



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estabelecimento do modelo murino para a modulação de toxicidade do Benzonidazol durante a terapêutica da Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*)

Cláudia Jassica Gonçalves Moreno

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM SAÚDE TROPICAL
(ÁREA DE ESPECIALIZAÇÃO: PATOLOGIA TROPICAL)**

(JANEIRO DE 2015)



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estabelecimento do modelo murino para a modulação de toxicidade do Benzonidazol durante a terapêutica da Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*)

Cláudia Jassica Gonçalves Moreno

Orientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa da Silva

Coorientadora: Investigadora Doutora Aline Rimoldi Ribeiro

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical (Área de Especialização: Patologia Tropical)

JANEIRO DE 2015

Este estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto de investigação- BERENICE suportado pelo Programa FP7 da Comunidade Europeia.



“Nada é veneno, tudo é veneno. A diferença está na dose”. **Heophrastus Philippus
Aureolus Bombastus von Hohenheim-Paracelso, dritte defensio 1538.**

Dedico este trabalho a minha querida mãe, Teresa Borges, minha inspiração, pelo exemplo de determinação e força, exemplos de vida que serviram de alicerce para minha formação; Aos meus irmãos e melhores amigos Carlos e Alícia, pelo apoio e carinho sempre.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pela força e a coragem para superar todos os obstáculos ao longo desta caminhada.

Especial agradecimento ao meu orientador Professor Doutor Marcelo Silva pelo ensinamento e a orientação prestada durante esta investigação, sobretudo pela atenção, dedicação, incentivo e principalmente pela confiança depositada.

Muito obrigada à minha coorientadora Doutora Aline Rimoldi Ribeiro pelo exemplo da determinação e humildade, pela amizade, atenção e carinho, ensinamento e bons momentos vividos ao longo desta pesquisa.

Agradeço em especial, ao meu amigo e colega Jailson Querido pela amizade e incentivo, paciência e ensinamentos traduzidos em disponibilidade em auxiliar durante este trabalho.

Muito obrigada a minha querida amiga e colega Joana Monteiro, pela amizade e companheirismo no decorrer da investigação. Pelo apoio, principalmente quando os resultados não eram os mais favoráveis e por proporcionar um excelente ambiente de trabalho.

Agradeço a meus queridos amigos e colegas, Daniela Portugal, Sónia Pestana, Inês Faustino, Vanessa Martins, Salomé, João Pereira, João Nunes, Yasmina Tavares, Ana Vanessa, Catarina Henriques, Adriana Temperão, Mafalda Claro e a Sílvia Pereira pela amizade e pela ajuda prestada ao longo do trabalho.

A todos os funcionários que trabalham no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em especial, a minha querida Formosa Figueiredo por alegrar todos os meus dias de trabalho, através do carinho demonstrado. Aos funcionários do Biotério que auxiliaram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho, em especial à Doutora Dinora Lopes.

Ao coordenador do Mestrado em Saúde Tropical, o professor Doutor Jorge Seixas e aos professores do Mestrado em Saúde Tropical, em especial à Professora Dra. Rosa Teodósio, pela amizade, incentivo e experiência profissional que contribuíram para meu crescimento científico, registro aqui meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a todos os meus amigos que me apoiaram ao longo deste desafio, em especial, Felisberto Paiva, Umara Silves, Cláudia Correia, Eveline Rendall, David Varela, Jerson Monteiro, Iromisa Varela, Eunice Paiva, Álvaro Gonçalves, José Augusto, Gilmara Correia, Anilda Ribeiro, Admilson Andrade, Zuleica Rodrigues, Patrick Monteiro, Patrícia Gonçalves, Luciene Varela, Jorge Paiva, Lília Costa. Muito obrigada pela vossa incansável amizade e por estarem sempre ao meu lado.

Muito obrigada à minha família Borges/Moreno, meu porto seguro, à minha avó em especial, pelo amor e apoio sempre demonstrado. Aos meus tios pelos conselhos para que eu não desperdiçasse a vida e as oportunidades surgidas e que trilharam comigo caminhos variados durante a minha formação pessoal e académica. Que cada um saiba que de alguma maneira foi responsável por esta conquista. Em especial, muitíssima obrigada aos meus irmãos pela amizade, pelo incansável incentivo e companheirismo, ao longo da minha formação.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha mãe, Teresa Borges Moreno, minha fonte de inspiração e motivo da minha persistência e luta, pelo apoio desde sempre.

Enfim, muito obrigada a todos que, diretamente ou não contribuíram para o meu sucesso neste trabalho e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vós.

Resumo

Após um século da sua descoberta, a doença de Chagas causada por protozoário *Trypanosoma cruzi* representa uma das principais doenças tropicais negligenciadas em vários países da América Latina. O Benzonidazol (BNZ) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença, contudo apresenta uma eficácia terapêutica variável na fase crônica da doença. Além disso, em muitas situações os pacientes apresentam efeitos adversos graves, que conduzem ao abandono do tratamento. A eficácia antiparasitária do fármaco pode estar diretamente relacionada com a heterogeneidade de *T. cruzi*, bem como as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, a baixa solubilidade aquosa e imponderável biodisponibilidade do BNZ. Deste modo, este estudo teve como objetivos principais a determinação da toxicidade aguda do BNZ e das nanoformulações do BNZ em modelo murino através do ensaio da determinação da dose máxima tolerada e quantificação dos biomarcadores da função hepática. Paralelamente, realizaram-se o estudo da suscetibilidade *in vitro* ao BNZ das estirpes de *T. cruzi* (Y, Bolívia e QMM5) e o estudo da infeciosidade das mesmas estirpes em modelo murino. Os resultados indicaram que os excipientes e as nanoformulações do BNZ apresentaram um bom perfil de tolerância deste modo podem ser uma alternativa para a terapêutica da doença de Chagas. As três estirpes apresentaram suscetibilidade *in vitro* ao BNZ e a análise dos soros dos murganhos *Mus musculus* (Balb/c) inoculados com as estirpes do parasita demonstram a presença anticorpos anti- *T. cruzi*. A resposta humoral foi poliisotípica, com predomínio da produção dos anticorpos IgG e IgM anti-*T. cruzi* bem como algumas subclasses de anticorpo, a IgG1 e IgG2a e IG3. A produção do NO e da citocina IL-4 aumentou durante a fase inicial da infecção com diminuição na fase mais avançada da infecção, setenta dias pós infecção sendo sugestivo da ação imunomodulatória na infecção por *T. cruzi*. Estes resultados reforçam a compreensão da fisiopatologia da doença de chagas e permitem auxiliar futuramente na compreensão da eficácia das nanoformulações do BNZ durante o tratamento da doença de chagas no modelo murino.

Palavras-chaves: Benzonidazol; *Trypanosoma cruzi*; Resposta imune; Doença de Chagas.

Abstract

After a century of its discovery, Chagas disease caused by protozoan *Trypanosoma cruzi* is one of the major neglected tropical diseases in several Latin American countries. The benznidazole (BNZ) is the drug of choice for the treatment of disease, but has a variable therapeutic efficacy in chronic phase of the disease. Furthermore, in many situations the patients have serious side effects that leading to abandonment of the treatment. The antiparasitic drug efficacy can be directly related to the heterogeneity of *T. cruzi* population in addition with the unfavorable pharmacokinetic properties of BNZ, the low aqueous solubility and bioavailability of imponderable. Thus, this study had as main objectives the determination of the acute toxicity of BNZ and nanoformulations of BNZ in mice through the test for determining the maximum dose tolerated and quantification of biomarkers of liver function. Meanwhile, there have been the study of *in vitro* susceptibility to BNZ strains of *T. cruzi* (Y, Bolivia and QMM5) and study the infectivity of the same strains in mice. The results indicate that excipients and nanoformulations of BNZ showed a good tolerability profile and can be an alternative for the treatment of Chagas disease. The three strains showed susceptibility to the BNZ *in vitro* and analysis of the sera of *Mus musculus* (Balb/c) inoculated with strains of the parasite demonstrate the presence of anti- *T. cruzi*. The humoral response was poliisotípica, predominantly the production of IgG and IgM anti-*T.cruzi* well as some antibody subclasses, IgG1 and IgG2a and IG3. NO production and cytokine IL-4 increased during the initial phase of infection with decrease in the later stage of infection seventy days after infection being suggestive of immunomodulatory action in infection by *T. cruzi*. These results reinforcing aspects of the pathophysiology of Chagas disease and will allow understanding of the effectiveness of these nanoformulations of BNZ for the treatment of Chagas disease in the murine model in the future.

Keywords: Benznidazole; *Trypanosoma cruzi*; Immune response; Chagas disease.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BNZ – Benzonidazol	OMS – Organização Mundial da Saúde
BSA – <i>Bovine Serum Albumin</i>	PBS – <i>Phosphate Buffered Saline</i>
BOD – <i>Biochemical Oxygen Demand</i>	MTT – 3-brometo (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
CD – Ciclodextrina	NanoDDSs - <i>Nano-drug delivery systems</i>
DTU – <i>Discrete Typing Units</i>	NFX – Nifurtimox
DMSO – <i>Dimethyl Sulfoxide</i>	NK – Natural killer
ELISA – <i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>	NO – Óxido nítrico
LIT – <i>Liver Infusion Tryptose</i>	ROS – <i>Reactive Oxygen Species</i>
LUV – vesículas unilamelares grandes	SDS – <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
IFN-γ – Interferão gama	SUV – vesículas unilamelares pequenas
Ig – Imunoglobulina	Tc – <i>Trypanosoma cruzi</i>
IgG – Imunoglobulina G	TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta
IgM – Imunoglobulina M	
IL-4 – Interleucina 4	
OCDE – <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>	

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de duas hibridações para a troca de material genético durante a evolução clonal de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2. Transmissão vetorial e ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 3. Mecanismo de ação proposto dos fármacos Nifurtimox e Benzonidazol..	11
Figura 4. Ilustração da estrutura do lipossoma como nanocarregadores de fármac .	16
Figura 5. Formação de complexo de fármaco-ciclodextrina, 1:1 e 1:2..	17
Figura 6. Ilustração do método utilizado no estudo da toxicidade aguda do BNZ, dos excipientes e das nanoformulações.	23
Figura 7. Atividade da alanina aminotransferase [ALT, A] e apartato aminotransferase [AST, B]. A atividade enzimática nos soros 24 horas após a administração de 100 mg/kg e 1000 mg/kg do BNZ-A	42
Figura 8. Atividade da alanina aminotransferase [ALT, A] e atividade da apartato aminotransferase [AST, B]. A atividade enzimática nos soros dos animais administrados com 100 mg/kg diariamente durante cinco dias.	42
Figura 9. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] 24 horas após a administração dos excipientes das nanoformulações do BNZ..	43
Figura 10. Atividade da apartato aminotransferase [AST] após a administração dos excipientes das nanoformulações do BNZ.	44
Figura 11. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] 24 horas após a administração com 1000 mg/kg das nanoformulações do BNZ, designadas S61, A11 e NLC-S 20%.....	45
Figura 12. Atividade da apartato aminotransferase [AST] nos soros dos animais, 24 horas após a administração com 1000 mg/kg das nanoformulações do BNZ, designadas S61, A11 e NLC-S.....	46
Figura 13. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] nos soros dos animais, vinte e quatro horas após a administração com 1000 mg/kg das nano formulações do BNZ, designadas 12%, 24% e 50%..	47

Figura 14. A Atividade da apartato aminotransferase [AST] vinte e quatro horas após a administração com 1000 mg/kg das nano formulações do BNZ, designadas BNZ/CD 12%, 24% e 50 %.....	48
Figura 15. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe Bolívia, pertencente ao TcI.....	51
Figura 16. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe Y, pertencente ao TcII.....	52
Figura 17. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe QMM5, pertencente ao TcIII..	52
Figura 18. Determinação de anticorpos anti- <i>T.cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto para a pesquisa de IgG em soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).	54
Figura 19. Determinação de anticorpos IgG anti- <i>T.cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c)..	55
Figura 20. Determinação de anticorpos IgM anti- <i>T. cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto em soros em soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).....	56
Figura 21. Determinação de anticorpos IgG1 anti- <i>T. cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto em soros de murganhos, <i>Mus musculus</i> (Balb/c).....	57
Figura 22. Determinação de anticorpos IgG2a anti- <i>T.cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).	58
Figura 23. Determinação de anticorpos IgG3 anti- <i>T.cruzi</i> pelo método de <i>ELISA</i> indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c).	58
Figura 24. Quantificação sérica da IL-4, através do método de <i>ELISA</i> dos soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c) após 30, 55 e 70 dias pós infecção dos <i>Mus musculus</i> (Balb/c) com as estirpes Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII)	59
Figura 25. Quantificação sérica do TGF- β 1, através de <i>ELISA</i> dos soros de <i>Mus musculus</i> (Balb/c) após 30, 55 e 70 dias pós infecção dos <i>Mus musculus</i> (Balb/c) com as estirpes Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII).	60
Figura 26. Quantificação sérica do NO pelo método de Griess. O gráfico corresponde à concentração em μ M/ml de NO sérico, após 30, 55 e 70 dias pós infecção dos <i>Mus musculus</i> (Balb/c) com as estirpes Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII).	60

Índice

1. Introdução	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.1 Heterogeneidade de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2 Ciclo de vida	5
1.3 Evolução Clínica da doença de Chagas	7
1.4 Diagnóstico da doença de Chagas	9
1.5 Quimioterapia na doença de Chagas	10
1.5.1 Mecanismo de Ação dos fármacos	11
1.5.2 Efeito adverso dos fármacos	12
1.5.3 Nanotecnologia aplicada à doença de Chagas	14
2. Objetivo	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1 Animais utilizados	21
3.2 Fármacos, excipientes e nano formulações	21
3.3 Determinação da Toxicidade Aguda do BNZ em modelo murino	23
3.3.1 Determinação da dose máxima tolerada do BNZ-A, dos excipientes e das nanoformulações	24
3.4 Avaliação dos biomarcadores de função hepática em modelo murino	25
3.4.1 Determinação dos biomarcadores hepáticos em 24 horas após o tratamento com BNZ-Abarax em modelo murino	25
3.4.2 Determinação dos biomarcadores hepáticos após 5 dias da administração do BNZ-A e BNZ- PA	26
3.5 Avaliação <i>in vitro</i> da suscetibilidade ou resistência ao BNZ das três diferentes estirpes de <i>T. cruzi</i>	28

3.5.1	Parasitas	28
3.6	Avaliação da infeciosidade de diferentes estirpes de <i>T. cruzi</i> em murganhos .	30
3.6.1	Inoculação dos Parasitas nos murganhos com as estirpes do <i>T. cruzi</i>	30
3.6.2	Determinação da resposta humoral das três diferentes estirpes Y, Bolívia e QMM5 no modelo murino.....	31
3.6.3	Quantificação sérica da Interleucina (IL-4) em murganhos	33
3.6.4	Quantificação sérica do Interferão (IFN) $-\gamma$ em murganhos	34
3.6.5	Quantificação sérica do Fator de transformação do crescimento (TGF- β) 35	
3.6.6	Quantificação sérica do Oxido Nítrico (NO) pelo método de Griess	36
4.	Resultados e discussão	37
4.1	Determinação da toxicidade aguda em modelo murino.....	37
4.1.1	Dose Máxima Tolerada do BNZ-A, excipientes e das nanoformulações do BNZ em murganhos	37
4.2	Biomarcadores da Função Hepática.....	41
4.2.1	Biomarcadores da função hepática 24 horas após administração dos excipientes e das nanoformulações do BNZ	43
4.3	Ensaio <i>in vitro</i> da suscetibilidade ou resistência ao BNZ das três estirpes de <i>T. cruzi</i>	51
4.4	Estudo da infetividade das estirpes <i>T. cruzi</i> no modelo murino	54
4.4.1	Análise da Citocinas séricas durante a infecção com estirpes de <i>T. cruzi</i> ..	59
5.	Conclusões e perspectivas futura	64
6.	Referências Bibliográficas	66
	Apêndice A – Imagens da Dose Máxima Tolerada	75
	Apêndice B – Soluções e Meio de Cultivo	77
	Apêndice C – Análises Estatísticas.....	79

1. Introdução

A descoberta da tripanossomíase americana por Carlos Chagas foi uma das descobertas mais bem-sucedidas e completas em toda a história da medicina tropical (Coura & Borges-Pereira, 2010). Chagas em 1909 descreveu, o primeiro caso humano da tripanossomíase americana durante a infecção aguda, em uma criança, por meio da identificação e caracterização do protozoário hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

A tripanossomíase americana denominada doença de Chagas representa uma das principais doenças parasitárias tropicais negligenciadas sendo responsável por significativa morbidade e mortalidade (Hotez et al., 2007). As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um conjunto de 17 doenças provocadas por diversos agentes infecciosos e que prosperam em áreas tropicais, afetando mais de 1,4 bilhões de pessoas em 149 de países. O traço comum mais profundo destas doenças é o domínio sobre as populações, cuja maioria vive em situações de baixa rendimento (WHO, 2010).

Apesar das inovações da ciência no manuseio destas doenças e dos avanços nos processos de desenvolvimento de novos fármacos, estas continuam sendo um obstáculo para o desenvolvimento socioeconómico nos países endêmicos (WHO, 2002; Coura e Borges-Pereira, 2012). Além disso, as doenças tropicais, não oferecem retorno financeiro suficiente para a indústria farmacêutica dedicar-se à pesquisa e ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos (WHO, 2010).

No entanto, nas últimas décadas, o reconhecimento da comunidade internacional desta situação inaceitável e avaliação da importância destas doenças para a saúde pública despertou o interesse dos, governos, da indústria farmacêutica e outras instituições, incluindo as organizações não-governamentais, no investimento da prevenção e controlo deste grupo diverso de doenças. O trabalho para superar a impacto das DTNs representa uma oportunidade de desenvolvimento, em grande parte inexplorado, para solucionar a pobreza de muitas populações e, assim, ter um impacto direto na realização dos Objectivos de Desenvolvimento do Milénio, bem como cumprimento da missão da Organização Mundial de Saúde: garantir a realização do mais alto padrão de saúde como um direito humano (WHO, 2010).

A doença de Chagas é uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Rassi et al., 2010). Sendo, transmitida maioritariamente através de um vetor invertebrado, da subfamília *Triatominae* (Chagas, 1909; Rassi et al., 2010). A presença do parasita na natureza é bastante antiga, cerca de milhares de anos (Prata et al., 2011). A infecção chagásica, inicialmente uma doença enzoótica selvagem, transformou-se numa antropozoonose quando, por meio da ação de ocupar espaço físico, a humanidade invadiu ecótipos silvestres com desígnio de reduzir as florestas, para a construção de moradias e a prática da agricultura (Coura & Borges-Pereira, 2010).




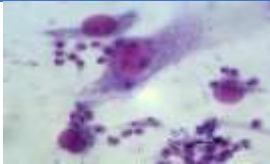
Atualmente, a distribuição geográfica da infecção chagásica, incluindo os seus reservatórios e os seus vectores, estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile. Assim, cerca de 90 milhões de pessoas, nessas regiões, estão expostos à infecção (Coura & Dias, 2009). A doença é endêmica da América Latina e representa um importante desafio em saúde pública, contribuindo para as desigualdades globais da saúde como causa de significativa morbidade e mortalidade (WHO, 2002; Guhl & Lazdinis-Helds, 2007; Machado et al., 2012). Assim, o número de vidas afetadas, a condição incapacitante, a mortalidade prematura são os aspetos mais importantes que causam a perda da população economicamente ativa, o que prejudica a prosperidade dos países endêmicos (Guhl & Lazdinis-Helds, 2007). Devido aos vários esforços realizados no sentido de controlar a transmissão de *T. cruzi*, a prevalência estimada no continente americano diminuiu de cerca de 20 milhões infetados em 1981 para 7-8 milhões atualmente (WHO, 2014).

Nas últimas décadas, o êxodo rural na América Latina bem como o aumento do fluxo migratório para outros continentes, conduziram à aparição da doença de Chagas como problema de saúde pública global (Schmunis, 2007; Pérez-Molina et al., 2012), podendo ser encontrada nos Estados Unidos da América, Canadá, na Europa e em alguns países do Pacífico ocidental. Na Europa (principalmente em Espanha), em particular, a doença de Chagas tem sido reconhecida como um problema de saúde pública emergente (Albajar-Viñas, 2011; Pérez-Molina et al., 2012) onde estima-se que aproximadamente 250.000 pessoas se encontram infetadas (Schmunis, 2007).

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Chagas, 1909). Esta ordem caracteriza-se pela presença do flagelo e uma mitocôndria única, contendo o cinetoplasto, que retêm o material genético, denominado DNA do cinetoplasto (*kDNA*). No decorrer do ciclo evolutivo do parasita são reconhecidas três formas morfogênicas e a transição entre uma forma para outra envolve modificações morfológicas, na expressão gênica e no ciclo celular (Heath *et al.*, 1990; Telleria *et al.*, 2006). As formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas são encontradas no hospedeiro mamífero e as epimastigotas no hospedeiro invertebrado onde se dividem e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas (Tanowitz *et al.*, 1992; Tyler & Egman, 2001; Rassi *et al.*, 2010). As principais diferenças encontram-se descritas na tabela 1, apresentada seguidamente.

Tabela 1. Diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.

Formas evolutiva	Epimastigotas	Tripomastigotas Metacíclicas	Tripomastigotas sanguíneas	Amastigotas
Encontrada:	Tubo digestivo do Inseto vetor e cultivo axênica	Inseto vetor	Sangue e espaço intracelular do hospedeiro vertebrado e em cultivos de células	Interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células
Morfologia da célula	Alongada	Alongada	Alongada	Esférica
Posição do cinetoplasto	Próximo do núcleo	Posterior ao núcleo	Posterior ao núcleo	Próximo ao núcleo
Observação microscópica				

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pela Doutora Aline Rimoldi Ribeiro. Elaboração própria

1.1.1 Heterogeneidade de *Trypanosoma cruzi*

O protozoário, *Trypanosoma cruzi* apresenta alto grau de variabilidade intraespecífica detetada por marcadores biológicos, bioquímicos, imunológicos, genéticos e clínicos. A diversidade genômica de *T. cruzi* e a multiplicidade de genótipos e fenótipos é muito bem descrita e reconhecida na literatura (Brisse et al., 2000; de Freitas et al., 2006; Telleria et al., 2006). Esta diversidade pode estar associada a sua adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros (Brisse et al., 2000). Partindo deste pressuposto, durante o Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas, realizado em 1999, recomendou-se a subdivisão do parasita em duas grandes linhagens filogenéticas, denominadas *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII) (Satellite Meeting, 1999). As características epidemiológicas dos dois grupos permitiram a associação do grupo TcI ao ciclo silvestre e TcII a predominar no ciclo doméstico, sendo frequentemente encontrado na população humana (Brisse et al., 2000). Recentemente, propôs-se uma revisão da nomenclatura onde cada grupo passou a ser classificado como um grupo independente designado DTU (*Discrete Typing Unit*). As estirpes de *T. cruzi* foram reclassificadas em seis DTUs, TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI, de acordo com perspectiva biológica e associação com o hospedeiro, uma vez que, apresentam aspectos evolucionários e eco epidemiológicos distintos (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012).

