorrhiza*: a novel type of topical anti-inflammatory agents: structure-activity relationship. **Planta Med**, v. 62, p. 236-240, 1996.

COURA, J. R. *et al.* Morbidity of Chagas heart disease in the microregion of Rio Negro, Amazonian Brazil: a case-control study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 1009-1013, 2013.

CUI, L.; MIAO, J., CUI, L. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 51, p. 488-494, 2007.

CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Mol Biochem Parasitol**, v. 129, p. 53-59, 2003.

DAS, R. *et al.* Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Apoptosis**, v. 13, p. 867-882, 2008.

DINIZ, L de. F. *et al.* Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, p. e2367, 2013.

DNDI. Drugs for Neglected Diseases Initiative <<http://www.dndi.org.br/>> 2012.

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

DOCAMPO, R., MORENO, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev Infect Dis**, v. 6, p. 223-38, 1984.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion Infect Dis**, v. 21, p. 287-292, 2008.

FARNSWORTH, N.R. Ethnopharmacology and drug development. **Ciba Found Symp**, v. 185, p. 42-51, 1994.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

GHOSH, S. S. *et al.* Curcumin prevents cardiac remodeling secondary to chronic renal failure through deactivation of hypertrophic signaling in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, p. H975-H984, 2010.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, p. 399-409, 2004.

GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric-chemistry, technology and quality. **Crit Rev Food Sci Nut**, p. 199-301, 1980.

GUPTA, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free Radic Biol Med**. v. 47, p. 1414-1421, 2009a.

GUPTA, S.; WEN, J.-J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas Disease. **Inter Perspect Infect Dis**. ID 190354, p. 1-8, 2009b.

HALL, B.S.; WILKINSON, S.R. Activation of benznidazole by trypanosomal Type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 115-123. 2012.

HIGUCHI, M. L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, p. 96-107, 2003.

HOTEZ, P. J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. e300, 2008.

HOTEZ, P. J. *et al.* Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, p. e1498, 2012.

HYLAND, K. V. *et al.* Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infect Immun**, v. 75, p. 3641-3650, 2007.

IWAKAMI, S. *et al.* Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by phenolic compounds. **Chem Pharm Bull**, v. 34, p. 3960-3963, 1986.

JAGETIA, G. C.; AGGARWAL, B. B. “Spicing up” of the immune system by Curcumin. **J Clin Immunol**, v. 27, p. 19-35, 2007.

KANG, Q.; CHEN, A. Curcumin inhibits srebp-2 expression in activated hepatic stellate cells in vitro by reducing the activity of specificity protein-1. **Endocrinology**, v. 150, p. 5384-5394, 2009.

KAUR, S. *et al.* The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian Herbal drug. **J Ethnopharmacol**, v. 67, p. 249-251, 2005.

KIUCHI, F. *et al.* Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chem Pharm Bull**, v. 40, p. 387-391, 1992.

KUTTAN, G. *et al.* Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. **Adv Exp Med Biol**, v. 595, p. 173-184, 2007.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990.

MAÇAO, L. B. *et al.* Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **Int J Cardiol**. v. 123, p. 43-49, 2007.

MAGALHÃES, L. G. *et al.* In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1197-1201, 2009.

MARINHO, C. R. *et al.* Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 67, p. 308-318, 1999.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas' heart disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109-1123, 2007.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-324, 2009.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, p. 601-620, 2006.

MAYA, J.D. *et al.* Chagas disease: present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biol Res**, v. 43, p. 323-331, 2010.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev**, v. 201, p. 304-317, 2004.

MELO, L. *et al.* Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, p. 325-31, 2011.

MENDEZ, G. F.; COWIE, M. R. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. **Int J Cardiol**. v. 80, p. 213-9, 2001.

MIMCHE, P. N.; TARAMELLI, D.; VIVAS, L. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. **Malaria J**, v. 10, p. 1-9, 2011.

MUELAS-SERRANO, S. *et al.* In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 101-107, 2000.