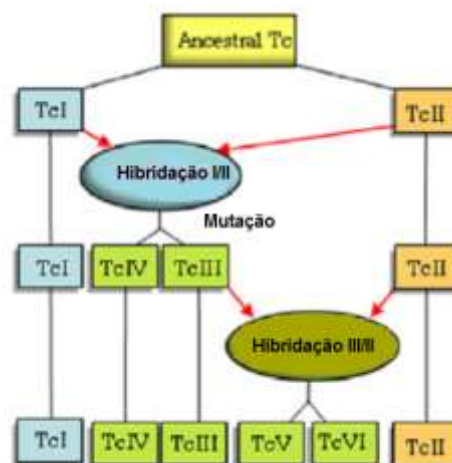


Figura 1. Modelo de duas hibridações para a troca de material genético durante a evolução clonal de *T. cruzi*. Adaptado de Zingales et al., 2012.

A variação genotípica entre as diferentes linhagens de *T. cruzi*, de diferentes regiões geográficas, pode explicar a frequente variabilidade na virulência, suscetibilidade à resposta imunitária do hospedeiro, taxas de infecções subclínica, sintomas clínicos na doença de Chagas e na suscetibilidade aos fármacos (Rey, 1992; Higo *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Coura & Borges-Pereira, 2012; Zingales *et al.*, 2012). Esta mudança na classificação proporciona maior compreensão sobre a estrutura populacional e aspetos emergentes no genoma do parasita, o que permite uma abordagem integrada e direcionada, sem descurar a descoberta de fármacos, para a melhoria na estratégia do controlo da doença de Chagas (Zingales *et al.*, 2012).

1.2 Ciclo de vida

A doença de Chagas é transmitida principalmente por insetos hematófagos, do género *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, vulgarmente denominado triatomíneos (Teixeira *et al.*, 2006). Encontram-se distribuídos essencialmente no continente Americano e estão descritos 148 espécies (Gonçalves *et al.*, 2013). Algumas espécies possuem maior importância epidemiológica, por exemplo, no Brasil apenas cinco dessas, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, pelo fato de colonizarem no peri ou intra-domicílio (Prata, 2001; Teixeira *et al.*, 2006). As restantes espécies não domiciliadas promovem a circulação de *T. cruzi* em mamíferos que vivem em ambientes silvestres (Coura & Dias, 2009).

O hospedeiro invertebrado, triatomíneo, infeta-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante a refeição sanguínea (Figura 2). No tubo digestivo, do inseto, estas formas transformam-se em epimastigotas que aderem a superfície do intestino médio e posterior, onde se multiplicam por fissão binária (Chagas, 1909; Prata, 2001; Stuart *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010). De seguida, os epimastigotas migram para o intestino posterior atingindo o reto diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicas, as formas infetantes para hospedeiros vertebrados, libertadas nas fezes do inseto (Rassi *et al.*, 2010).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas, presente nas fezes do vetor, nas mucosas íntegras ou nas lesões da picada na pele do hospedeiro (Schofield, 1994; Cook & Zumla, 2009; Cortez *et al.*, 2012). Após a penetração, tripomastigotas metacíclicas infetam células do hospedeiro, no citoplasma destas, diferenciam-se em amastigotas (Figura 2). A multiplicação dos amastigotas conduz a formação de quistos que acabam por sofrer ruptura celular com a disseminação das formas tripomastigotas sanguíneas (figura 2). Durante esta fase, uma ampla variedade de células do hospedeiro vertebrado são potenciais alvos da infecção pelo tripomastigotas (Tyler & Egman, 2001; Stuart *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010). Destas incluem-se as células musculares e nervosas do coração e trato gastrointestinal, bem como, as células do sistema reticuloendotelial. Os tripomastigotas que atingem a corrente sanguínea também podem sere ingeridas por triatomíneos, na ocasião da refeição sanguínea e recomeçar o ciclo (Machado *et al.*, 2012).

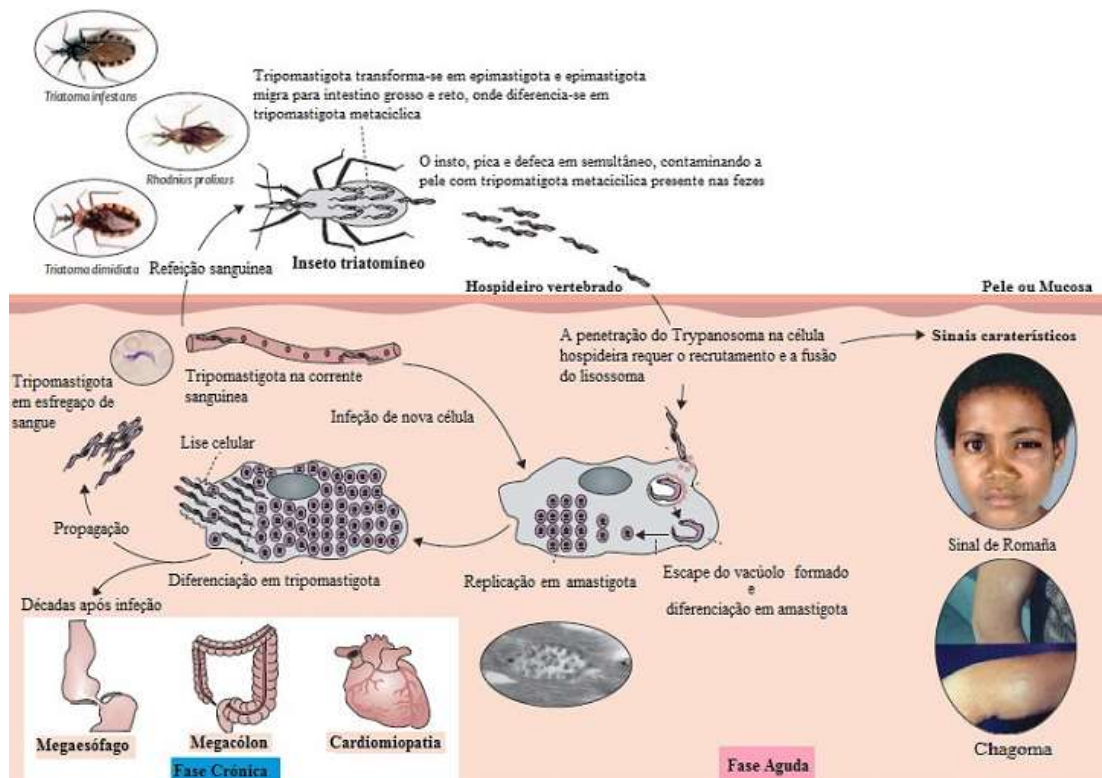


Figura 2. Transmissão vetorial e ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado do Rassi *et al.*, 2010.

1.3 Evolução Clínica da doença de Chagas

A infecção chagásica humana é caracterizada por uma fase aguda sucedida de uma fase crónica, que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro (Tanowitz *et al.*, 1992). A fase inicial da infecção, denominada aguda, ocorre quando o parasita encontra no sangue periférico do hospedeiro vertebrado, com a duração de quatro a oito semanas. A inflamação no local da entrada do parasita conduz a sinais característicos da infecção (figura 2). Quando esta ocorre pela conjuntiva ocular conduz a edema bupalpebral unilateral, denominado sinal de Romaña; quando o parasita penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão é designado de chagoma de inoculação (Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001; Teixeira *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2010).

A gravidade da infecção depende de vários fatores, como a virulência da estirpe do parasita e a suscetibilidade do paciente afetado (Tanowitz *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, a fase aguda é assintomática ou oligossintomática, principalmente em adultos, podendo manifestar-se como doença febril autolimitada e/ou outras manifestações clínicas, tais como a miocardite, alterações eletrocardiográficas e hepatoesplenomegalia (Rassi *et al.*, 2010). A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças, na primeira década de vida, podendo levar à morte ocasionalmente, devido a complicações decorrente da miocardite ou meningencefalite grave, ou ambos (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010).

As manifestações agudas da doença resolvem-se espontaneamente em 90% dos casos de pacientes infetados, mesmo na ausência de tratamento (Rassi *et al.*, 2010). Destes, aproximadamente 60-70% nunca desenvolverão a doença clinicamente aparente (Prata *et al.*, 2011; Guhl & Lazdinis-Helds, 2007). Estes pacientes provavelmente apresentam a forma indeterminada crónica, onde a doença de Chagas progride silenciosa e sub-repticiamente caracterizada pela reatividade serológica, a presença de anticorpos contra *T. cruzi* no soro (Rassi *et al.*, 2010). A fase indeterminada pode persistir por toda a vida do indivíduo (Prata 2001; Teixeira, *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2010).

Os restantes 30 % dos pacientes infetados poderão desenvolver subsequentemente a forma crónica grave da doença, resultando em aproximadamente 45.000 mortes por ano (Prata, 2001). Esta forma é caracterizada pelo comprometimento cardíaco (cardiomiopatia chagásica) e lesões que afetam o sistema gastrointestinal. Geralmente 10 a 30 anos após a infeção inicial podem surgir complicações digestivas severas como megaesófago e megacólon e/ou a doença cardiodigestiva (Prata, 2001; Rassi *et al.*, 2010). As manifestações neurológicas são observadas numa pequena percentagem, aproximadamente 5% dos doentes (Prata, 2001).

A infeção humana pelo *T. cruzi* deflagra um conjunto de reações que levam ao reconhecimento do parasita e o desenvolvimento de uma resposta imune específica muitas vezes capaz de controlar a carga parasitária por toda a vida do indivíduo (Jorge & Castro, 2000). Nas últimas décadas, evidências experimentais suportam duas hipóteses explicativas para a patogénese da doença Chagásica crónica, a persistência do parasita e a ocorrência de fenómenos autoimunes dirigidas a tecidos (Coura & Castro, 2002).

A hipótese que permanece indiscutível é que o parasita penetra as células do hospedeiro e multiplica-se sob a forma amastigota ocasionando os pseudoquistos. Sendo que, o processo da rutura destes pseudoquistos recém-formados conduz a libertação dos tripomastigotas, que circulam no organismo e invadem novas células, repetindo o ciclo e, conseqüentemente, a produção novas lesões que conduzem à fibrose (Teixeira *et al.*, 2006; Coura & Borges-Pereira, 2010). No entanto, existe um crescente consenso de que a persistência de parasitas, em conjunto com resposta imune desequilibrada do hospedeiro frente ao protozoário, a combinação do aumento da imunidade contra parasita, em conjunto, com a supressão imunológica conduz a respostas inflamatórias subjacentes às lesões características da doença de Chagas crónica (Tanowitz *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2010).

1.4 Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico preciso da doença de Chagas constitui um desafio devido ao período de latência da doença. As infecções agudas, são dificilmente reconhecidas pela inespecificidade dos sintomas, em caso de suspeita considera-se útil a realização de exame a fresco ou corado de esfregaço de sangue, para observação direta do parasita por meio da microscopia (Deborggraeve *et al.*, 2009). Durante a fase crónica, devido ao declínio da parasitemia, a OMS recomenda que o diagnóstico definitivo da doença de Chagas crónica se baseia em testes serológicos. Recomenda-se geralmente testar amostra com dois ou três testes diferentes para detetar a presença de anticorpos IgG anti- *T. cruzi*, tais como Imunofluorescência Indireta (IIF), Hemaglutinação Indireta (HAI) e *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (WHO Technical Report Series Nº 905, 2002). Estas técnicas permitem o diagnóstico de infecções crónicas em 95 a 99% dos casos. Além do diagnóstico clínico, estes métodos são utilizados no controle de doadores em bancos de sangue e em estudos epidemiológicos (Jorge & Castro, 2000).

A técnica do diagnóstico molecular, reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), utilizada para a deteção do parasita pode ser aplicada na fase aguda ou crónica da doença, quer para deteção da infeção congénita, quer no acompanhamento de pacientes após tratamento ou reativação da doença (Rassi *et al.*, 2010). Complementarmente, recomenda-se a PCR para diagnosticar a falha terapêutica, reativação da doença em doentes infetados pelo VIH e suspeição de transmissão oral (Schijman *et al.*, 2011). Os exames utilizados para avaliação do comprometimento de órgãos e evolução da doença de Chagas são o eletrocardiograma (ECG), e diversos métodos imagiológicos principalmente direcionados para a deteção de patologia cardíaca e digestiva (Rassi *et al.*, 2010).

1.5 Quimioterapia na doença de Chagas

Desde 1912 são vários os medicamentos utilizados experimentalmente, em ensaios clínicos, para o tratamento da doença de Chagas. Após algumas tentativas foi sugerido o uso do composto 5-nitrofurano, considerado ativo contra a forma circulante de *T. cruzi* (Coura & Borges-Pereira, 2012). No início da década de 1970, dois compostos nitroheterocíclicos apresentaram novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância. São estes Nifurtimox, um derivado dos nitrofuranos (NFX; Lampit[®], Bayer) e o Benzonidazol, um derivado nitroimidazol (BNZ; Rochagan[®], Radanil[®], Roche).

Em abril de 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do BNZ foram cedidos pela Roche ao Brasil sendo produzido desde então pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (de Oliveira *et al.*, 2008). Presentemente o BNZ é produzido, apenas em dois países, no Brasil pela LAFEPE e na Argentina pela companhia farmacêutica ELEA (Abarax[®]).

A doença de Chagas continua negligenciada, principalmente pelo facto de há mais de três décadas, apenas dois fármacos, Nifurtimox (NFX) e Benzonidazol (BNZ) serem aceites para o tratamento da doença, com base em considerações éticas e de eficiência (Coura & Castro, 2002; Coura & Borges-Pereira, 2010; Apt, 2010). Os fármacos são administrados por via oral e absorvidos a partir do trato gastrointestinal com a eliminação do metabolito, predominantemente renal (Coura & Castro, 2002).

Administra-se 15 mg/kg/dia do NFX em crianças e 8-10 mg/kg/dia em adultos, divididos em três doses, de preferência após as refeições, durante 60 a 90 dias (Pérez-Molina, *et al.*, 2012). BNZ está disponível sob a forma de comprimidos de 100 mg e 50 mg em doses diárias de 5 a 7,5 mg/kg de peso corporal, em adultos e 5-10 mg/kg/dia, em crianças, durante 30 a 60 dias (Coura & Castro, 2002; Pérez-Molina *et al.*, 2009). Para os casos congénitos, os recém-nascidos, são tratados com uma dose diária de 10 mg/kg. Em caso de meningoencefalite aguda recomenda-se a dose máxima que é 25 mg/kg/dia (WHO, 2002; Coura & Castro, 2002). Assim, é recomendado a deteção atempada e tratamento adequado das infeções congénitas (Pérez-Molina *et al.*, 2009).

1.5.1 Mecanismo de Ação dos fármacos

As evidências indicam que o nitrofurano, Nifurtimox e o derivado de nitroimidazol, Benzonidazol, atuam sobre todas as formas do parasita (Coura & Castro, 2002; Maya & Morello, 2005). Durante o processo de bio ativação destes fármacos, por ação das nitroreduzases, são produzidos metabólitos quimicamente reativos, radicais livres, e/ou metabólitos electrofílicos que inibem a síntese de proteínas, dando origem a uma degradação da biossíntese de macromoléculas do parasita (Maya & Morello, 2005; Maya *et al.*, 2007). O NFX atua via redução de grupos nitro em radicais nitro aniônicos instáveis, que reagem para produzir metabólitos de oxigênio reduzido altamente tóxico (anião superóxido e peróxido de hidrogênio). O mecanismo de ação do BNZ não é bem elucidado, como tal, são propostos diferentes mecanismos de ação. Sabe-se que inibe a síntese de proteínas, dando origem a uma degradação de biossíntese de macromoléculas do parasita (Apt, 2010; Maya *et al.*, 2007). Atua via *stress* redutivo, envolvendo a modificação covalente de macromoléculas por nitro reduções intermediárias (figura 3).

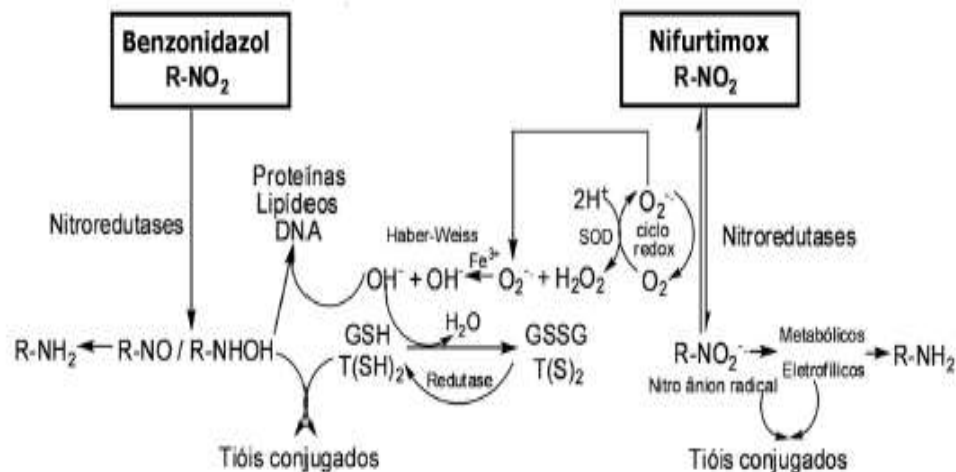


Figura 3. Mecanismo de ação proposto dos fármacos Nifurtimox e Benzonidazol. O grupo nitro (NO_2) presente nessas moléculas é reduzido ao grupo amina (NH_2) pela ação da enzima do tipo nitroreduzases que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO_2 . Este processo conduz à formação de um intermediário nitro radicalar ($\text{R-NO}_2\cdot$) com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH), o qual na presença de oxigênio impede a capacidade da desintoxicação dos radicais livres pelo *T. cruzi* (Maya *et al.*, 2007).

1.5.2 Efeito adverso dos fármacos

As ações destes fármacos são afetadas diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes (Coura & Castro, 2002). Tanto o NFX como o BNZ apresentam baixo perfil de tolerância. Este perfil é influenciado pela idade do paciente e pela dosagem do fármaco, sendo mal tolerada em maior dose e em adultos (Coura & Castro, 2002; Pinazo *et al.*, 2010; Pérez-Molina *et al.*, 2009). Os efeitos mais comuns para o NFX são perda de peso, sonolência, além de algumas manifestações digestivas, tais como náuseas, vômitos e cólicas intestinais. Quanto ao BNZ os efeitos adversos mais frequentes podem ser agrupados em três formas: (i) manifestações de hipersensibilidade, como dermatite com erupção cutânea - usualmente entre o 7º e 10º dia de tratamento edema periorbital ou generalizado, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; (ii) depressão da medula óssea: neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopénica; e (iii) polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite (Pinazo *et al.*, 2010). A frequência da reação adversa durante a terapia tem sido relatada cerca de 31,0% a 53,8%, em crianças e de 43,0% a 97,5%, em adultos com infecção crônica.

A maioria das reações adversas aparecem precocemente durante o curso do tratamento e a mediana do tempo de interrupção do tratamento, em torno de três semanas, conduzem à descontinuação do mesmo, devido à intolerância medicamentosa em mais de 10% dos pacientes chagásicos, principalmente adultos (Pérez-Molina *et al.*, 2012).

Por fim, é contraindicada a administração de qualquer um destes fármacos a grávidas ou doentes com insuficiência renal ou hepática (Pérez-Molina *et al.*, 2012). Uma vez que os metabólitos formados através do mecanismo de ação podem atuar também outros sistemas, especialmente do hospedeiro (humano), devido à sua elevada reatividade. Esta baixa especificidade de ação dos fármacos, em vias bioquímicas definidas do parasita, contribui para as principais limitações destes, para a toxicidade sistêmica e importantes efeitos adversos observados nos pacientes durante o tratamento (Maya & Morello, 2005). Na tabela 2, encontra-se resumida as principais reações adversas a estes fármacos.

Tabela 2. Efeitos adversos a Benzonidazol e Nifurtimox

Alterações Gastrointestinais:
Náuseas Vômitos Perda de peso Anorexia Distúrbios gástricos
Alterações Hematológicas (por hipersensibilidade):
Leucopenia Trombocitopenia Agranulocitose Febre Aumento das transaminases Supressão da Medula óssea
Alterações no Sistema Nervoso Central:
Dor de Cabeça Ansiedade Tontura Distúrbios do sono Epilepsia Neuropatia periférica
Alterações Dermatológicas:
<i>Rash</i> morbiliforme Eritematosa, erupção cutânea sensível à luz A dermatite atópica (leve ou grave) Ocasionalmente, síndrome de Stevens-Johnson, que requer a suspensão da terapia

Fonte: Adaptado de Apt (2010) e Pérez-Molina (2012).

1.5.3 Nanotecnologia aplicada à doença de Chagas

A produção de NFX foi descontinuada em alguns países da América Latina, incluindo o Brasil, utilizando-se apenas o BNZ (Prata, 2001; Coura & Castro, 2002; Coura & Borges-Pereira, 2012). Embora, amplamente utilizada por mais de três décadas, a descontinuação deve-se a elevada toxicidade do fármaco, considerado genotóxico, para além, do desenvolvimento de estirpes resistentes e do desinteresse do laboratório farmacêutico devido a comercialização não lucrativa (de Oliveira *et al.*, 2008).

A eficácia do tratamento com BNZ nos pacientes com infecção com *T. cruzi* aparenta ser variável e depende da fase clínica da doença (Pinazo *et al.*, 2013). O tratamento da fase aguda da infecção é eficaz com taxas de cura aproximadamente de 100% em crianças e 70% em adultos (Coura & Castro, 2002). Contudo, o efeito benéfico do BNZ durante a fase crônica estabelecida continua a não ser o mais desejável (Pérez-Molina *et al.*, 2009). Nestes pacientes chagásicos, a taxa de cura é apenas de 20% e a melhoria da cardiopatia ocorre em 50% (Apt, 2010). Por isso o tratamento nestes pacientes deve ser realizado ponderando os riscos e benefícios, os custos, a aceitação ou recusa do doente e a avaliação clínica do médico (Pérez-Molina *et al.*, 2009).

As razões para tais diferenças, na eficácia antiparasitária, nas fases aguda e crônica, podem estar relacionadas com a suscetibilidade ao fármaco das diferentes estirpes do parasita, bem como as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do BNZ, como capacidade de penetração tecidual limitada e o tempo de semivida relativamente curto (Urbina, 2010). Durante o processo do metabolismo do BNZ, cerca de 80% a 90% do fármaco sofre efeito da primeira passagem, conduzindo a reduzida biodisponibilidade do fármaco. Consequentemente sucede a geração de importantes níveis de metabólitos ativos produzidos pelo fígado, durante a biotransformação, que não possui nenhuma atividade antiparasitária e que pode aumentar o risco da toxicidade (Leonardi *et al.*, 2009). A farmacocinética do BNZ reflete a sua baixa solubilidade aquosa como tal é um fator que condiciona a absorção gastrointestinal e a necessidade da administração de elevadas doses do fármaco para obtenção de uma resposta terapêutica desejada (Lamas, 2006).

Outro desafio importante da farmacoterapia da doença de Chagas advém do fato do fármaco BNZ, não alcançar os parasitas intracelulares. A membrana plasmática e o microambiente complexo das células hospedeiras são barreiras físicas que comprometem o acesso do fármaco, impossibilitam a entrega seletiva e em quantidades suficientes para os amastigotas (Romero & Morilla, 2010; Apt, 2010).

Estas limitações demandam a necessidade de novas estratégias de investigação que promovam melhoria nas características físico-químicas do BNZ e de novas formulações, que minimizem e conseqüentemente diminuam a toxicidade (Pérez-Molina *et al.*, 2009; Apt, 2010; Coura & Borges-Pereira, 2012). Técnicas que consigam produzir diretamente fármacos com tamanho de partícula reduzido, através da aplicação da nanotecnologia, em escala de nanopartícula, podem também resolver as limitações, citadas anteriormente (Romero & Morilla, 2010).

A nano tecnologia é o estudo da manipulação e controlo da matéria na escala atômica ou molecular, geralmente trata-se de estruturas de tamanho de 100 nanómetros (nanómetro equivale a um milésimo do micron, ou seja, 10^{-9}) ou de dimensões inferiores e envolve o desenvolvimento de materiais ou dispositivos dentro desta mesma escala (El-Tonsy, 2010). A nanomedicina é uma aplicação inovadora da nanotecnologia para o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças nos humanos, utilizada nas doenças que afetam os países desenvolvidos. Esta tecnologia pode ser aplicada no combate de várias doenças parasitárias negligenciadas, como doença de Chagas, que afeta dezenas de milhões de pessoas resultando em elevada morbidade e mortalidade em todo o mundo (Romero & Morilla, 2010). O direcionamento e controlo da liberação do fármaco, através de sistema terapêutica em escalas nanométricas, podem solucionar algumas das limitações do atual tratamento com o BNZ, mencionadas anteriormente. A nanoencapsulação pode ser uma alternativa para melhorar o tratamento atual, através do aumento da velocidade de dissolução do BNZ podendo deste modo aumentar a sua biodisponibilidade (Romero & Morilla, 2010).

Nas últimas décadas as nanopartículas têm emergido como um sistema promissor para entrega de fármaco, nanossistemas de distribuição de fármaco (*Nano-drug delivery systems - nanoDDSs*), representam meios úteis para entrega intracelular seletiva de fármaco. A capacidade de modificar a superfície de células alvo e tecidos

e a aceitação por parte dos mecanismos fagocíticos confere aos nanoDDSs a habilidade de superar as barreiras celulares e entregar o fármaco (Romero & Morilla, 2010).

A utilização dos nanocarregadores, no tratamento da doença de Chagas permite obter otimizar um tratamento existente, evitando os custos extremamente elevados relacionados com a descoberta de novos compostos (Romero & Morilla, 2010). As nanopartículas como lipossomas, emulsomas e nanoesferas demonstraram grande importância para a entrega e transporte de fármacos. Os lipossomas são vesículas artificiais nanométricas de forma esférica que podem ser produzidos a partir de fosfolípidos naturais e colesterol (El-Tonsy, 2010). Na figura 4, encontra-se ilustrada a estrutura de a um lipossoma utilizado para entrega de fármaco.

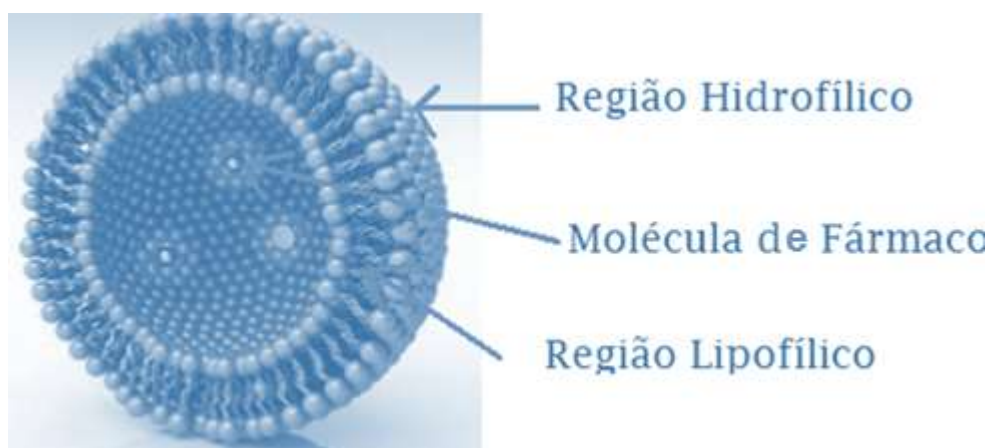


Figura 4. Ilustração da estrutura do lipossoma como nanocarregadores de fármaco (<http://www.berenice-project.eu/>).

Os lipossomas são classificados em três tipos básicos, com base no tamanho e número de bicamadas. As vesículas multilamelares consistem em várias bicamadas lipídicas separadas entre si por espaços aquosos. Estas moléculas são heterogêneas no tamanho, variando geralmente de algumas centenas de milhares de nanômetros (nm) de diâmetro. As vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV) são formadas por uma única bicamada que circunda o espaço aquoso encapsulado e variam apenas em termos do tamanho. As SUVs são menores do que 100 nm enquanto as LUV possuem diâmetros maiores que 100 nm. Os fármacos podem ser encapsulados ou no espaço aquoso ou intercalados na bicamada lipídica dos lipossomas, em função das características físico-químicas (Moghimi *et al.*, 2005).

Os lipossomas são estruturas promissoras devido à sua versatilidade no que diz respeito, ao tamanho, à composição, as características da superfície e à capacidade para integrar e encapsular uma vasta gama de compostos farmacologicamente ativos. Na sua superfície podem ser eficientemente incorporadas diferentes unidades de segmentação como péptidos e anticorpos que promovem o aumento da acumulação da carga farmacêutica nas células alvo. Além disso, lipossomas são reconhecidos como veículos farmacêuticos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Moghimi *et al.*, 2005; El-Tonsy, 2010).

Por outro lado, as ciclodextrinas vêm despertando grande interesse na comunidade científica e na química de macromoléculas (Venturini *et al.*, 2008). Ciclodextrinas (CDs) pertencem à família dos oligossacarídeos macrocíclicos, formam complexos do tipo recetor-substrato servindo como um ambiente único para reações químicas. Possuem a capacidade para formar complexos de inclusão com várias substâncias, desde gases nobres, derivados de benzeno, corantes aromáticos e água. Por este motivo, são muito utilizadas em produtos industriais e tecnológicos, por exemplo, em diversas áreas como nova classe de excipientes farmacêuticos (figura 5).

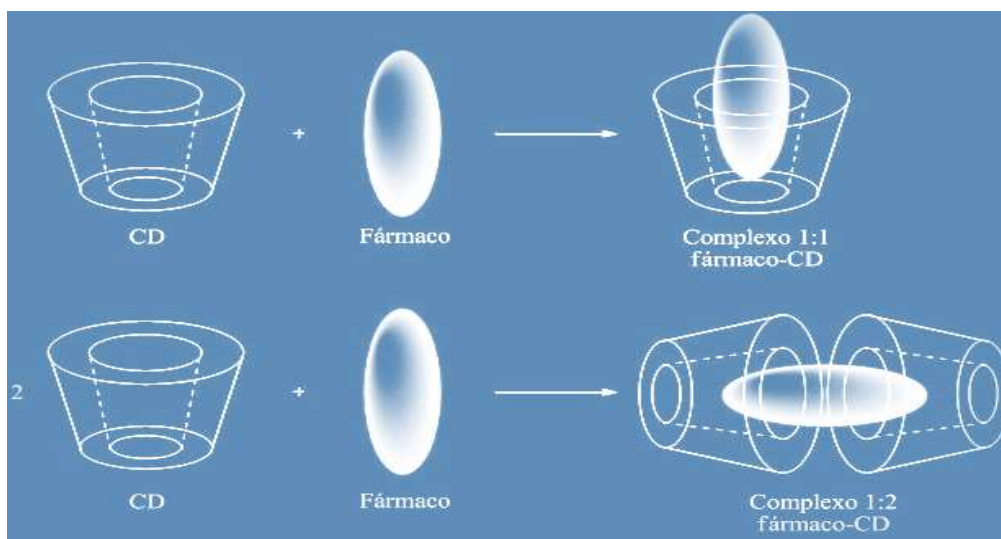


Figura 5. Formação de complexo de fármaco-ciclodextrina, 1:1 e 1:2. Adaptado de Davis Brewster, 2004.

Estudos utilizando Praziquantel (PZQ), um anti-helmíntico, encapsulado com CDs revelou um aumento em cinco vezes na solubilidade em água do fármaco conduzindo ao aumento atividade farmacológica do PZQ (Venturini *et al.*, 2008). Outro estudo demonstrou que uso de nano partículas do metronidazol preparadas com CD apresentou alta eficiência de encapsulamento e com tamanho de partículas apropriado para administração intravenosa (Lahiani-Skiba *et al.*, 2006). A performance *in vitro* das formulações, complexadas com ciclodextrinas (em escala micro particular) em comparação com o comprimido comercial (Rochagan®), demonstrou uma velocidade de dissolução do fármaco complexado três vezes superior (da Cunha-Filho *et al.*, 2012). Foi possível obter comprimidos de liberação imediata, com a solubilização de cerca de 90% da dose administrada nos primeiros cinco minutos, em comparação com 30% da formulação do comprimido disponível no mercado (da Cunha-Filho *et al.*, 2012).

Assim, tal como os lipossomas, a formação de complexos do BNZ (pouco solúvel em água) com CDs representa uma alternativa para melhorar a solubilidade do fármaco, de modo a diminuir os efeitos tóxicos resultantes das limitações do mesmo.

Esforços para alcançar esse objetivo estão sendo feitos, com projetos como BERENICE (*Benznidazol and Triazol Research group for Nanomedicine and Innovation on Chagas disease*). O projeto BERENICE insere-se no âmbito do Programa em Inovação em Saúde da Comissão Europeia e abrange uma rede Europeia de investigação na doença de Chagas, coordenado pelo Hospital Universitário Vall d'Hebron (ICS-HuVH, Barcelona, Espanha). O projeto BERENICE reúne grupos de investigação Europeus e Latino-americanos, tais como: Grupo NanoMol do Instituto de Investigação da Ciência dos Materiais de Barcelona-Espanha do Conselho Científico (ICMAB-CSIC), NanoBioCel Grupo da Universidade do País Basco País (UPV / EHU), Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa (IHMT), Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Parasitologia Argentina Dr. Mario Fatała Chaben, e duas empresas farmacêuticas, ELEA e Práxis.

Este projeto propõe a utilização de uma nova formulação sublingual do BNZ, produzida em nanosistema de distribuição do fármaco, pelos parceiros do projeto BERENICE, durante a terapêutica da doença de Chagas (www.berenice-project.eu). A entrega sublingual das nano partículas lipídicas apresenta muitas vantagens, tais como, mucoadesidade, biodegradabilidade, não sofre efeito da primeira passagem, com possibilidade de diminuição total da dose do fármaco, boa tolerabilidade e de libertação sustentada do princípio ativo, assim, intervalo mais longo da dosagem. Espera-se melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica do atual tratamento da doença de Chagas, com BNZ, minimizando o perfil da toxicidade, reduzindo o aparecimento de resistência e aumentando a concentração tecidual.

2. Objetivo

Neste seguimento, o presente estudo, insere-se no âmbito do projeto BERENICE, que tem como objetivo central o desenvolvimento de uma nova formulação de Benzonidazol. Por se tratar de um projeto de investigação multidisciplinar, os objetivos específicos deste estudo são:

- ✓ Estabelecer parâmetros toxicológicos para a avaliação do perfil toxicológico do BNZ em modelo murino;
- ✓ Avaliar biomarcadores de função hepática durante a terapêutica da doença de Chagas com BNZ em modelo murino;
- ✓ Estabelecimento do cultivo celular de diferentes estirpes de *T. cruzi* e avaliar a capacidade infetividade em modelo murino;
- ✓ Avaliar os níveis de resistência e suscetibilidade ao BNZ das diferentes estirpes de *T. cruzi* mantidas em meio de cultivo celular;

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais utilizados

Os protocolos referentes à utilização do modelo animal foram executados de acordo com as normativas da Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). Os murganhos (*Mus musculus*) fêmeas e machos das linhagens, BALB/c, CD1, pesando entre 25 e 30 gramas, com 3 a 8 semanas de idade foram obtidos no biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, em Lisboa.

3.2 Fármacos, excipientes e nanoformulações

A formulação de BNZ utilizada durante este estudo foi Abarax® 100mg (Lote 614971-1- ELEA), sob a forma de comprimidos, cedidos gentilmente pela companhia farmacêutica ELEA (Argentina), um dos parceiros do projeto BERENICE. Os excipientes das nanoformulações do BNZ, designadas BCDELS 59, BCPCA12 e NLC-s *Vacías* e as nanoformulações do BNZ, designadas BCDELS 61, BCPCA11 e NLC-s 20% BNZ foram produzidas pelo grupo, *Networking Biomedical Research Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine* (CIBER-BBN - Espanha). As nanoformulações do Benznidazol, designadas BNZ/CD (12%), BNZ/CD (24%) e BNZ/CD (50%) e o BNZ-Princípio Ativo (BNZ-PA) foram produzidas pelo grupo de *Centre of Nanotechnology and Molecular Materials* (NANOMOL - Espanha) também parceiro do projeto BERENICE. Na tabela 3, seguidamente apresentada, encontra-se descrita os excipientes, medicamento e as nanoformulações do BNZ utilizadas durante o estudo da toxicidade no modelo murino.

Tabela 3. Descrição e a composição do medicamento, excipiente e das nano formulações do BNZ utilizadas durante o estudo da toxicidade aguda, no modelo murino.

	Composição	
Princípio Ativo	BNZ	Pó
Medicamento	BNZ-A	Comprimidos de 100mg do BNZ (Abarax®) -ELEA (Lote 614971-1)
Excipientes	BCDELS 59	Coleterol:Dipalmitoilfosfatidilcolina: Colesterol-PEG (suspensão)
	BCPCA12	Hidroxipropil- β -ciclodextrina (pó)
	NLC-sVacías	Carregadores lipídicos nanoestruturados Vazios (pó)
	Ciclodextrina	Ciclodextrina (pó)
Nanoformulações	BCDELS 61	Coleterol:Dipalmitoilfosfatidilcolina:Colesterol-PEG:Benznidazol (Suspensão)
	BCPCA11	Hidroxipropil- β -ciclodextrina: Benzonidazol (pó)
	NLC-S 20% BNZ	Carregadores lipídicos nanoestruturados com 20% de BNZ (pó)
	BNZ/CD (12%)	Benzonidazol: Hidroxipropil- β -ciclodextrina (0,15 g de BNZ: 1 g Total)
	BNZ/CD (24%)	Benzonidazol: Hidroxipropil- β -ciclodextrina (0,25 g de BNZ: 1 g Total)
	BNZ/CD (50%)	Benzonidazol: Hidroxipropil- β -ciclodextrina (0,50 g de BNZ: 1 g Total)

3.3 Determinação da Toxicidade Aguda do BNZ em modelo murino

Com objectivo de avaliar a toxicidade aguda das nanoformulações com o BNZ e comparação com o medicamento disponível no mercado, foram utilizados duas metodologias, conforme descrito na figura, seguidamente.

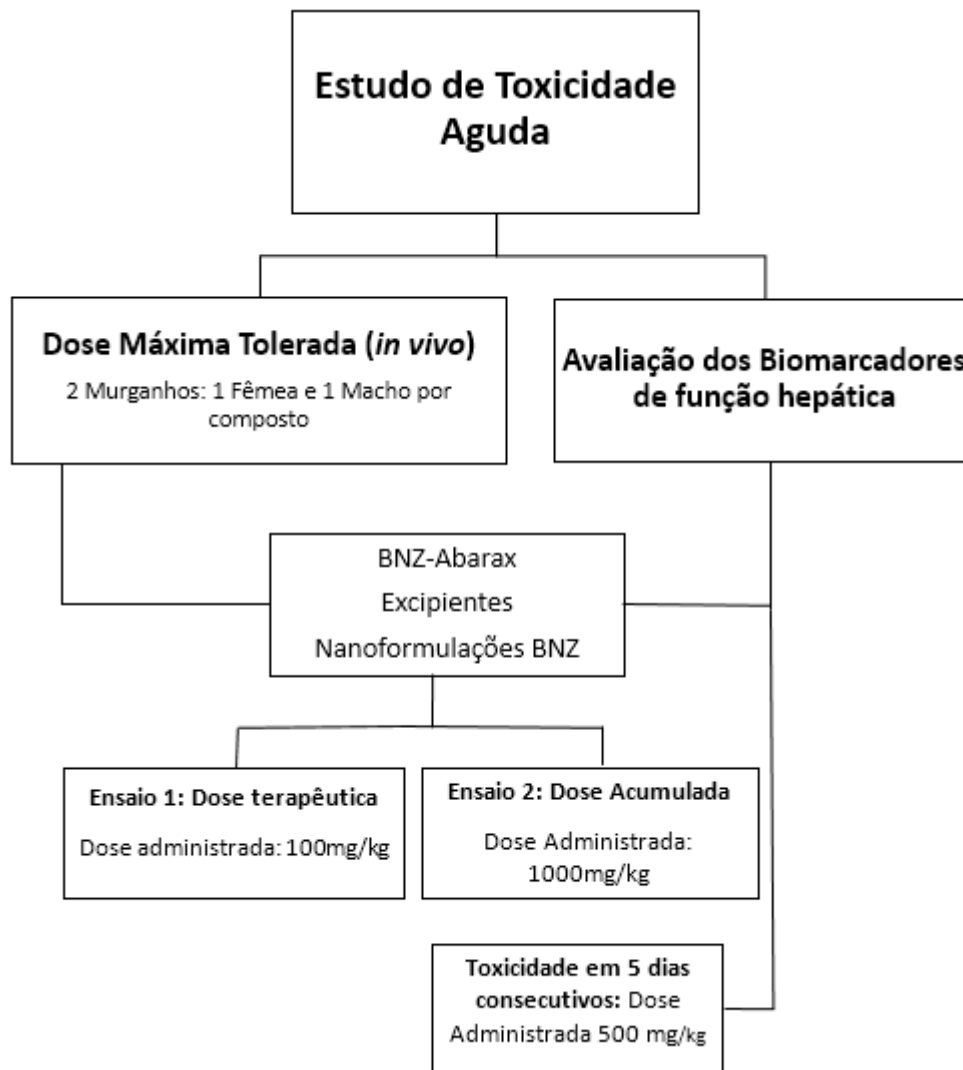


Figura 6. Ilustração do método utilizado no estudo da toxicidade aguda do BNZ, dos excipientes e das nano formulações.

3.3.1 Determinação da dose máxima tolerada do BNZ-A, dos excipientes e das nano formulações

A determinação da dose máxima tolerada do BNZ-Abarax® (BNZ-A), dos excipientes e das nanoformulações foi realizado através de dois ensaios *in vivo*, tendo-se utilizado em cada um deles dois *Mus musculus* (Balb-c), uma fêmea e um macho, saudáveis, com cinco a oito semanas de idade, para cada composto (OCDE Environment Health and Safety Publications , 2004 ; Romanha, et al., 2010).

De acordo com as instruções dos fabricantes, as formulações, em pó, BNZ-A; os excipientes BCPA12 e NLC-S Vacías; e as nanoformulações, BCPCA11 e NLC-S 20% BNZ, foram suspensos em solução tamponada de fosfato (PBS, *Phosphate buffered saline*). Os animais a que se administrou apenas o PBS serviram de grupo controlo. As nanoformulações do BNZ, BNZ/CD (12%), BNZ/CD (24%) e BNZ/CD (50%), foram suspensas em água destilada para a determinação da dose máxima tolerada. Aos grupos controlos foram administrados o BNZ-PA, o excipiente ciclodextrinas e a água.

A administração foi realizada por via oral com recurso a uma seringa de insulina (1ml-100 UI) acoplada a uma sonda esofágica, em dose crescente, a cada duas horas. Inicialmente utilizou-se a dose terapêutica (5 mg/kg) calculada para a média, do peso inicial dos animais num volume final de 0,1 mililitros. A última dose deste ensaio correspondeu a 100 mg/kg do peso corporal. No segundo ensaio, para determinar a dose máxima tolerada pelos animais, inicialmente administrou-se 100 mg/kg do peso corporal, sendo que a última dose final acumulada foi de 1000 mg/kg do peso corporal. Ao longo das administrações do BNZ- A, excipientes e da nanoformulações, tanto no primeiro como segundo ensaio, foram inspecionados os sinais clínicos dos animais, tais como, a mortalidade, o *stress*, a sonolência, icterícia urinária, despigmentação da pele e eritema, de acordo com as regras da OECD nº 423 (OCDE, 2011). Após vinte e quatro horas da administração os animais foram sacrificados, tendo-se recolhidos as amostras de sangue total, por cardiocentese, para o fracionamento dos soros, com o objetivo de avaliar biomarcadores de função hepática, posteriormente, através de métodos de quantificação da atividade enzimática da alanina amino transferase (ALT/GTP) e do aspartato amino transferase (AST/GOT).

3.4 Avaliação dos biomarcadores de função hepática em modelo murino

3.4.1 Determinação dos biomarcadores hepáticos em 24 horas após o tratamento com BNZ-Abarax em modelo murino

Para a determinação dos marcadores da função hepática durante a administração do BNZ-A utilizaram-se 3 grupos (três animais por grupo) de murganhos, *Mus musculus (Balb/c)* fêmeas, com cinco a oito semanas de idade.