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

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Res**, v. 110, p. 2491-2499, 2012.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, p. 634-243, 2012.

NANDAKUMAR, D. N.; NAGARAJ, V. A.; VATHSALA, P. G.; Rangarajan P.; Padmanaban, G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 50, p. 1859-1860, 2006.

NOSE, M. *et al.* Trypanocidal effects of curcumin *in vitro*. **Biol Pharm Bull**, v. 21, p. 643-645, 1998.

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. **Parasitol Res**, v. 114, p. 2873-2881, 2015.

OZER, J. *et al.* The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 194-205. 2008.

PÉREZ-FUENTES, R. *et al.* Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int J Parasitol**, v. 33, p. 293-299, 2003.

PEREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, p. 1139-1147, 2009.

PETRAY, P. *et al.* Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v. 83, p. 205-211, 2002.

POWELL, M. R.; WASSOM, D. L. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunol**, v. 15, p. 215-221.

PULLA, R. A.; LOKESH, B. R. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food Chem Toxicol**, v. 32, p. 279-283, 1994.

PYRRHO, A. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. **Parasitol Res**, v. 84, p. 333-337, 1998.

RANJAN, D. *et al.* Curcumin inhibits mitogen stimulated lymphocyte proliferation, NF-kB activation, and IL-2 signaling. **J Surg Res**, v. 121, p. 171-177, 2004.

RASMUSSEN, H. B. *et al.* A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. **Planta Med**, v. 66, p. 396-398, 2000.

RASSI-JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152-158, 2009.

RASSI-JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p.1388-1402, 2010.

SANTOS, E. C. *et al.* Chemotherapy with benznidazole and suramin: applicability of their concomitant treatment in mice infected with a virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 5999-6006, 2015.

SILVEIRA, C. A.; CASTILLO, E.; CASTRO, C. Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, p. 191-196, 2000.

SOARES, M. B. *et al.* Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **Am J Pathol**, v. 159, p. 703-709. 2001

SOSA-ESTANI, S. *et al.* Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, p. 484-487, 2009.

STORDEUR, P. *et al.* Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **J Immunol Methods**, v. 259, p. 55-64, 2002.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidant Redox Signal**, v. 10, p. 511-545, 2008.

TALVANI, A. *et al.* Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 2, p. 851-866, 2000.

TEIXEIRA, A. R. *et al.* Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, p. 592-630, 2011.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop**, v. 115, p. 55-68, 2010.

VATHSALA, P. G. *et al.* Curcumin-artether combination therapy of *Plasmodium berghei*-infected mice prevents recrudescence through immunomodulation. **Plos One**, v. 7, p. e29442, 2012.

WEN, J. J.; VYATKINA, G.; GARG, N. J. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Radic Biol Med**, v. 37, p. 1821-1833, 2004.

WEN, J. J. *et al.* Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. **Free Radic Biol Med**, v. 41, p. 270-276, 2006.

WEN, J. J.; GARG, N. J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species is enhanced at the Qo site of the complex III in the myocardium of *Trypanosoma cruzi*-infected mice: beneficial effects of an antioxidant. **J Bioenerg Biomembr**. v. 40, p. 587-598, 2008.

WHO, World Health Organization. **Control of Chagas disease**. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series N°. 905, Geneva, 96 pp, 2012.

WHO. World Health Organization. Disponível em:
<http://www.who.int/neglected_diseases/WHO_Bayer_agreement/en/> Acesso em:
21/07/2013.

YADAV, V. S. *et al.* Immunomodulatory effects of Curcumin. **Immunopharmacol. Immunotoxicology**, v. 27, p. 485-497, 2005.

YUAN, H. Y. *et al.* Curcumin inhibits cellular cholesterol accumulation by regulating SREBP-1/caveolin-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, p. 555-563, 2008.

ZORAIMA NETO *et al.* Treatment of *Plasmodium chabaudi* parasites with curcumin in combination with antimalarial drugs: drug interactions and implications on the ubiquitin/proteasome system. **J Parasitol Res**, ID 429736, p. 1-11, 2013.