As administrações dos compostos foram realizadas por via oral, com recurso a uma seringa de insulina (1ml-100 UI) acoplada a uma sonda esofágica. Os animais foram previamente identificados e pesados. Num grupo de murganhos administrou-se uma dose única de 100 mg/kg do BNZ-A e os animais foram observados durante 24 horas. Noutro grupo administrou-se, em doses crescentes, o fármaco a cada duas horas até atingir a dose final acumulada de 1000 mg/kg. Ao grupo controlo administrou-se apenas o PBS.

Os animais foram acompanhados durante 24 horas, e posteriormente foram sacrificados por sobredosagem anestésica e recolheu-se as amostras de sangue total, por cardiocentese, para o fracionamento dos soros. Os soros foram obtidos por meio de centrifugação após coagulação à temperatura ambiente durante 30 minutos, refrigeração a 4°C durante uma hora e centrifugação a 2000g durante 10 minutos na centrífuga Hemle Z323K (Citomed®). Após a obtenção dos soros, estes, foram armazenados a -20°C, para a determinação posterior dos biomarcadores da função hepática, através de métodos de quantificação da atividade enzimática da alanina amino transferase (ALT/GTP) e do aspartato amino transferase (AST/GOT).

3.4.2 Determinação dos biomarcadores hepáticos após 5 dias da administração do BNZ-A e BNZ- PA

Para a determinação dos biomarcadores da função hepática, cinco dias após administração do BNZN Abarax® (BNZ-A) e do princípio ativo (BNZ-PA) foram utilizados 3 grupos de murganhos (5 animais/grupo), *Mus musculus* (CD1), com oito semanas de idade previamente identificados e pesados. As administrações foram realizadas com recurso a uma seringa de insulina (1ml-100 UI) acoplada a uma sonda esofágica. Ao grupo controlo, administrou-se apenas o PBS. Nos restantes grupos, administrou-se uma dose única de 100 mg/kg do BNZ-A e BNZ-PA, respetivamente, durante cinco dias consecutivos. Após cinco dias, os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica, tendo-se recolhido as amostras de sangue total por cardiocentese para o fracionamento dos soros. Por meio de centrifugação, os soros foram obtidos após coagulação à temperatura ambiente durante 30 minutos, refrigeração à 4°C durante uma hora e centrifugação a 2000g durante 10 minutos na centrífuga (Hemle, Z323K, Citomed). A seguir, as amostras foram armazenadas à -20°C, para a determinação dos biomarcadores de função hepática, através de métodos de quantificação da atividade enzimática, da alanina amino transferase (ALT/GTP) e atividade enzimática do aspartato amino transferase (AST/GOT).

3.4.2.1 Determinação da actividade da alanina amino transferase (ALT/GPT)

Para a determinação da atividade da enzima, alanina amino transferase (ALT/GPT), foi utilizado o *kit* comercial (Química Clínica Aplica S.A.) *QAC, GPT/ALT Colorimetric*, segundo método do Reitman e Frankel (1957). Adicionou-se 100 µl/poço do substrato ALT na placa de 96 poços (Brandplates®, Alemanha) e incubou-se na estufa a 37°C durante 5 minutos. Depois, adicionou-se 100 µl/poço da amostra e a placa foi incubada novamente a 37°C durante 30 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 100 µl/poço do reagente para o desenvolvimento da reação colorimétrica, à temperatura ambiente e incubou-se durante 20 minutos. Após este período, adicionou-se 250 µl/poço da solução de NaOH (1/10), para parar a reação. No final, determinou-se a absorvância a 490 nm, no espectrofotômetro da BIO-RAD, modelo 680.

3.4.2.2 **Determinação da atividade do aspartato amino transferase (AST/TGP)**

Para a determinação da atividade da enzima, aspartato amino transferase (AST/TGP) foi utilizado o *kit* comercial (Química Clínica Aplica S.A) *QAC, GPT/ALT Colorimetric*, segundo método do Reitman e Frankel (1957). Inicialmente, adicionou-se 100 µl/poço do substrato AST na placa de 96 poços (Brandplates®, Alemanha) e incubou-se na estufa a 37°C durante 5 minutos. De seguida, foi adicionado 100 µl/poço da amostra e incubou-se novamente à 37°C durante 60 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 µl/poço do reagente para o desenvolvimento da reação colorimétrica, à temperatura ambiente, seguido de incubação de 20 minutos. Após este período, adicionou-se 250 µl/poço da solução do NaOH, para parar a reação. No final, determinou-se a absorvância a 490 nm, no espectrofotômetro da BIO-RAD, modelo 680.

3.4.2.3 **As análises estatísticas**

Os dados obtidos, a absorvância, da determinação da quantificação enzimática do ALT e do AST foram expressos em U/L. As análises estatísticas dos valores foram realizadas através de análises de variância (ANOVA). Para tal, utilizou-se o *software INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

3.5 Avaliação *in vitro* da suscetibilidade ou resistência ao BNZ das três diferentes estirpes de *T. cruzi*

3.5.1 Parasitas

A estirpe **Bolívia** foi isolada de fezes de *Triatoma infestans*, proveniente de Vitichi-Bolívia (Funayama & Prado Júnior, 1974). Caracterizada como *T. cruzi* **I** (Miles, et al., 1980; Souto, et al., 1996; Satellite Meeting , 1999).

A estirpe **Y** foi isolada de um caso humano de doença de Chagas por meio de xeno diagnóstico, por Freitas (1950) e caracterizada por (Silva & Nussenzweig , 1953). A estirpe foi caracterizada como *T. cruzi* **II** (Miles, et al., 1980; Souto, et al., 1996; Satellite Meeting , 1999).

A estirpe **QMM5** foi isolada a partir de formas flageladas do parasita no intestino posterior de triatomíneos, *Triatoma rubrovaria* sendo caracterizada como pertencente a *T. cruzi* **III** (Ribeiro, et al., 2014).

Na determinação da atividade tripanocida do BNZ foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi*, das estirpes Bolívia, Y, e QMM5. Estas estirpes foram cultivadas e mantidas em meio cultivo celular, LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% Soro fetal bovino inativado (Jorge & Castro, 2000), na estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 26 °C.

O ensaio colorimétrico MTT, corante de tetrazólio, com adaptações (Muellas-Serrano, et al., 2000) foi utilizada para avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as estipes. A metodologia MTT baseia-se na redução do MTT [3- brometo (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] pelas células viáveis, a um produto solúvel, formazan, que por sua vez, permite a avaliação da atividade metabólica ou a viabilidade das células em cultura (Sieuwerts, et al., 1995).

Para a determinação da atividade tripanocida do BNZ sobre as formas epimastigotas das estirpes Y, Bolívia e QMM5 de *T. cruzi* obtidas durante a fase estacionária. Inicialmente adicionou-se num volume de 100 µl na concentração de $1,0 \times 10^6$ parasitas/ml em meio LIT, na placa de 96 poços (*Falcon*, USA). O fármaco BNZ-PA foi dissolvido em DMSO e adicionou-se 10 µl/poço, em triplicado nas seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, e 500 µg/ml. A placa foi incubada durante 72 horas e 96 horas, a 26 °C na estufa. Após este período, adicionou-se 10 µl da solução de MTT (2,5 mg/ml) / PMS (0,22 mg/ml) em cada poço. Incubou-se a placa novamente, durante 75 minutos. A seguir, adicionou-se 100 µl da solução de solubilização, HCl (0,01M) - *Sodium dodecyl sulfate* (SDS-10%), para dissolver os cristais de formazan recém-formados. A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos e procedeu-se a leitura no espectrofotômetro (Modelo 680, BIO-RAD) a 570 nm. Posteriormente, foi determinada a percentagem de toxicidade do fármaco como descrito por Muellas-Serrano, et al., 2000.

A percentagem da citotoxicidade do BNZ foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = [(AE - AL) - (AT - AC)] / (AE - AL) \times 100, \text{ em que:}$$

AE = absorvância dos poços contendo apenas as formas epimastigotas

AL = absorvância dos poços contendo apenas o LIT ;

AT = absorvância dos poços tratados

AC = absorvância dos poços contendo meio LIT e BNZ;

3.6 Avaliação da infeciosidade de diferentes estirpes de *T. cruzi* em murganhos

No ensaio para a avaliação da infeciosidade foram utilizadas as formas tripomastigotas metacíclicas das estirpes, Bolívia, Y e QMM5. Estas foram cultivadas e mantidas em meio de cultivo celular, LIT suplementado com soro fetal bovino inativado (Jorge & Castro, 2000), na estufa a 26 °C. As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas a partir da diferenciação celular das formas epimastigotas. A transformação de formas epimastigotas em tripomastigotas foi realizada por meio de repique celular, em que, 1 ml da cultura foi transferido para outro tubo de cultivo com 9 ml de meio *LIT*. O tubo foi mantido durante 25 dias na estufa. Após este período, formas tripomastigotas de *T. cruzi* predominaram no meio de cultura.

3.6.1 Inoculação das estirpes Y, Bolívia e QMM5 de *T. cruzi* em murganhos

Para o estudo da infetividade das diferentes estirpes de *T. cruzi* (Bolívia, Y e QMM5), em murganhos, utilizou-se 4 grupos animais com 5 a 8 semanas de idade obtidas do Biotério, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Como grupo controle utilizou-se animais saudáveis (n=3) e os restantes grupos, inoculados com as estirpes de *T. cruzi*, foram constituídos por 10 animais. A inoculação foi realizada por via intraperitoneal, numa dose de $1,0 \times 10^5$ parasitas/ml, tripomastigotas das três diferentes estirpes de *T. cruzi* (Bolívia, Y e QMM5) obtidas a partir da diferenciação do cultivo celular.

Para estabelecer o padrão de infecção, esfregaços de sangue fresco obtidos pelo corte da cauda dos murganhos, foram examinados, a partir do 7º dia da infecção. Os animais foram observados durante setenta dias após a infecção, tendo sido sacrificados após trinta, cinquenta e cinco e setenta dias da infecção, onde recolheu-se o sangue total por de punção cardíaca. As amostras do sangue obtidas, sem anticoagulante foram incubadas a 4 °C durante 30 minutos e posteriormente foi centrifugado durante 10 minutos a 2000g. Os soros obtidos foram armazenados a - 80 °C.

3.6.2 Determinação da resposta humoral das estirpes Y, Bolívia e QMM5 em modelo murino

3.6.2.1 Preparação do extrato proteico, antígenos de *T. cruzi*

Extratos proteicos (antígeno) de *T. cruzi* (estirpe Y) foram obtidos a partir de formas epimastigotas do cultivo celular. Inicialmente, as alíquotas contendo parasitas, em meio *LIT* foram centrifugadas, 2000g durante 10 minutos. Após, a centrifugação descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a lavagem, ressuspensão do *pellet* em PBS, procedente de centrifugação. Este procedimento foi realizado por três vezes, no final o extrato foi ressuspensionado em PBS. Seguidamente, realizou-se a quantificação de proteínas, pela técnica de Bradford modificada (*Pierce® BCA protein assay kit*).

3.6.2.2 Produção do anticorpo policlonal (anti-*T. cruzi*) em murganhos

A produção do anticorpo policlonal (Pab) foi realizado através da injeção subcutânea dos murganhos com mistura de extrato proteico de *T. cruzi* e adjuvante de modo a induzir uma resposta imune efetiva. Para tal, utilizou-se 3 murganhos *Mus musculus* (*Balb/c*) fêmeas com cinco a oito semanas de idade obtidas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, tendo-se inoculado 200 µl de uma emulsão composta por 100µg do extrato proteico e 100 µl de ACF (Adjuvante de Freund completo; *Sigma/USA*) na primeira imunização. Quatro e oito semanas após a primeira inoculação realizaram-se a segunda e terceira imunização com 100µg/ µl de antígeno e 100µl de AIF (Adjuvante de Freund incompleto; *Sigma/USA*). Após sessenta dias da primeira inoculação os animais foram sacrificados para a recolha de sangue e obtenção dos soros. A amostra de sangue obtida sem anticoagulante, foi incubada a 37°C durante 1 hora e a 5 °C durante 30 minutos. Posteriormente centrifugou-se durante 10 minutos a 2000g. O soro obtido foi armazenado a -20°C e analisado pelo método de *ELISA* indireto para a pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi*.

Para a determinação de anticorpos IgM e IgG anti-*T. cruzi* assim como as subclasses IgG1, IgG2a e IgG3, nos soros dos murganhos infetados, com as diferentes estirpes de *T. cruzi*, utilizou-se o método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto. As soluções utilizadas foram tampão bicarbonato (0,1 M pH 8.5); tampão de lavagem (PBS – Tween20 a 0,05%); tampão de bloqueio (PBS - Tween20 a 0,05% e BSA a 5%); tampão anticorpo (PBS – Tween20 a 0,05%, BSA a 1%); tampão de paragem (4N H₂SO₄) e tampão citrato (ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio 0,1 M, pH 5.0). Inicialmente, adsorveu-se 100 ng do antigénio de *T. cruzi* dissolvido em tampão de bicarbonato nos poços da placa de microtitulação de 96 poços (Costar, USA) e incubou-se durante toda a noite a 4 °C. Após a incubação procedeu-se a lavagem por três vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, de modo a remover o excesso do antigénio que não adsorveu na placa. Como tal, após a última lavagem, para remoção de todos os vestígios do tampão, bateu-se vigorosamente com a placa invertida contra folhas de papel absorventes.

A seguir, realizou-se a incubação com 200 µl/ poço de tampão do bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação orbital, com o objetivo de reduzir a ocorrência de ligações inespecífica. Após este período, procedeu-se de novo a lavagem nas mesmas condições descritas anteriormente e seguidamente adicionou-se as amostras de soro diluídas 1:400 em tampão de anticorpo (100 µl/poço). Deixou-se incubar por mais 1 hora à temperatura ambiente, permitindo a interação do anticorpo presente no soro ao antigénio adsorvido na microplaca. De seguida, voltou-se a lavar a microplaca, por cinco vezes com 200 µl/poço de tampão de lavagem, de modo a remover o excesso do anticorpo primário que não se ligaram ao antigénio adsorvido. Para a deteção e quantificação do anticorpo primário anti-*T. cruzi* foi adicionado 100 µl/poço de solução de anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase - HRP na diluição de 1:4000 anti-Mouse IgG (Sigma-aldrich/EUA). A concentração do anticorpo secundário conjugado com peroxidase para IgM (1:400 *ANTI-Mouse IgM:HRP*; Sigma-aldrich/EUA); as subclasses IgG1 (50 ng *ANTI-Mouse IgG1:HRP*; AbD Serotec/UK) IgG2a (25 ng *ANTI-Mouse IgG2a:HRP*; AbD Serotec/UK) e IgG3 (1:400 *ANTI-Mouse IgG3:HRP*, Sigma-aldrich/EUA). Seguiu-se, respetivamente, nova incubação das placas uma hora e cinco novas lavagens nas condições já descritas.

Adicionou-se 100 µl/poço de solução substrato (10 ml de tampão Citrato, 10 mg de *o*-Phenylenediamine (OPD) e 10 µl de H₂O₂ 3% v/v) incubou-se pela última vez, durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente, foi adicionado 50 µl/poço da solução de paragem da reação (H₂SO₄, 4N) para inibir a atividade enzimática. A reação foi avaliada por densidades óticas, obtidas a 490 nm no espectrofotómetro, Modelo 680 da BIO-RAD. O ensaio foi realizado em duplicado e os dados da densidade ótica apresentada em médias e desvios padrão, utilizando o *software* *INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

3.6.3 Quantificação sérica da Interleucina (IL-4) em murganhos

A quantificação das citocinas IL-4, TGF-β e IFN-γ foi feita utilizando os *kits DuoSet*® ELISA (*R&D systems*) das respetivas citocinas. Estas técnicas baseiam-se no princípio do ensaio de ELISA *sandwich* associado a uma curva padrão.

As soluções utilizadas encontram-se descritas no apêndice B. Para o procedimento foi utilizado a placa de microtitulação de 96 poços (Costar, USA), onde foram adsorvidos anticorpos de captura (anti-IL-4) a uma concentração de 4 µg/ml diluída na solução de PBS e deixou-se em incubação, à temperatura ambiente durante a noite. Após, incubação procedeu-se à lavagem por três vezes com 200 µl/poço do tampão de lavagem. Seguidamente, adicionou-se 200µL/poço do tampão de bloqueio, durante por uma hora e trinta minutos. Após este passo, e um ciclo de lavagem como descrita anteriormente, as amostras e o padrão foram adicionados nos poços, diluídos no reagente diluente. As amostras foram diluídas 1:10 e a curva-padrão foi realizada em triplicado, com padrão de proteína recombinante (IL-4), numa diluição inicial de 1000 pg/ml e posteriormente, diluídas 1:2 até 15,125 pg/ml. Procedeu-se a duas horas de incubação, seguida de lavagem por três vezes. Adicionou-se 100µL/poço do anticorpo de deteção (Anti-IL-4 conjugado com biotina) fornecido no *kit* diluído em reagente diluente numa de concentração de 600 ng/ml. Seguiram-se as duas horas de incubação e um ciclo de lavagens, adicionou-se 100µl por poço de estreptavidina conjugada com a peroxidase em solução de reagente na proporção 1:200 (v/v). Esperou-se os vinte minutos necessários de incubação e realizaram-se novas três lavagens. Após, este período, adicionou-se 100µl da solução substrato aos poços.

A reação foi suspensa com a adição de 50µl da solução de paragem e a absorvância foi medida utilizando o espectrofotómetro (Modelo 680, Bio-Rad) a 450 nm. A determinação das concentrações da IL-4 realizou-se através da equação da reta de calibração, pela Lei de Lambert-Beer. Os resultados foram apresentados, as médias e os desvios, utilizando o *software INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

3.6.4 Quantificação sérica do Interferão gama (IFN γ) em murganhos

Inicialmente adsorveu-se anticorpos de captura (anti-IFN- γ) na placa de microtitulação de 96 poços (Costar, USA), a uma concentração de 4 µg/ml diluída na solução de PBS e deixou-se em incubação durante a noite. Após, incubação procedeu-se a lavagem por três vezes com 300 µl/poço do tampão de lavagem. Seguidamente, adicionou-se 200µL/poço do tampão de bloqueio, durante por uma hora e trinta minutos. Após este passo, e um ciclo de lavagem como descrita anteriormente, as amostras e o padrão foram adicionados nos poços, diluídos no reagente diluente. As amostras foram diluídas 1:10 e a curva-padrão foi realizada em triplicado, com padrão de proteína recombinante (IFN- γ), numa diluição inicial de 1000 pg/ml e posteriormente, diluídas 1:2 até 15,125 pg/ml. Procedeu-se a duas horas de incubação, seguida de lavagem por três vezes. Adicionou-se 100µL/poço do anticorpo de deteção (Anti- IFN- γ conjugado com biotina) fornecido no *kit* diluído em reagente diluente. Seguiram-se as duas horas de incubação e um ciclo de lavagens, adicionou-se 100µl por poço de estreptavidina conjugada com a peroxidase em solução de reagente na proporção 1:200 (v/v). Esperaram-se os vinte minutos necessários de incubação e realizaram-se novas três lavagens. Após, este período, adicionou-se 100µl da solução substrato aos poços. A reação foi suspensa com a adição de 50 µl da solução de paragem e a absorvância foi medida utilizando o espectrofotómetro (Modelo 680, Bio-Rad) a 450nm. A determinação das concentrações da IFN- γ realizou-se através da equação da reta de calibração, pela Lei de Lambert-Beer. Os resultados foram apresentados, as médias e os desvios, utilizando o *software INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

3.6.5 Quantificação sérica do Fator de transformação do crescimento (TGF- β) em murganhos

Inicialmente adsorveu-se na placa de microtitulação (Costar NY, USA) anticorpos de captura (anti- TGF- β) a uma concentração de 4 $\mu\text{g/ml}$ diluída na solução de PBS e deixou-se em incubação durante a noite. Após, incubação procedeu-se a lavagem por três vezes com 300 μl /poço do tampão de lavagem. Seguidamente, adicionou-se 200 μL /poço do tampão de bloqueio, durante por uma hora e trinta minutos. Após este passo, e um ciclo de lavagem como descrita anteriormente, as amostras e o padrão foram adicionados nos poços, diluídos no reagente diluente. As amostras foram diluídas 1:10 e a curva-padrão foi realizada em triplicado, com padrão de proteína recombinante (TGF- β), numa diluição inicial de 2000 pg/ml e posteriormente, diluídas 1:2 até 31,3 pg/ml . Procedeu-se a duas horas de incubação, seguida de lavagem por três vezes. Adicionou-se 100 μL /poço do anticorpo de deteção (Anti- TGF- β conjugado com biotina) fornecido no *kit* diluído em reagente diluente com uma de concentração 75 ng/ml . Seguiram-se as duas horas de incubação e um ciclo de lavagens, adicionou-se 100 μl por poço de estreptavidina conjugada com a peroxidase em solução de reagente na proporção 1:200 (v/v). Esperaram-se os vinte minutos necessários de incubação e realizaram-se novas três lavagens. Após, este período, adicionou-se 100 μl da solução substrato aos poços. A reação foi suspensa com a adição de 50 μl da solução de paragem e a absorvância foi medida utilizando o espectrofotómetro (Modelo 680, Bio-Rad) a 450nm. A determinação das concentrações do TGF- β realizou-se através da equação da reta de calibração, pela Lei de Lambert-Beer. Os resultados foram apresentados, as médias e os desvios, utilizando o *software INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

3.6.6 Quantificação sérica do óxido nítrico (NO) pelo método de Griess em murganhos

Os níveis de óxido nítrico (NO) nos soros dos animais inoculados com as estirpes de *T. cruzi* foram determinados através do Método de Griess (1879); da reação colorimétrica de Griess pertencente ao *Griess Reagent System kit* (Promega). O método baseia-se na reta de calibração em placa de microtitulação de 96 poços (Brandplates®, Alemanha), com solução padrão de nitrito 100 M de NO.

Adicionou-se 50µl/poço da amostra diluída em água desmineralizada numa placa de 96 poços (Brandplates®, Alemanha). Seguidamente foi adicionado igual volume do reagente Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α -naftil-etilenodiamina diluída em água Milli-Q). A curva-padrão foi realizada em triplicado, utilizando solução Nitro, fornecido pelo fabricante, numa diluição inicial de 100µM até 1,56µM. A placa foi de seguida incubada, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após este período, adicionou-se 50µl da solução Ned (*N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride* a 0,1% em água) proveniente do *kit* e incubou-se a placa por 10 minutos, nas mesmas condições anteriormente descrita. Por fim, a densidade ótica foi lida em espectrofotómetro (Bio-Rad® Model 680) a 450 nm, conforme descrito no manual do fabricante. A determinação das concentrações de NO realizou-se através da equação da reta de calibração, pela Lei de Lambert-Beer. Os resultados foram apresentados, as médias e os desvios, utilizando o *software INSTAT* (Graphpad, San Diego, CA, USA).

4. Resultados e discussão

4.1 Determinação da toxicidade aguda em modelo murino

4.1.1 Dose Máxima Tolerada do BNZ-A, excipientes e das nano formulações do BNZ em murganhos

O ensaio da toxicidade aguda do BNZ demonstrou que após vinte e quatro horas da administração da dose de 100 mg/kg do BNZ-A e das nanoformulações, os murganhos não apresentaram nenhum sinal visível de toxicidade aguda, comparativamente com o grupo controlo, administrado apenas o PBS. Nenhuma mortalidade foi observada, nos respetivos grupos.

No que diz respeito à administração dos excipientes das nanoformulações do BNZ, após vinte e quatro horas, não foram observados sinais clínicos, nem mortalidade nos respetivos animais administrados com 100 mg/kg e 1000 mg/kg dos excipientes em relação ao grupo controlo, com PBS.

Contrariamente, os murganhos administrados com a dose acumulada de 1000 mg/kg de Abarax® (BNZ-A) e de algumas nanoformulações apresentaram sinais clínicos como icterícia urinária, despigmentação da pele, nódulos cutâneos, eritema e pele arrepiada (apêndice B. Apesar dos sinais clínicos visíveis da toxicidade, não foi registada nenhuma mortalidade associada aos efeitos tóxicos do BNZ vinte e quatro horas após a administração. Na tabela 4, seguidamente apresentada encontram-se descritos os principais sinais clínicos observados nos murganhos, durante as administrações dos compostos.

Tabela 4. Descrição dos sinais clínicos observados durante o estudo da toxicidade aguda nos murganhos administrados com 1000 mg/kg do, princípio ativo, do medicamento, excipientes e das nanoformulações do BNZ. Nenhuma mortalidade foi registrada após 24 horas de observações.

	Composição	Efeitos tóxicos observados
Princípio Ativo	BNZ	Despigmentação da pele, nódulos cutâneos, eritema e pele arrepiada e sonolência.
Medicamento	BNZ-A	Icterícia urinária, despigmentação da pele, nódulos cutâneos, eritema e pele arrepiada e sonolência.
Excipientes	BCDELS 59	Nenhum sinal foi observado.
	BCPCA12	
	NLC-sVacías	
	Ciclodextrina	
Nanoformulações	BCDELS 61	Sinais cutâneos: eritema e pele arrepiada, contrariamente ao sucedido e sonolência.
	BCPCA11	Sinais cutâneos: arrepios, apatia e sonolência em comparação com os restantes grupo. Nenhuma mortalidade foi registrada.
	NLC-S 20% BNZ	Pele arrepiada.
	BNZ/CD (12%)	Nenhum sinal foi observado.
	BNZ/CD (24%)	Os sinais como <i>stress</i> , arrepios e a despigmentação da pele foram observados.
	BNZ/CD (50%)	Os sinais como <i>stress</i> , arrepios e a despigmentação da pele.

O estabelecimento de um conjunto mínimo de critérios e itinerários de decisão para garantir resultados confiáveis que podem conduzir à identificação de novos compostos, a serem testados em ensaios pré-clínicos, torna-se um passo crucial no desenvolvimento de um processo de triagem de novos fármacos. A determinação, demonstração e avaliação da eficácia dos compostos, com actividade anti-*T. cruzi*, em ensaios pré-clínicos, nos procedimentos *in vivo*, devem seguir os requisitos como: (i) determinação da toxicidade aguda em modelos murinos [dose máxima tolerada (DMT)], (ii) redução da parasitemia na fase aguda e critérios de corte para seleção de compostos, (iii) marcadores parasitológicos na fase aguda e os critérios de corte para seleção de compostos (Romanha, et al., 2010).

A toxicidade oral aguda é usualmente definida como as mudanças adversas que ocorrem imediatamente ou em um período curto de tempo após a exposição a substância ou ainda, os efeitos adversos que ocorrem dentro de curto período de tempo da administração de uma única dose de substância ou múltiplas doses dentro de 24 horas (Walum, 1998). Os estudos da toxicidade aguda a partir da determinação da dose máxima tolerada têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida (Anvisa, 2013). Deste modo, a dose máxima tolerada *in vivo* é recomendada como primeiro passo para excluir compostos que são tóxicos para o hospedeiro vertebrado.

A formulação do BNZ utilizada no estudo, Abarax® (BNZ-A) atua através do aumento da produção metabólitos que modificam macromoléculas, conduzindo à destruição do parasita. O pico da concentração plasmática do fármaco situa-se entre 3-4 horas em voluntários saudáveis, após a administração de uma dose única do comprimido de 100 mg (ELEA, 2012). A biodisponibilidade de um comprimido de 100 mg é 92%, sendo extensivamente metabolizado e apenas 5% da dose não modificado é excretada na urina (ELEA, 2012). Entretanto, estudos clínicos da carcinogénese em murganhos administrados 8 mg de peso corporal do BNZ-A durante 60 dias, demonstraram aumento da frequência de linfomas (ELEA, 2012). Portanto faz-se necessário, uma nova perspectiva no tratamento da doença de Chagas baseado na facilidade em obter diversas nano formulações, cujas modificações estruturais, podem elevar a eficácia antiparasitária.

Estas nanoformulações contribuem para a melhoria da biodisponibilidade por aumento da penetração celular e proporcionam a libertação do fármaco no sítio de ação desejado, eliminando ou minimizando os efeitos colaterais da terapêutica convencional (Pimentel, et al., 2007; El-Tonsy, 2010). Presentemente o processo da descoberta e do desenvolvimento de novos fármacos engloba várias estratégias e uma combinação de métodos tradicionais e modernos, de natureza intrinsecamente multi e interdisciplinar, integrado na especialidade como a Química, Biologia, Biomedicina, Farmacologia, Bioquímica, Bioinformática, Biotecnologia entre outras (Stuart, et al., 2008; Dias & Dessoy, 2009).

Os excipientes, lipossomas e ciclodextrina, bem como as nanoformulações testadas no âmbito deste estudo não demonstraram toxicidade, sendo bem tolerado nos murganhos. Como previsto, pode ser obtida a diminuição dos efeitos tóxicos através da melhoria da farmacocinética e farmacodinâmica destas nanoformulações uma vez que no processo da preparação do fármaco ocorre a diminuição da dose total. Os possíveis efeitos tóxicos agudos foram observados no caso do BNZ princípio ativo e o medicamento, em doses 1000 mg/kg e da nanoformulação BNZ/CD 50%. Esta nano formulação contém maior percentagem do BNZ comparativamente com as outras, portanto durante a administração, espera-se em teoria, maior toxicidade em relação às nano formulações contendo 12% e 24% respetivamente do BNZ.

O desenvolvimento de um medicamento é um processo dinâmico que envolve a troca de informações obtidas em estudos clínicos e não clínicos. Por isso, não se recomenda a adoção de procedimentos rígidos e pormenorizados para a submissão de estudos toxicocinéticos. A necessidade de obter dados toxicocinéticos e de avaliar a exposição em cada estudo individual de toxicidade deve ser baseada numa abordagem flexível e estabelecida de forma individualizada, garantindo-se a produção de informações suficientes para avaliar os riscos e a segurança da exposição de seres humanos. Entretanto, as diferenças na toxicidade da espécie estão frequentemente relacionadas com diferenças no metabolismo e eliminação de compostos. A compreensão de tais diferenças, através de estudos enzimáticos por exemplo, é extremamente importante na avaliação da segurança dos compostos em relação à extrapolação de toxicidade dos animais ao ser humano e, portanto, a avaliação dos riscos (Ode, et al., 2011).

4.2 Biomarcadores da Função Hepática

Durante o processo de biotransformação do BNZ, os metabolitos quimicamente reativos formados estão intimamente ligados com a gravidade dos efeitos tóxicos do fármaco (Maya, et al., 2007; Apt, 2010; Pérez-Molina, et al., 2012).

Neste intuito, pretendeu-se reportar o possível dano hepático causado durante a administração do Abarax® (BNZ-A) e das nano formulações do BNZ bem como os respetivos excipientes. Para tal, alguns parâmetros bioquímicos foram investigados como índices úteis no estudo da toxicidade aguda. Os parâmetros bioquímicos como a quantificação de enzimas como Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) foram utilizados como índices uteis da toxicidade hepática.

A análise dos resultados da quantificação da atividade enzimática dos biomarcadores hepáticos vinte e quatro horas após administração de 100 mg/kg e 1000 mg/kg do Abarax® (BNZ-A) indicou um aumento da atividade enzimática da ALT e do AST em comparação com o grupo controlo, administrado apenas com PBS (figura 7). O aumento da dose administrada conduziu ao aumento dos níveis séricos do ALT e do AST, 3 vezes superior, nos grupos administrados com 1000 mg/kg do fármaco comparativamente ao grupo controlo, administrado com PBS. Tendo-se verificado diferenças significativas na atividade apenas do AST nos animais administrados com 100 mg/kg comparativamente aos administrados com 1000 mg/kg do BNZ-A.

Por outro lado, no estudo realizado 5 dias consecutivos, a atividade enzimática da ALT e AST também aumentaram com administração de 100 mg/kg/ dia do BNZ-A e do princípio ativo (BNZ-PA) em comparação ao grupo controlo, PBS (figura 8). Verificou-se um aumento da ALT mais acentuada, aproximadamente 2 vezes, no grupo administrado o BNZ-PA em comparação com o BNZ-A e o grupo controlo (figura 8A). A atividade da AST aumentou nos grupos administrados com os fármacos em comparação com grupo controlo (figura 8B). No caso do BNZ-PA, o aumento foi de aproximadamente 2 vezes, em relação ao grupo controlo. No entanto a atividade da AST não demonstrou diferença significativa entre os grupos tratados com BNZ-A e BNZ-PA (figura 8B).

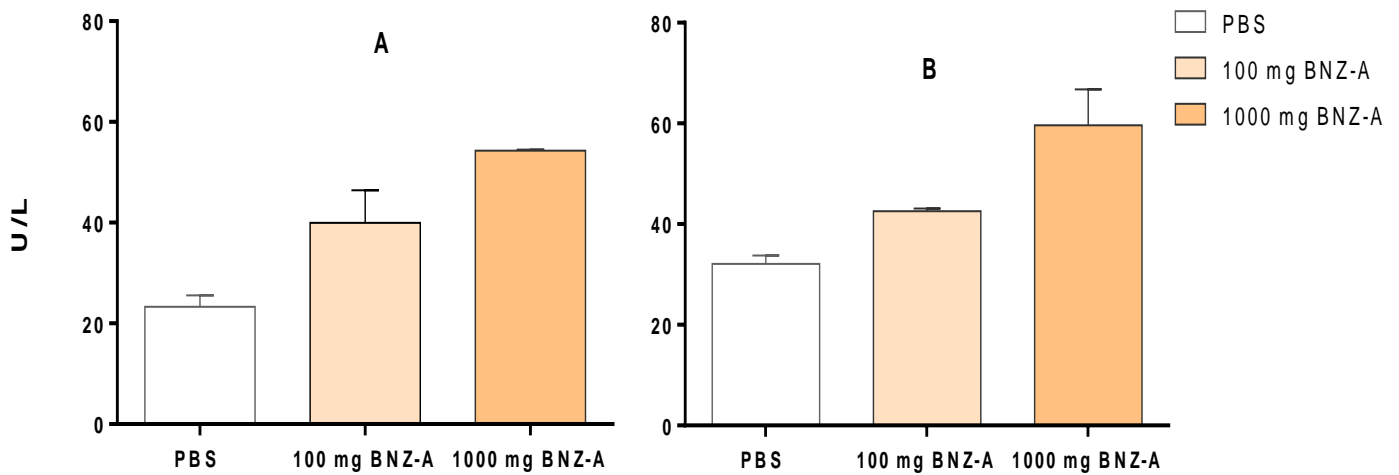


Figura 7. Atividade da alanina aminotransferase [ALT, A] e apartato aminotransferase [AST, B]. A atividade enzimática nos soros 24 horas após a administração de 100 mg/kg e 1000 mg/kg do BNZ-A. Todos os valores foram expressos como a média e desvio padrão. (*) Indica a diferença significativa ($p < 0,01$) da atividade enzimática no grupo administrado com o fármaco em relação ao grupo controle, administrado com PBS. (#) Quando comparado o grupo administrado 100 mg/kg do BNZ-A com o grupo 1000 mg/kg existe diferença significativa ($p < 0,01$) para $\alpha=0,05$ (Apêndice C).

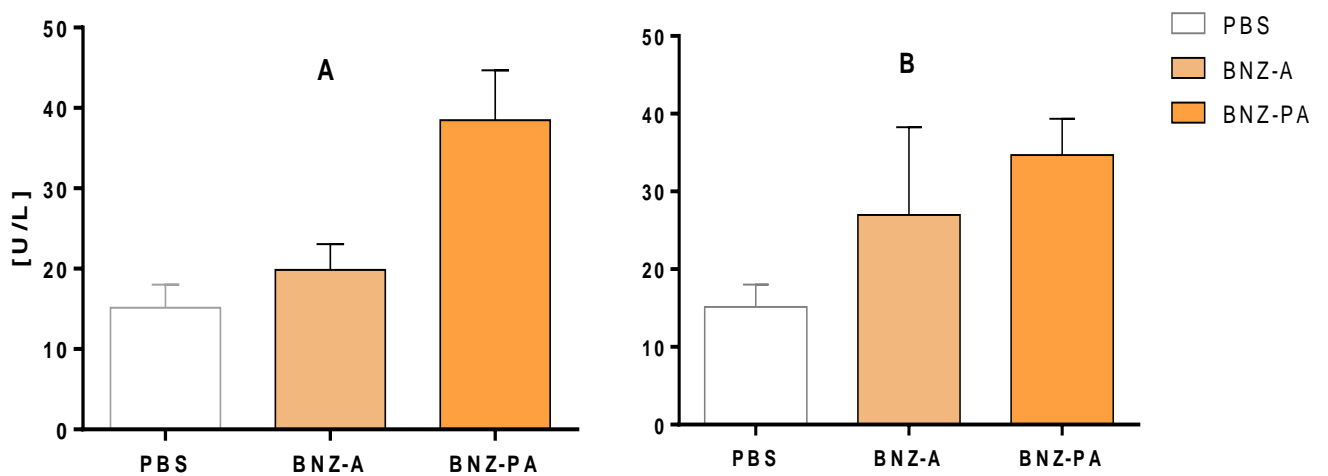


Figura 8. Atividade da alanina aminotransferase [ALT, A] e atividade da apartato aminotransferase [AST, B]. A atividade enzimática nos soros dos animais administrados com 100 mg/kg diariamente durante cinco dias. (*) Indica a diferença significativa ($p < 0,0002$) da atividade enzimática no grupo administrado com fármaco em relação ao grupo controle, administrado com PBS. (#) Existe diferença significativa ($p < 0,0002$) da atividade enzimática no grupo administrado BNZ-A quando comparado com o grupo administrado com BNZ-PA (Apêndice C).

4.2.1 Biomarcadores da função hepática 24 horas após administração dos excipientes e das nano formulações do BNZ

Não se registou aumento nos níveis da atividade enzimática da ALT e AST nos murganhos administrados com 1000 mg/kg dos excipientes das nanoformulações do BNZ, **BCDEL-S59** (S59), **BCPA12** (A12) **NLC-S Vacías** (NLC-S-V), comparativamente com o grupo controlo, administrado com PBS (figura 9 e 10). Por outro lado, os animais administrados com BNZ-A apresentaram um aumento nos níveis da atividade da ALT e AST em comparação com grupos administrados excipientes e PBS (figura 9 e 10).

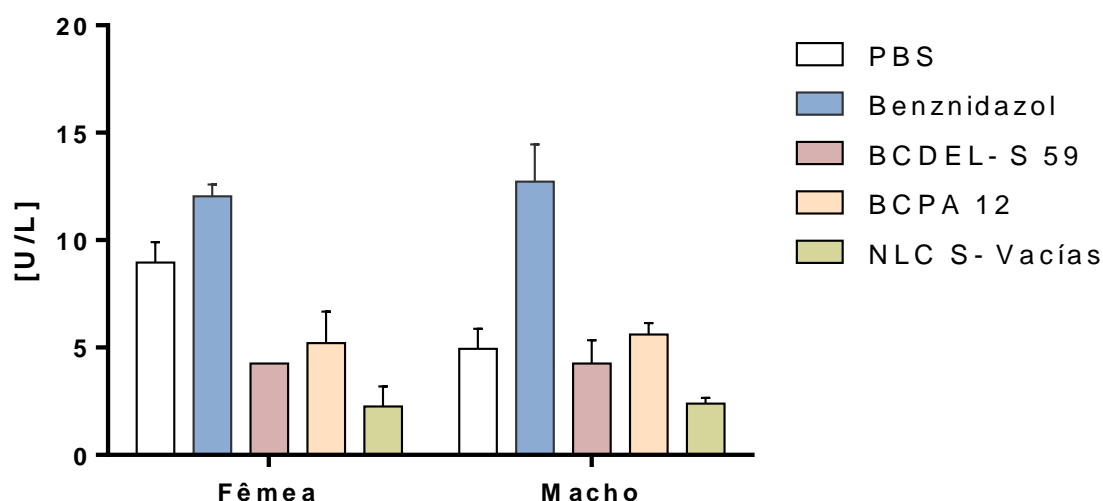


Figura 9. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] 24 horas após a administração dos excipientes das nanoformulações do BNZ. A dose acumulada foi 1000 mg/kg dos excipientes das nanoformulações do BNZ, designadas S59, A12 e NLC-S-V. O BNZ-A e o PBS foram utilizados como controlos. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2wayANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos administrados os excipientes NLC-S V e S59 em comparação com PBS. Também se verificou diferença estatisticamente significativa nos animais administrados com BNZ-A em comparação com os excipientes e com PBS. Os restantes excipientes não se verificaram diferença significativa em comparação com o PBS (Apêndice C).

A atividade enzimática da AST foi idêntica nos grupos administrados com excipientes, **BCDEL-S59 (S59)**, **BCPA12 (A12)** e **NLC-S Vacías (NLC-S-V)** comparativamente ao grupo administrado com PBS (figura 10). O aumento da actividade sérica da AST, aproximadamente 2 vezes superior, foi desencadeado apenas nos grupos administrados com BNZ-A quando comparados com os excipientes e PBS (Figura 10).

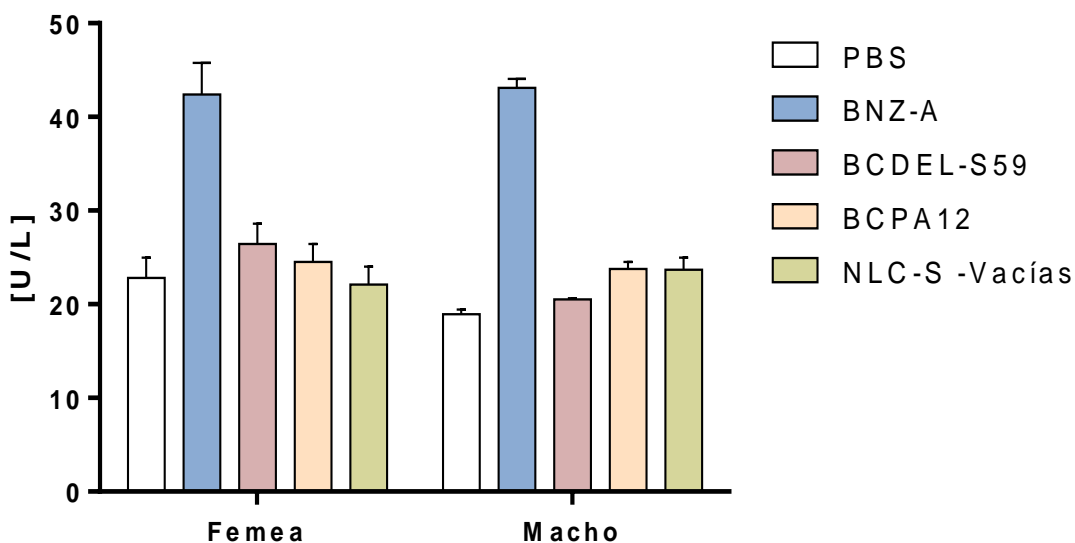


Figura 10. Atividade da apartato aminotransferase [AST] após a administração dos excipientes das nanoformulações do BNZ. A dose acumulada foi 1000 mg/kg por peso de animal dos excipientes das nano formulações do BNZ, designadas S59, A12 e NLC-S-V. Como controlos foram utilizados o BNZ-A e o PBS. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2wayANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos administrados os excipientes em comparação com BNZ-A. Não houve diferenças estatisticamente significativas, da atividade enzimática, entre grupos administrados excipientes em comparação com o PBS (Apêndice C).

A determinação da actividade enzimática após a administração das nanoformulações BCDEL-S61 (**S61**), BCPA11 (**A11**) e NLC-S 20% BNZ (**NLC-S**) não indicou nenhum aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST em relação ao grupo administrado com PBS (figura 11 e 12). Nos grupos administrados com as nano formulações A11 e NLC-S, a atividade enzimática foi idêntica ao grupo controlo, administrado com o PBS (figura 11).

A nanoformulação S-61 desencadeou um aumento na atividade das ALT, apenas no grupo das fêmeas, quando comparado com o grupo controlo (figura 11). Verificou-se um aumento da atividade enzimática nos grupos administrados com BNZ-A, tanto nas fêmeas como nos machos, em comparação com os restantes grupos administrados com as nanoformulações e PBS (figura 11).

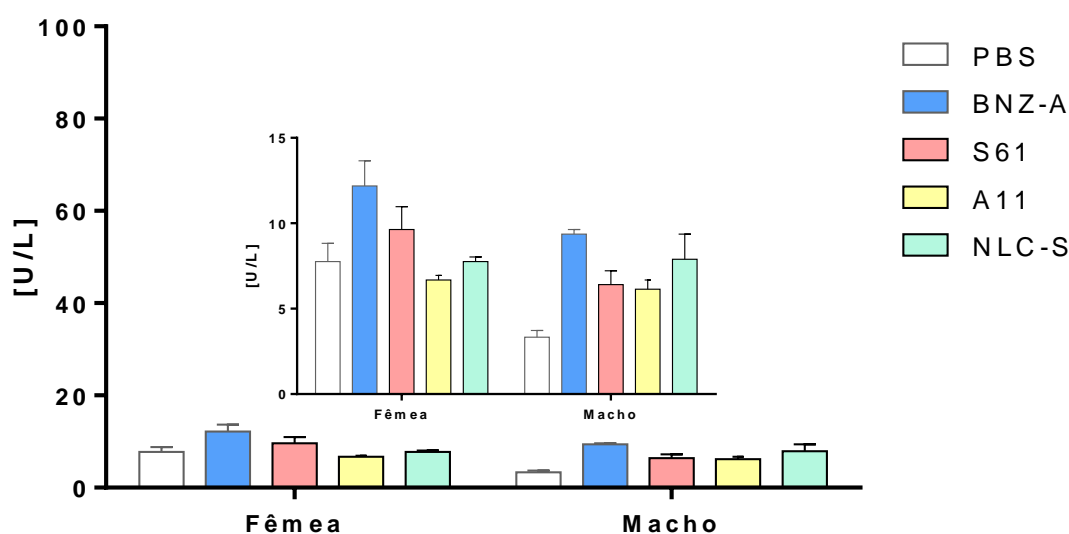


Figura 11. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] 24 horas após a administração com 1000 mg/kg das nanoformulações do BNZ, designadas S61, A11 e NLC-S 20%. Como controlos foram utilizados o BNZ-A e PBS. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2way ANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos administrados com as nanoformulações, **A11 e NLC-S 20%** em comparação com BNZ-A. Não se verificou diferença estatisticamente significativa nos animais administrados com BNZ-A em comparação com a nanoformulação S61. Em comparação com o PBS as nanoformulações A11 e **NLC-S 20%** não demonstraram diferenças estatisticamente significativas no aumento da atividade enzimática (Apêndice C).

As nano formulações do BNZ, BCDEL-S61 (**S61**), BCPA11 (**A11**) e NLC-S 20% do BNZ (**NLC-S**) não provocaram um aumento na atividade enzimática com diferenças estatisticamente significativas da AST em comparação com o grupo controlo, administrado com PBS (figura 12).

Nos grupos administrados BNZ-A verificou-se um aumento da atividade enzimática em comparação com os animais administrados com as nanoformulações e com PBS. As nanoformulações foram bem toleradas, uma vez que os níveis séricos da ALT e AST dos animais foram inferiores em comparação com os animais onde foram administrados o BNZ-A (figura 11 e 12).

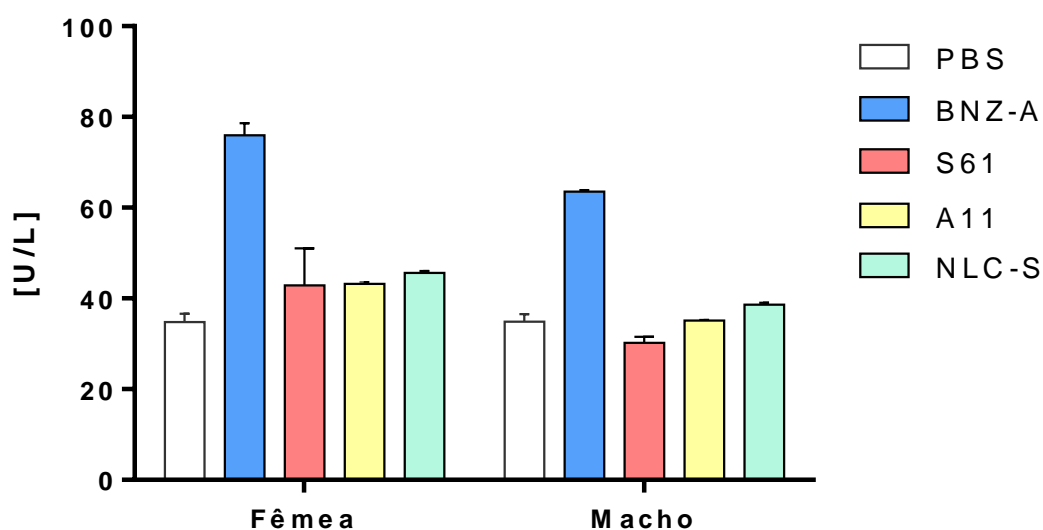


Figura 12. Atividade da apartato aminotransferase [AST] nos soros dos animais, 24 horas após a administração com 1000 mg/kg das nanoformulações do BNZ, designadas S61, A11 e NLC-S. Como controlos foram utilizados o BNZ-A e PBS. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2wayANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos administrados as nano formulações, S61, A11 e NLC-S 20% em comparação com BNZ-A. Existe diferenças significativas entre os grupos administrados BNZ-A em comparação com os grupos administrados as nanoformulações. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a atividade enzimática das nano formulações em comparação com o PBS (Apêndice C).

A atividade enzimática da ALT e AST das nanoformulações complexadas com a ciclodextrina designada, BNZ/CD 24% e BNZ/CD 50 % provocaram o aumento dos níveis séricos da ALT em comparação com grupo controlo, administrado com água (figura 13). Estas nanoformulações elevaram os níveis séricos da enzima, aproximadamente, 2 vezes superior.

Nos grupos administrados BNZ/CD 12% a atividade enzimática foi semelhante comparativamente ao grupo controlos administrados e o excipiente ciclodextrinas (CD) e água. Ainda na figura 13, as nanoformulações, BNZ/CD 24% e BNZ/CD 50 %, apresentaram idênticas ao BNZ. As nanoformulações complexadas com ciclodextrina designada, BNZ/CD 24% e BNZ/CD 50 % provocaram um aumento dos níveis séricos da ALT (duas vezes superior) em comparação com grupos controlo, administrado com água (figura 13). Nos grupos administrados com BNZ/CD 12% a atividade enzimática foi semelhante ao grupo controlos administrados com excipiente ciclodextrinas (CD) e água.

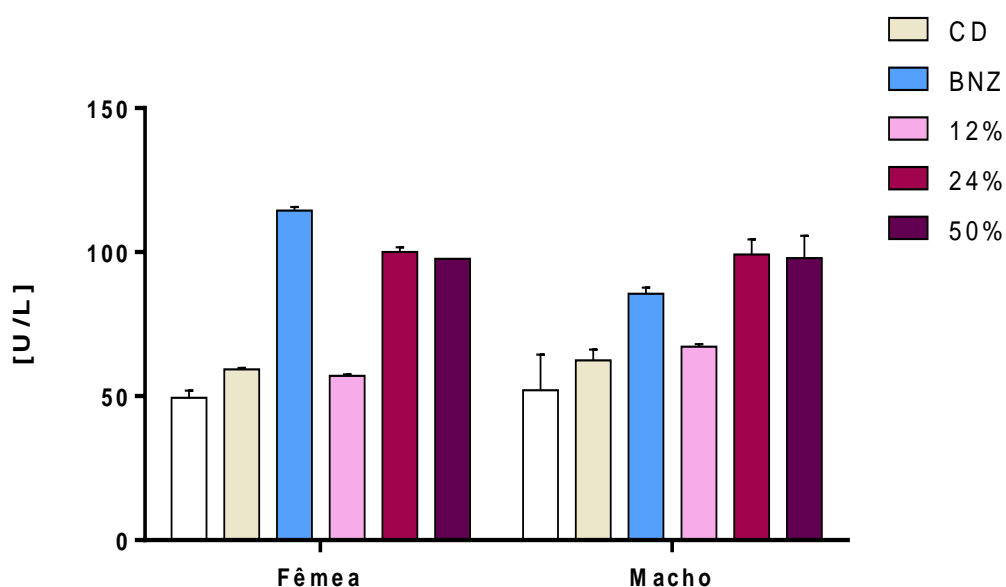


Figura 13. Atividade da alanina aminotransferase [ALT] nos soros dos animais, vinte e quatro horas após a administração com 1000 mg/kg das nano formulações do BNZ, designadas BNZ/CD 12% (12%), BNZ/CD 24% (24%) e BNZ/CD 50 % (50%). Como controlos foram utilizados, o excipiente, Ciclo dextrina (CD), BNZ-PA (BNZ) e Água. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2wayANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos fêmeas administrados as nano formulações 12%, 24%, 50% em comparação com BNZ. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a atividade enzimática das nano formulações 24% e 50%, nos machos em comparação com BNZ. A nanoformulação 12% não demonstrou diferenças significativas em comparação com os administrados água e CD (Apêndice C).

A atividade da enzima AST aumentou nos grupos administrados com as nanoformulações complexadas com a ciclodextrina BNZ/CD24% (**24%**) e BNZ/CD 50 % (**50%**) em comparação com os grupos controlos, administrados com o excipiente, ciclodextrina (CD) e água (figura 14).

Os grupos administrados com BNZ/CD 12% (**12%**) apresentaram perfil de atividade enzimática idêntico aos grupos controlos, administrados o excipiente, CD e água. Na figura 14, o aumento dos níveis séricos da AST foi aproximadamente duas vezes superior, das nanoformulações 24% e 50 % quando comparadas com 12%.

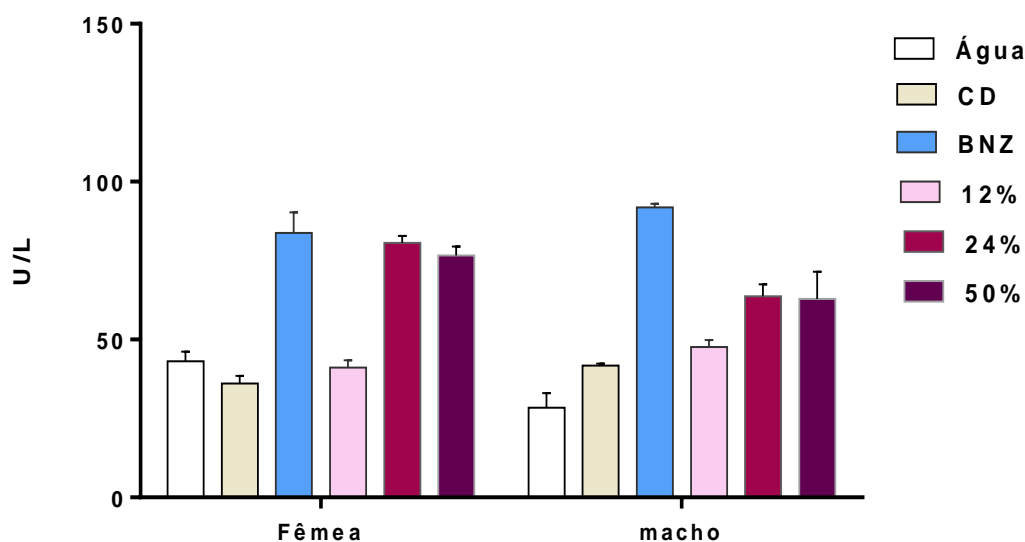


Figura 14. A Atividade da apartato aminotransferase [AST] vinte e quatro horas após a administração com 1000 mg/kg das nano formulações do BNZ, designadas BNZ/CD 12% (12%), BNZ/CD 24% (24%) e BNZ/CD 50 % (50%). Como controlos foram utilizados o excipiente, ciclo dextrina (CD), BNZ-PA (BNZ) e água. Os dados foram analisados pelo método estatístico 2wayANOVA ($\alpha=0,05$) tendo-se verificado diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre os grupos fêmeas administrados as nanoformulações 12%, 24%, 50% em comparação com BNZ. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a atividade enzimática nos animais (apenas nos machos) administrados com as nanoformulações 24% e 50%, em comparação com BNZ. O grupo administrado com a nanoformulação 12% não apresentou diferenças significativas em comparação com os grupos administrados água e CD (Apêndice C).

O fígado desempenha um papel importante no processo de eliminação dos fármacos e este processo envolve vários sistemas enzimáticos para a transformação química do mesmo (Ode *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2012). As perturbações decorrentes da terapêutica afetam diretamente a capacidade de desintoxicação no fígado, como consequência são provocados danos pelas toxinas libertadas por vários elementos do órgão. As transaminases, ALT e AST, catalisam a conversão da alanina e aspartato em oxaloacetato e piruvato respetivamente e são parâmetros úteis para a avaliação da função hepática. Quando certos tipos de células são danificadas, ocorre a libertação destas enzimas para a circulação sanguínea. A elevação da concentração da enzima ALT ocorre apenas no citoplasma das células hepáticas, o que torna o seu aumento mais específico da lesão hepática. AST é encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado e é utilizada como parâmetro para a avaliação da lesão hepatocelular (Chaves *et al.*, 2012).

Entretanto é necessário ressaltar que fatores como o género, a idade, bem como as condições de manutenção de biotérios e a própria extração da amostra influencia os parâmetros bioquímicos. Perante estes fatos é imprescindível que cada laboratório ou biotério estabeleça o conjunto de valores de referência dos animais saudáveis. Como tal, nos estudos das avaliações farmacológicas e toxicológicas, os valores dos animais não tratados são dados importantes servindo de valores de referência (Melo *et al.*, 2012). Para tal, neste estudo os valores dos controlos negativos, os grupos administrados com PBS e os administrados com água foram utilizados como valores de referência.

O aumento das transaminases verificadas neste estudo pode indicar o possível efeito tóxico do BNZ. Estes dados sugerem que o aumento da atividade enzimática está associada a um aumento da concentração do fármaco analisado neste estudo, uma resposta dose-dependente. Neste estudo observou-se menor efeito tóxico do Abarax® (BNZ-A) em comparação com o princípio activo, tendo em consideração que o aumento da atividade enzimática provocado por este foi significativamente inferior ao aumento da actividade enzimática provocada pelo princípio activo. Este facto deve-se a menor concentração do princípio activo incorporado no medicamento.

Os excipientes e as nano formulações, A11, S61, NLC-S 20% e 12%, utilizados neste estudo, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas na atividade enzimática da ALT e AST em comparação com os grupos controlos, administrado com PBS e água. Deste modo, este resultado sugere, que os excipientes e as nano formulações, mesmo em concentrações elevadas (1000 mg/kg), conduziram a ausência de danos nas células hepáticas ou efeitos tóxicos agudos decorrentes da administração.

Por outro lado, as nano formulações 24% e 50% (1000 mg/kg) aumentaram a atividade enzimática da ALT e AST significativamente, comparado com o controlo administrado água. Este aumento foi semelhante os animais administrados com a mesma concentração do BNZ-PA. A análise estatística não demonstrou diferenças significativa destas nanoformulações em relação ao BNZ-A, o que pode indicar toxicidade aguda idêntica ao do medicamento atualmente em uso.

Sabe-se que BNZ pode ter o potencial de induzir a toxicidade, através de alterações das células hepáticas, isto baseia-se no fato de serem produzidos metabólitos reativos durante o processo de biotransformação do fármaco no fígado, que conduzem a processo de inflamação ou danificação das células do fígado desta forma aumentando as concentrações séricas de enzimas como as transaminases, ALT e AST (Apt, 2010). Embora houvesse aumento da atividade das enzimas ALT e AST nos grupos administrados com as nanoformulações 12% e 24%, os valores nunca foram superiores ao dos grupos administrado com o BNZ-A em uso atualmente e do princípio ativo do BNZ. Este resultado fortalece possível efeito tóxico mais acentuado do BNZ princípio sobre as células do fígado em comparação com as nanoformulações do BNZ.

4.3 Ensaio *in vitro* da suscetibilidade ou resistência ao BNZ das três estirpes de *T. cruzi*

Os resultados do estudo *in vitro* da atividade tripanocida do princípio ativo do BNZ sobre as formas epimastigotas das estirpes, Bolívia, Y e QMM5 de *T. cruzi*, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII respectivamente (figura 15, 16 e 17). Noventa e seis horas após a incubação, as estirpes Bolívia e QMM5 com o BNZ apontaram sensibilidade ao fármaco a partir concentração 1 µg/ml. Tendo-se verificado cerca 100% da citotoxicidade, esta concentração (figura 14 e 16). Para a mesma concentração do fármaco a estirpe Y (TcII) exibiu de aproximadamente 60 % de citotoxicidade (figura 15).

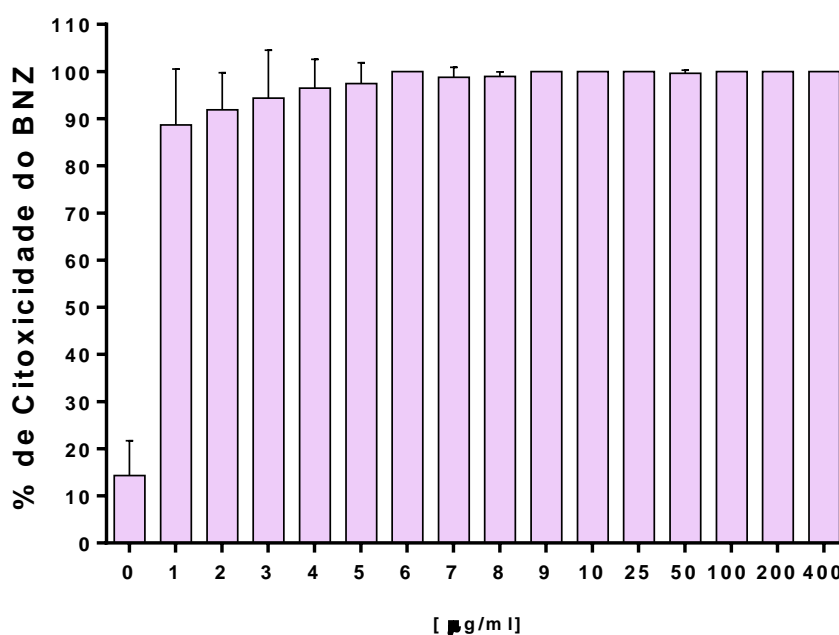


Figura 15. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe Bolívia, pertencente ao TcI. Após 96 horas da incubação com diferentes concentrações do BNZ-PA (µg/ml). O ponto zero, foi utilizado como controlo negativo, poços contendo parasitas onde foi adicionado o diluente do fármaco, DMSO.

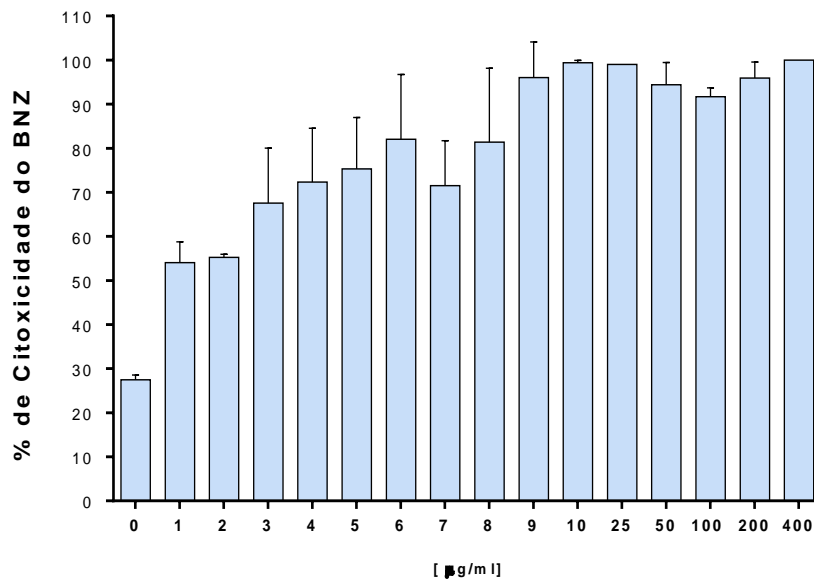


Figura 16. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe Y, pertencente ao TcII. Após noventa e seis horas da incubação com diferentes concentrações do BNZ ($\mu\text{g/ml}$). O ponto zero, foi utilizado como controlo negativo, poços contendo parasitas onde foi adicionado o diluente do fármaco, DMSO.

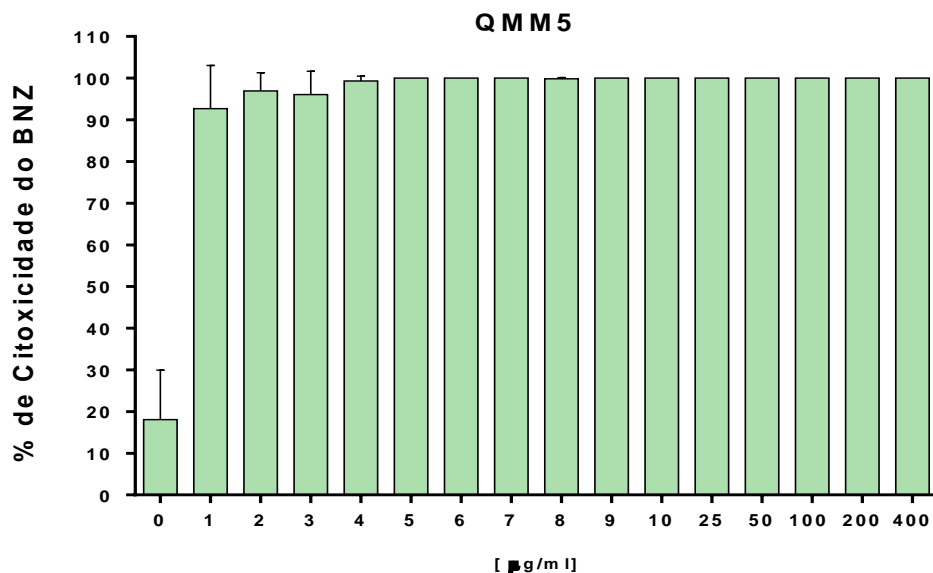


Figura 17. Avaliação da citotoxicidade do BNZ sobre as formas epimastigotas a estirpe QMM5, pertencente ao TcIII. Após 96 horas da incubação com diferentes concentrações do BNZ ($\mu\text{g/ml}$). O ponto zero, foi utilizado como controlo negativo, poços contendo parasitas onde foi adicionado o diluente do fármaco, DMSO.

O ensaio colorimétrico MTT foi utilizado para determinação da viabilidade de *Trypanosoma cruzi* após exposição ao BNZ-PA. Os resultados obtidos, para a estirpe Y foram semelhantes ao ensaio de otimização realizado por Muellas e Serrano, 2000. Baseado no perfil da citotoxicidade verificou-se que Bolívia e QMM5 apresentaram maior sensibilidade ao BNZ em comparação com a estirpe Y.

A dificuldade de encontrar uma substância capaz de erradicar o parasita, nas duas fases da doença, pode estar relacionada diretamente com a heterogeneidade das diferentes populações de *T. cruzi*, que apresentam diferenças na morfologia, na virulência e patogenicidade, na constituição antigênica, nas propriedades bioquímicas e na capacidade de evasão à resposta imune do hospedeiro (Fernandes *et al.*, 1998; Tibayrenc & Ayala, 2002). Alguns estudos relataram que isolados de parasitas pertencentes ao DTU I (TcI) foram mais resistentes à BNZ do que outros DTUs. No entanto outros não mostraram nenhuma correlação entre a sensibilidade *in vitro* aos fármacos e grupos de *T. cruzi* (Moreno *et al.*, 2010). Neste estudo a estirpe Y (TcII) apresentou maior IC 50 em comparação com as estirpes Bolívia (TcI) e QMM5 (TcIII). Não foi possível determinar o IC 50 das estirpes Bolívia e QMM5, entretanto o perfil obtido não permite concluir efetivamente a sensibilidade destas estirpes ao BNZ. A explicação seria a de que as formas epimastigotas não são infecciosa e sua suscetibilidade a BNZ não reflete a suscetibilidade das outras fases (tripomastigotas e amastigotas). Por outro lado, o sucesso da terapêutica aparenta depender da interação entre o parasita e acesso intracelular ao fármaco, dependendo da acumulação em diferentes tecidos e níveis no plasma. Como tal, no presente estudo este ensaio *in vitro* não permite a previsão do resultado terapêutico.

O próximo passo foi o estabelecimento do modelo murino da infecção com *T. cruzi* com as estirpes Bolívia, Y e QMM5. Tendo como objetivo posterior a realização do estudo sobre compreensão da BZ atividade tripanocida sobre estas estirpes e modulação das nano formulações do BNZ na doença de Chaga.

4.4 Estudo da infetividade das estirpes *T. cruzi* em modelo murino

Com a finalidade de estabelecer o modelo murino da infeção pelo *T. cruzi* e seguidamente testar a atividade terapêutica e toxicológica do BNZ e das nanoformulações, realizou-se o ensaio da infetividade *in vivo* das estirpes Bolívia, Y e QMM5 pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII, respetivamente. Neste estudo realizou-se o acompanhamento dos aspetos da resposta imune, incluindo os parâmetros inflamatórios no decorrer da infeção, 30, 55 e 70 dias pós inoculação com as três estirpes de *T. cruzi*, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII, em modelo murino. Como controlo positivo utilizou-se um “pool” de soros de animais, imunizados com a estirpe Y onde foram produzidos anticorpo policlonal anti-*T. cruzi* (figura18). Como controlos negativos foram utilizados soros de animais saudáveis (n=3).

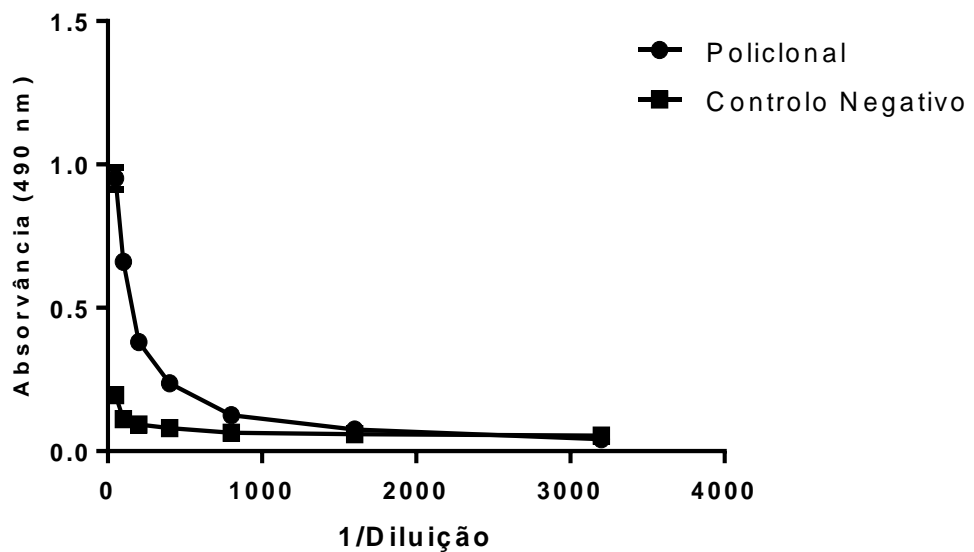


Figura 18. Determinação de anticorpos anti-*T. cruzi* pelo método de *ELISA* indireto para a pesquisa de IgG em soros de *Mus musculus* (*Balb/c*). Os animais foram imunizados com extrato do antigénio de *T. cruzi* (Y) e as amostras foram recolhidas 70 dias após a primeira imunização. Fez-se uma diluição seriada a partir de uma primeira diluição de 1:100 até a diluição de 1:3200.

Os resultados indicaram, que todos os soros dos animais utilizados na experiência da inoculação com as diferentes estirpes de *T. cruzi*, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII, apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi* (figura 19). A produção destes anticorpos aumentou com o decorrer do tempo das infecções, ou seja, verificou-se um aumento progressivo do anticorpo IgG anti-*T. cruzi*, 30, 55 e 70 dias pós inoculação. O grupo TcIII demonstrou menor perfil da produção de anticorpos em comparação com os restantes grupos (figura 19). O perfil do anticorpo IgM anti-*T. cruzi* também foi utilizado na caracterização da resposta humoral. Verificou-se um decréscimo de IgM em todos os grupos, trinta dias após infecção, ou seja, a diminuição com o decorrer do tempo da infecção. Esta diminuição da reatividade foi mais acentuada no grupo TcIII (figura 20).

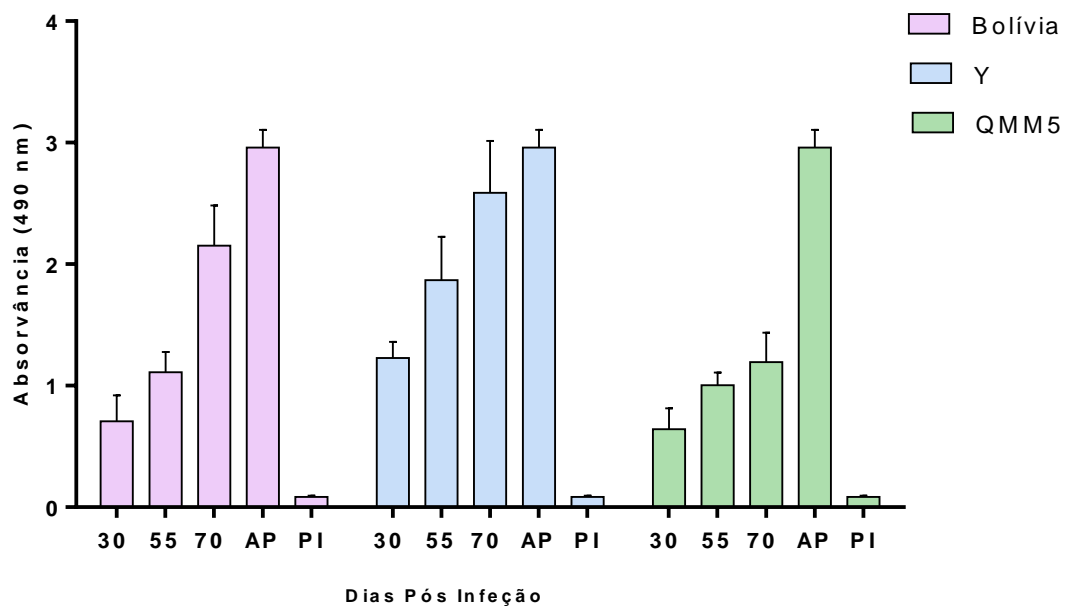


Figura 19. Determinação de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram recolhidas 30, 55 e 70, dias após a infecção com as estirpes de *T. cruzi*, Bolívia, Y e QMM5 pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII, respetivamente. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos e soros policlonais foram utilizados como controlo positivos (AP). Utilizou-se uma diluição de 1:400 na análise de todas as amostras.

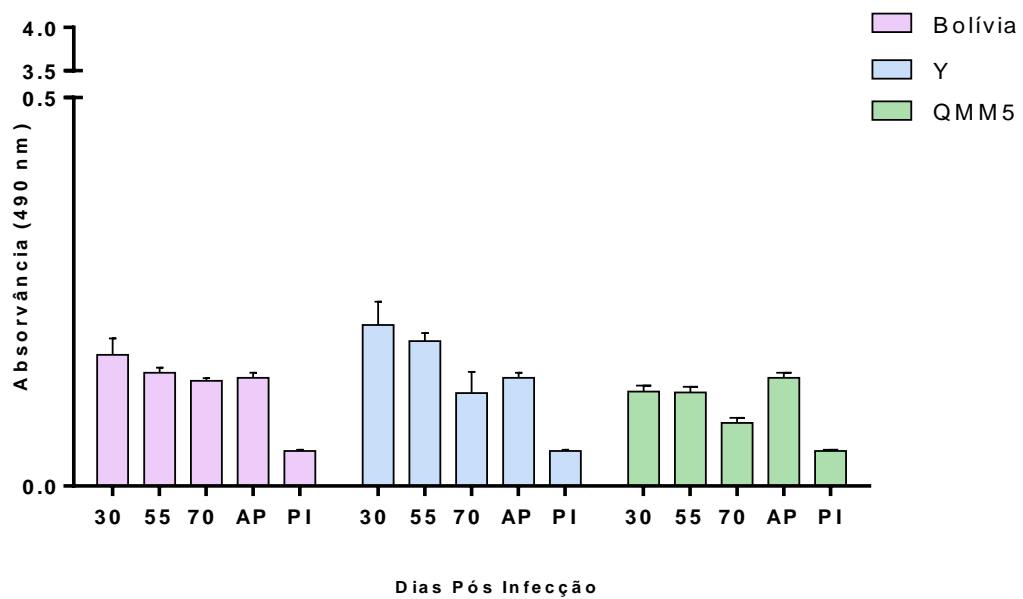


Figura 20. Determinação de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram recolhidas 30, 55 e 70, dias após a infecção com as estirpes de *T. cruzi*, Bolívia, Y e QMM5 pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII, respetivamente. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos e soros policlonais foram utilizados como controlo positivos (AP). Utilizou-se uma diluição de 1:400 na análise de todas as amostras.

Os anticorpos específicos desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro vertebrado contra o *T. cruzi* contra as formas tripomastigotas circulantes e presentes nos tecidos. Neste propósito, pesquisou-se a presença das subclasses dos anticorpos do tipo IgG, IgG1, IgG2a e IgG3. Todos os murganhos inoculados com as estirpes Bolívia, Y e QMM5 aumentaram os títulos de IgG1- anti *T. cruzi* com o decorrer do tempo da infecção (figura 21). O perfil da produção de anticorpos foi semelhante nos grupos inoculados com as estirpes Bolívia e Y, tendo-se verificado maior produção com a cronicidade da infecção, setenta dias após a infecção (figura 21). Ainda na figura 21 grupo inoculado com a estirpe QMM5 (TcII) apresentou menor títulos de anticorpos, comparativamente com as restantes estirpes.

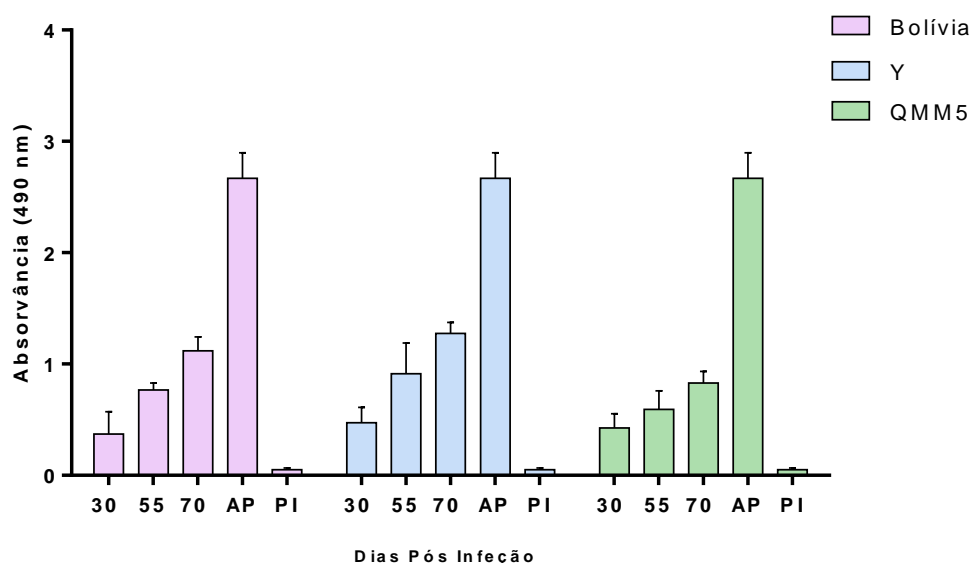


Figura 21. Determinação de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de murganhos, *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram colhidas 30, 55 e 70 dias após a infecção com diferentes estirpes de *T. cruzi*, Bolívia, Y e QMM5 pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII respectivamente. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos e soros policlonais foram utilizados como controlo positivos (AP). Utilizou-se uma diluição de 1:400 na análise de todas as amostras.

Neste estudo, foi pesquisada a subclasse IgG2a. Verificou-se que anticorpos IgG2a anti-*T. cruzi* aumentou ao longo dos dias da infecção em todos os grupos, comparativamente com o pré-imune (figura 22). Ainda na figura 22, o aumento da produção do anticorpo foi mais acentuada setenta dias após a infecção. Os níveis de anticorpos IgG3 anti-*T. cruzi*, aumentaram com o avançar dos dias após a inoculação em todos os grupos inoculados com as estirpes Bolívia, Y e QMM5 (figura 23). Setenta dias após a infecção, os murganhos apresentaram maior título de IgG3, demonstrando a presença significativa deste anticorpo na fase mais avançada da infecção. Na figura 23, apesar de ocorrer o aumento ao longo do tempo da infecção, os títulos de IgG3 foram praticamente ausentes ou presente, em níveis muito baixos, no grupo infetado com a estirpe QMM5 comparativamente com restantes grupos infetados com as estirpes Bolívia e Y.

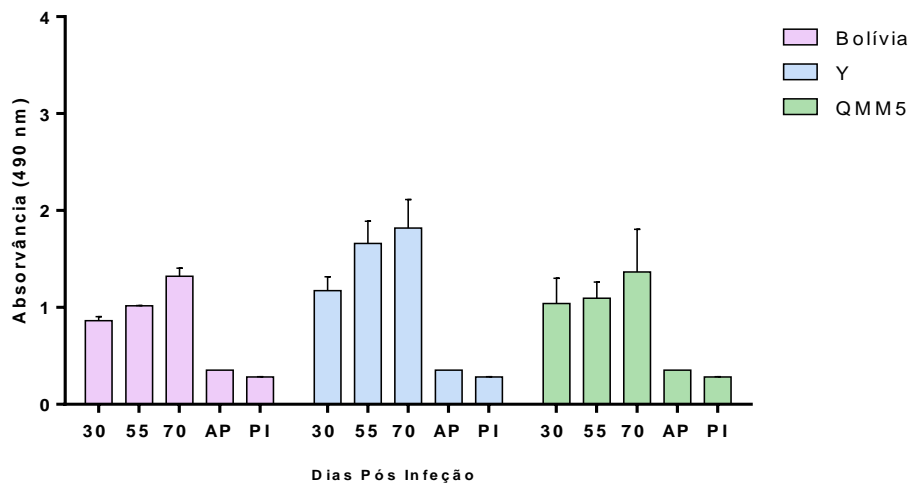


Figura 22. Determinação de anticorpos IgG2a anti-*T.cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram colhidas 30, 55 e 70 dias após a infecção com as estirpes de *T. cruzi*, Bolívia, Y e QMM5, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII respetivamente. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos e soros policlonais foram utilizados como controlo positivos (AP). Utilizou-se uma diluição de 1:400 na análise de todas as amostras.

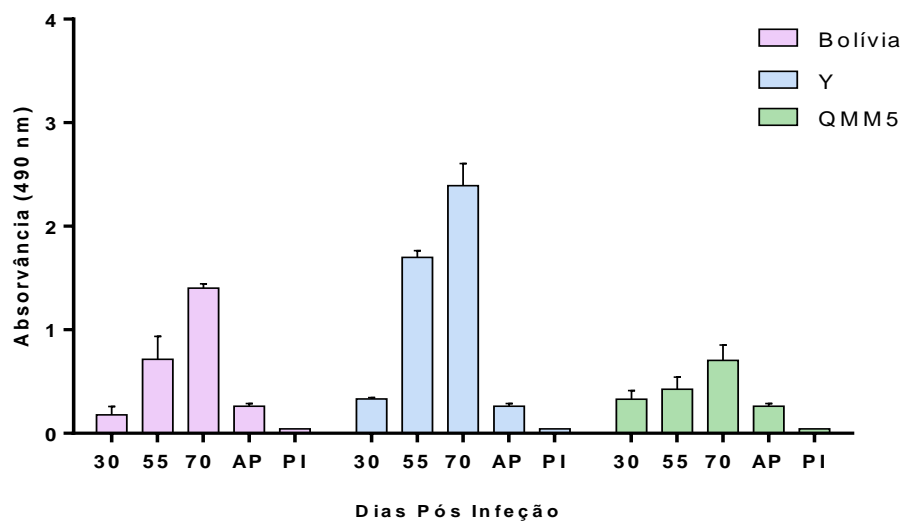


Figura 23. Determinação de anticorpos IgG3 anti-*T.cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram colhidas 30, 55 e 70 dias após a infecção com as estirpes de *T. cruzi*, Bolívia, Y e QMM5, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII respetivamente. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos e soros policlonais foram utilizados como controlo positivos (AP). Utilizou-se uma diluição de 1:400 na análise de todas as amostras.

4.4.1 Análise das Citocinas séricas durante a infecção com estirpes de *T. cruzi* em modelo murino

A avaliação das citocinas através do método de *ELISA* indicaram que a IL-4 aparenta aumentar durante a fase aguda, em todos os grupos, trinta dias após a infecção (figura 24) em comparação com o pré-imune. No entanto, com o avançar dos dias da infecção verificou-se um decréscimo acentuado em todos os grupos. Por outro lado, a pesquisa de TGF- β não demonstrou diferença da produção no decorrer da infecção em comparação com o pré-imune (figura 25). Os resultados do IFN- γ não foram conclusivos, como tal não foram apresentados.

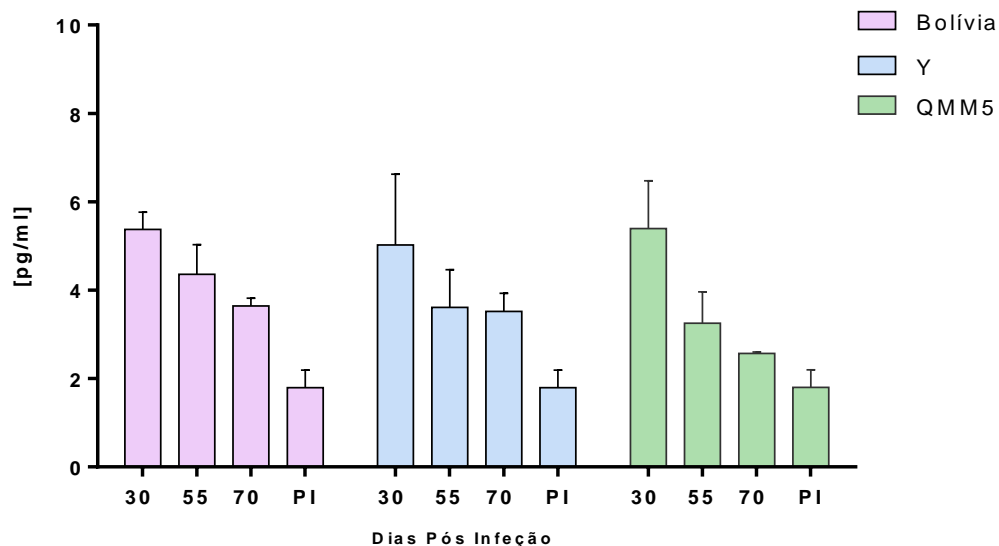


Figura 24. Quantificação sérica da IL-4, através do método de *ELISA* dos soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram colhidas 30, 55 e 70 dias pós infecção dos *Mus musculus* (Balb/c) com as estirpes Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII). Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI), foram utilizados como controlos negativos e todas as amostras foram analisadas na diluição de 1:10.

A produção do NO foi mais acentuada 30 dias após a infecção, nos grupos infetados com as estirpes, Bolívia Y e QMM5. Com o tempo da infecção evidenciou-se que em todos os grupos o declínio da produção do NO (figura 26).

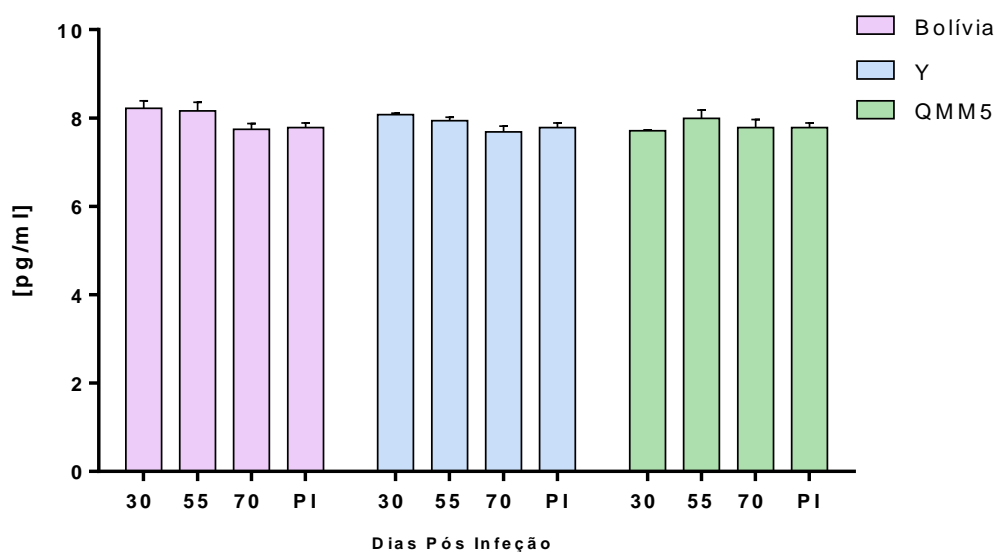


Figura 25. Quantificação sérica do TGF- β 1, através de *ELISA* dos soros de *Mus musculus* (Balb/c). As amostras foram colhidas 30, 55 e 70 dias após a infecção, com as estirpes de *T. cruzi*, Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII). Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI), foram utilizados como controlos negativos e todas as amostras foram analisadas na diluição de 1:10.

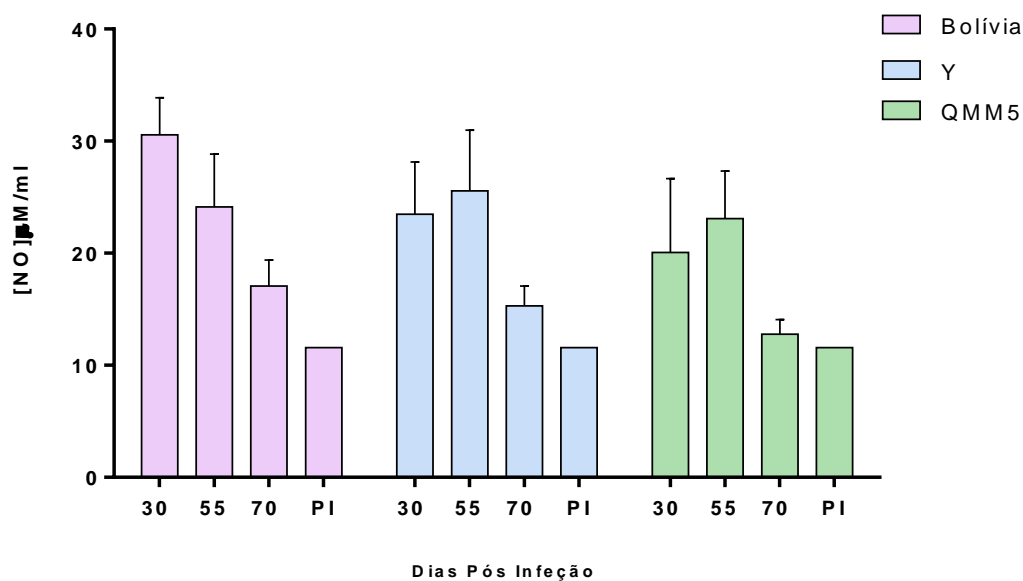


Figura 26. Quantificação sérica do NO pelo método de Griess. O gráfico corresponde à concentração em μ M/ml de NO sérico, após 30, 55 e 70 dias pós infecção dos *Mus musculus* (Balb/c) com as estirpes Bolívia (TcI), Y (TcII) e QMM5 (TcIII). Os soros dos animais saudáveis, pré-imune (PI) foram utilizados como controlos negativos. Todas as amostras foram analisadas na diluição de 1:10.

O envolvimento do sistema imune, no modelo murino, abrange três aspectos principais da doença de chagas, no controle da replicação do parasita, na propagação e na reação inflamatória nos tecidos infetados (Jorge & Castro, 2000). Durante o processo de evolução da infecção por *T. cruzi*, as respostas imunológicas inata e adaptativa coexistem. No entanto, a participação de cada uma destas respostas pode ser mais evidente em fases distintas da infecção. A resposta inata é normalmente mais importante nas fases iniciais da infecção, uma vez que linfócitos e anticorpos específicos são expressos na fase mais avançada da infecção. Consequentemente, a resposta adaptativa desempenha um papel importante após a cronificação da doença ou mesmo em respostas secundárias ao parasita (Aoki *et al.*, 2012).

A heterogeneidade da infecção de *T. cruzi* resulta em diferentes aspectos da resposta imune incluindo os parâmetros inflamatórios e do desenvolvimento de lesões tecidulares. Por isso foi utilizada, o método de *ELISA* para avaliar o potencial da infetividade das estirpes de *T. cruzi* no modelo murino. Deste modo, poderemos compreender o comportamento dos grupos TcI e TcII considerados os grupos mais divergentes em termos moleculares, assim como o grupo TcIII interpretado como evento de hibridização entre os grupos TcI e TcII, para futuramente, avaliar os efeitos terapêuticos do BNZ e das nanoformulações.

No presente estudo, todos os soros, dos murganhos inoculados, com as estirpes Bolívia, Y e QMM5, pertencentes aos grupos TcI, TcII e TcIII respectivamente, apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. cruzi*, indicando a infetividade dos animais com estas estirpes. O menor perfil da produção de anticorpos no grupo TcIII no decorrer da infecção pode ser correlacionado pelas características genéticas por se tratar de um híbrido (Zingales *et al.*, 2012). Como descrita na literatura, a infecção experimental de murganhos por *T. cruzi* induz alterações no sistema imune, como a ativação policlonal linfocitária e hiperprodução de imunoglobulina (Igs). De acordo com Umekita e Mota a presença de anticorpos de alta afinidade resulta num equilíbrio entre parasitas e organismo infetado, contribuindo para a sobrevivência do hospedeiro (Umekita *et al.*, 1988). Durante a infecção no modelo murino, pelo *T. cruzi* a resposta humoral é poliisotípica com o predomínio do Ig2a e IgM durante a infecção aguda (el Bouhdidi *et al.*, 1994). Estes anticorpos aparecem a partir da segunda-terceira semana da infecção e participam na eliminação dos parasitas.

Esta hiperprodução de imunoglobulina poliisotípica deriva da ativação policlonal de células B durante a fase aguda e resposta específica contra o parasita que pode persistir na fase crónica (Jorge & Castro, 2000). A baixa fração do anticorpo IgM anti-*T. cruzi*, após trinta dias da infeção verificado neste estudo foi semelhante a outros estudos, indicando que IgM não confere proteção, na fase mais avançada da infeção (Takehara *et al.*, 1981). Por outro lado, foi demonstrado que, durante os primeiros dias de exposição ao parasita, a resposta imune humoral caracteriza-se pelo aumento de níveis de anticorpos do tipo IgM, mas à medida que a infeção avança, com passar de dias após infeção, a resposta imune é essencialmente IgG. As análises de isotipo neste estudo confirmam a mudança de classe de IgM para IgG, o que está de acordo com o verificado (Scott & Goss-Sampson, 1984).

A análise dos anticorpos IgG específicas anti-*T. cruzi*, a IgG1, no presente estudo demonstrou ser baixo durante a fase aguda, com o aumento mais acentuado a partir de 55 e 70 após a infeção. Este resultado assemelha-se aos observados por Takehara *et al.*, indicando a falta de capacidade protetora de IgG1, na fase aguda (Takehara *et al.*, 1981). A subclasse IgG2 desempenha a função protetora durante a infeção crónica, no modelo murino (Takehara *et al.*, 1981). Os resultados deste estudo encontram-se de acordo com os dados da literatura, onde foi verificado que durante a infeção experimental, na resposta imune são detetáveis altas concentrações de IgG2a entre os anticorpos anti-*T. cruzi* (Brodszyn *et al.*, 1989; Takehara *et al.*, 1981). Takehara *et al.*, demonstraram que os anticorpos protetores contra a infeção por *T. cruzi* estão localizados principalmente na subclasse IgG2 (Takehara *et al.*, 1981). A subclasse IgG2 foi anticorpo predominante em ratinhos infetados cronicamente com *T. cruzi* (12 semanas), enquanto IgG1 e IgG3 foram ausente ou presente em níveis muito baixos (Takehara *et al.*, 1981). No nosso estudo, os anticorpos IgG1 e IgG3 foram presentes apenas em muito níveis baixos, durante a fase aguda, 30 dias após infeção. Estes resultados vão ao encontro de que durante a fase aguda da infeção não ocorre a produção precoce de IgG1 ou IgG3 (Scott & Goss-Sampson, 1984). Por outro lado a IgG2a está associada a proteção, sendo considerada mais efetiva contra o *T. cruzi* pode atingir 50% das imunoglobulinas totais do soro, durante infeção (Jorge & Castro, 2000).

As citocinas desempenham um papel importante durante a resposta imune protetora e autoimunidade desenvolvida durante a infecção pelo *T. cruzi* devido a influência sobre o processo de diferenciação celular, das subpopulações de células T, com a consequente ativação preferencial de linfócitos Th1 ou Th2. Neste estudo foram avaliadas as citocinas IL-4, IFN- γ e TGF- β . A IL4 é uma citocina que participa e atua em diferentes estágios de ativação, proliferação e diferenciação das células B (Jorge & Castro, 2000). O resultado da avaliação da IL-4 no decorrer da infecção vai de encontro com a literatura, afirmando que durante a cinética das respostas imune inata e adquirida na infecção por *T. cruzi* ocorre resposta predominantemente celular até 30 dias após infecção. Em murganhos, sabe-se que IL-4 é responsável pela mudança de classe de imunoglobulinas IgM para IgG1, e pela indução da diferenciação de linfócitos T na direção do Th2 (Jorge & Castro, 2000). Este resultado complementa a ausência ou a diminuição de IgM verificada neste estudo na fase mais avançada da infecção. Por outro lado, a produção desta citocina, mais intensificada na fase aguda, pode ser o resultado da apresentação dos antígenos do parasita, pelas células apresentadoras de antígeno, macrófagos. Nosso estudo, não demonstrou diferença na produção do TGF- β em comparação com o pré-imune. O TGF-B é produzido por diversos tipos das células, tais como macrófagos, células NK e células T. Apresenta propriedades imussupressoras e anti-inflamatórias. Como tal, este resultado sugere o controle da infecção pelo hospedeiro e/ou ausência de processos inflamatórios 70 dias após a infecção com as estirpes Bolívia, Y e QMM5. Existem evidências da autorregulação da resposta imune inata, durante a infecção pelo parasita, através da redução da ativação dos macrófagos e da produção de Óxido Nítrico (NO). Assim, nas situações experimentais de resolução da fase aguda, tanto a resposta imune adquirida, específica anti-*T. cruzi*, como o controle da ativação da resposta inata, desempenham um papel decisivo (Jorge & Castro, 2000). Este declínio da síntese do NO pode ser um indicativo de que a resposta imune inata é ativa durante todo o percurso da infecção, auxiliando o estabelecimento da resposta imune específica e pode ser decisiva para o estabelecimento de resistência ou da suscetibilidade à fase inicial, bem como o desenvolvimento posterior de patologia associada à fase crônica da infecção.

5. Conclusões e perspectivas futura

- ✓ O estudo da toxicidade aguda, a determinação da dose máxima tolerada, sugere um perfil bem tolerado dos excipientes e as nano formulações do BNZ;
 - ✓ A quantificação dos biomarcadores da função hepática, ALT e AST apontou um perfil menos tóxico dos excipientes bem como as nanoformulações do BNZ em comparação com o fármaco presentemente utilizado, o Abarax® e o princípio ativo do BNZ;
 - ✓ Estes resultados complementam-se e torna-se sugestivo de que os nano carregadores do princípio ativo utilizados no estudo, os lipossomas e a ciclodextrina, possivelmente protegem o princípio ativo da biodegradação e incrementam a biodisponibilidade consequentemente conduziram à diminuição dos efeitos tóxicos do BNZ. Deste modo, estas nanoformulações podem representar uma alternativa para a terapêutica da doença de Chagas.
-
- ✓ As formas epimastigotas das estirpes Bolívia, Y e QMM5 de *T. cruzi* demonstraram a suscetibilidade *in vitro* ao BNZ. A estirpe Y apresentou um perfil menos suscetível ao fármaco em comparação com as estirpes Bolívia, QMM5.
-
- ✓ Através do estudo imunoenzimático conclui-se que todos os animais inoculados com as estirpes Bolívia, Y e QMM5 pertencentes respetivamente aos grupos TcI, TcII e TcIII apresentaram anticorpos anti- *T. cruzi*.
 - ✓ A resposta humoral foi poliisotípica, durante a infeção experimental, com predomínio da produção dos anticorpos IgG anti-*T. cruzi* e as subclasses IgG1, IgG2a e IG3;
 - ✓ A pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* demonstrou a ocorrência da mudança de classe do anticorpo IgM anti-*T. cruzi* para anticorpo IgG anti-*T. cruzi* no decorrer da infeção;

- ✓ A citocina IL-4 e a produção do NO aumentaram durante a fase inicial e o declínio na fase mais tardia da infecção sendo sugestivo da ação imunomodulatória na infecção por *T. cruzi*.
- ✓ As estirpes Bolívia, Y e QMM5 de *T. cruzi* demonstram o potencial de infeciosidade em murinhos, com características distintas na resposta imunológica. Estes dados reforçam a complexidade da patogênese da doença e a influência da heterogeneidade das estirpes de *T. cruzi* durante o processo da fisiopatologia da doença de Chagas.

Com estes resultados que o próximo passo debruça-se sobre:

- Estabelecimento dos parâmetros toxicológicos versus terapêuticos do BNZ durante o tratamento da doença de Chagas no modelo murino;
- Avaliação da suscetibilidade *in vitro* ao BNZ das formas amastigotas e tripomastigotas das estirpes, Bolívia, Y e QMM5 de *T. cruzi*;
- Avaliação da eficácia terapêutica *in vivo* do BNZ e das nanoformulações sobre diferentes estirpes de *T. cruzi*;
- Estabelecer critérios de cura durante o tratamento com o BNZ e as nanoformulações em modelo murino;
- Determinação de anticorpos durante o tratamento da doença, em modelo murino.

6. Referências Bibliográficas

- Albajar-Viñas, . J., 2011.** The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill.*, Volume 16(38).
- Aoki, M. P. et al., 2012.** Nonimmune cells contribute to crosstalk between immune cells and inflammatory mediators in the innate response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Parasitology Research*, Volume 2012.
- Apt, W., 2010.** Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 4, p. 243–253.
- Bern , C., 2011.** Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *New Engl J Med*, Volume 364, pp. 2527-2534.
- Bern, C. et al., 2007.** Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. Volume 298 (18), pp. 2171-81.
- Bosquesi, P. et al., 2008.** Toxicidade de Fármacos nitrofurânicos. *Cien. Farm.Básica Apl*, Volume 29 (3), pp. 231-238.
- Brisse, S., Barnabé, C. & Tibayrenc, M., 2000.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis.. *Int J Parasitol*, Volume 30(1), pp. 35-44.
- Brodskyn, C. I., Silva , A. M. M., Takehara, H. A. & Mota, I., 1989.** IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol*, Volume 67, pp. 343-348.
- Bua, J. et al., 2012.** Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification.. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Volume 106(10), pp. 623-628.
- Chagas, C., 1909.** Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n.sp., agente etiológico do nova entidade mórbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Volume 1, pp. 1143-1156.
- Chaves, V. G., Spitz de Suza, D., Perreira , S. & Saboya, C., 2012.** Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. *Rev Assoc Med Bras*, Volume 58(3), pp. 288-293.

- Chorilli , M., Michelin , D. C. & Salgado, H. R. N., 2007.** Animais do laboratório: o camundongo.. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, Volume 28, pp. 11-23.
- Cook, G. C. & Zumla, A. I., 2009.** *Manson´s Tropical Diseases*. 22 end ed. China: Saunders Elsevier.
- Cortez, J. et al., 2012.** A expressão global de doença de Chagas- Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal. *Acta Med Port*, Volume 25(5), pp. 332-339.
- Coura , J. & Dias, J., 2009.** Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volume 104(Suppl. I), pp. 31-40.
- Coura, J. & Borges-Pereira, J., 2010.** Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Elsenvier*, Volume 115, pp. 5-13.
- Coura, J. R. & Borges-Pereira, J., 2012.** Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Volume 45(3), pp. 286-296.
- Coura, J. R. & Castro, S., 2002.** A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volume 97(1), pp. 3-24.
- da Cunha-Filho, M. et al., 2012.** Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. *Brasília Med* , Volume 49(4), pp. 279-283.
- de Freitas, J. M. et al., 2006.** Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens*, Volume 2(3), pp. 226-235.
- de Oliveira, M. F. et al., 2008.** Tratamento etiológico da doença de chagas no brasil. *Revista de Patologia Tropical*, Volume 37(3), pp. 209-228.
- de Souza, W., de Carvalho, T. & Barrias, E., 2010.** Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*.
- Deborggraeve, S. et al., 2009.** T. cruzi OligoC-Test: A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for Diagnosis of Chagas Disease. *Plos Neglected Tropical Disease*, Volume 3(6):e450.
- Dias , L. C. & Dessoay, M. A., 2009.** Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármaco. *Quim. Nova*, Volume 32(9) , pp. 2444-2457.

- Diniz, L. et al., 2013.** Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLoS Negl Trop Dis*, Volume 7(8), p. e2367.
- el Bouhdidi, A. et al., 1994.** Trypanosoma cruzi infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunol.*, Volume 16(2), pp. 69-76.
- ELEA, 2012.** ABARAX Benznidazol 50 mg - 100 mg. s.l. Patente N° N° 56.605.
- El-Tonsy, M., 2010.** Nanotechnology and Nanomedicine Applications in Parasitic Diseases. *Parasitologists United Journal (PUJ)*, Volume 3, pp. 19-26.
- Fagundes, D. J. & Taha, M. O., 2004.** Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. *Acta Cir Bras*, Volume 19(1), pp. 59-65.
- Fernandes, O. et al., 1998.** Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Volume 58, p. 807-811.
- Fernández, I. et al., 2010.** Clinical Biochemistry Parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(2), pp. 202-206.
- Funayama, G. K. & Prado Júnior, J. C., 1974.** Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do Trypanosoma cruzi. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop*, Volume 8, pp. 75-81.
- Gonçalves, T. C. M. et al., 2013.** Triatoma jatai sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volume 108(4), pp. 000-000.
- Gori, N., Gómez, M. I. D. & Castro, J. A., 1986.** Interaction of Benznidazole reactives metabolites with Rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear protein. *Arch. int Pharmacodyn*, Issue 22-31, p. 280.
- Guhl, F. & Lazdinis-Helds, J. K., 2007.** Reporte sobre la enfermedad de Chagas, s.l.: 17-20 de Abril de 2005, actualizado en Julio 2007.
- Heath, S., Hieny, S. & Sher, A., 1990.** A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Volume 43, pp. 133-142.

- Hermann, E. et al., 2002.** Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Is Associated with Maternal Enhanced Parasitemia and Decreased Production of Interferon- γ in Response to Parasite Antigens. *The Journal of Infectious Diseases* , Volume 189, pp. 1274-1281.
- Higo, H. et al., 2004.** Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects.. *Parasitology International*, Volume 53(4), pp. 337-344.
- Holscher, C. et al., 1998.** Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and Immunity*, Volume 66, pp. 1208-125.
- Hotez, P. J. et al., 2007.** Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, Volume 357, pp. 1018-27.
- Ho, W. Y. et al., 2012.** Hepatoprotective Activity of *Elephantopus scaber* on Alcohol-Induced Liver Damage in Mice. *Hindawi Publishing Corporation*, p. 8.
- Jorge , T. & Castro, S., 2000.** Doença de Chagas: manual para experimentação animal. *Scielo Books*, Issue FIOCRUZ, p. 368.
- Lahiani-Skiba, M. et al., 2006.** Optimization of entrapment of metronidazole in amphiphilic β -cyclodextrin nanospheres. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Volume 41, p. 1017–1021.
- Lamas, M., 2006.** Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole.
- Leonardi, D., Salomón , C., Lamas , M. & Olivieri, A., 2009.** Development of novel formulations for Chagas' disease: Optimization of benznidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *Int J Pharm* , Volume 367 (1-2), pp. 140-7.
- Machado, F. et al., 2012.** Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of chagas disease. *Semin Immunopathol*, Volume 34, pp. 753-770.
- Maya, J. D. et al., 2007.** Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Volume Part A 146, p. 601–620.

- Maya, J. D. & Morello, A., 2005.** Inhibition of Glutathione Synthesis as a Potential Therapeutic Against Chagas's diseases. *Journal of Biological Sciences*, Volume 5(6), pp. 847-854.
- Melo, M., Dória, G., Serafini, M. & Araújo, A., 2012.** Valores de referência hematológicos e bioquímicos de Ratos(*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena*, 8(4), pp. 049903-1.
- Miles, M. A., Lanham, S. M., Souza , A. A. & Póvoa, M., 1980.** Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R. Soc.Trop. Med Hyg.*, Volume 74, pp. 221-237.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C. & Murray, J. C., 2005.** Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, Volume 19, pp. 311-330.
- Moreno, M. et al., 2010.** *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volume 105(7), pp. 918-924.
- Muellas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J. & Gómez-Barrio, A., 2000.** Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res. 2000* , Volume 86(12), pp. 999-1002.
- OCDE Environment Health and Safety Publications, 2004 .** *Draft Guidance Document on Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, s.l.: No 43.
- OCDE, 2011.** “Test 423: acute oral toxicity—acute toxic class method,”. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 1(4), pp. 1-14.
- Ode, O. J., Asuzu , O. & Oladele , G. M., 2011.** The Biochemical Changes in Rats Following Chronic Toxicity with *Cassia Singueana* Leaf Extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 08(14).
- Pérez-Molina, J. A. et al., 2009.** Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy review with a meta-analysis*, Volume 64(6), pp. 1139-47.
- Pérez-Molina, J. A., Norman, F. & López-Veléz, R., 2012.** Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Current Infectious Disease Reports*, Volume 14, pp. 263-274.

- Pimentel, L., Júnior, A., Mosqueira, V. & Santos-Magalhães, N., 2007.** Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Volume 43, n.4.
- Pinazo, M. et al., 2013.** Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 57 (1).
- Pinazo, M. et al., 2010.** Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 54 (11), p. 4896–4899.
- Prata, A., 2001.** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 1(1), pp. 92-100.
- Prata, A., Dias, J. & Coura, J., 2011.** Os primórdios da doença. *História sobre a doença de Chagas no Brasil*, Volume 4: Suplemento II, pp. 6-11.
- Rassi, J. A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A., 2010.** Chagas disease. *Lancet*, Volume 375, p. 1388–402.
- Rey, L., 1992.** Tripanossomíase devida ao *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas. Em: *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 25-45.
- Rimoldi, A. et al., 2012.** Morphological, biological and molecular characterization of three strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from *Triatoma sordida* (Stal) 1859 (Hemiptera, Reduviidae) and a domestic cat. *Parasitology*, Volume 139, p. 37–44.
- Ribeiro, A. R. et al., 2014.** *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saúde Pública*, Volume 48, pp. 295-302.
- Rogers, T. et al., 2002.** A novel particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs: spray-freezing into liquid. *Eur J Pharm Biopharm*, Volume 54(3), pp. 271-80.
- Romanha, A. J. et al., 2010.** In vitro and in vivo experimental models for drug screening. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Volume 105(2), pp. 233-238.
- Romero, E. L. & Morilla, M. J., 2010.** Nanotechnological approaches against Chagas disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 62, p. 576–588.
- Sakata, S., Uchida, K., Kaetsu, I. & Kita, Y., 2007.** Programming control of intelligent drug release in response to single and binary environmental stimulation

signails using sensor and electroresponsive hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.*, Volume 76, pp. 733-737.

Satellite Meeting , 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Volume 94, pp. 429 - 432.

Schijman, A. G., Bisio, M. & et al., 2011. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *Plos Neglected Tropical Disease*, 5(1)(e931).

Schmunis, G. . A., 2007. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volume 102(Suppl. I), pp. 75-85.

Schofield , C., 1994. Triatominae: Biología y Control. Issue London: Eurocommunica Publications.

Scott, M. T. & Goss-Sampson, M., 1984. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. exp. Immunol*, Volume 58, pp. 372-379.

Sieuwert, A. M., Klijn, J. M., Peters, H. A. & Foekens, J. A., 1995. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-Values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, Volume 23, pp. 813-823.

Sievens-Figueroa, L. et al., 2012. Using USP I and USP IV for discriminating Dissolution Rates of Nano-and Microparticle-Loaded Pharmaceutical Strip-Films. *A PS Pharm Sci Tech*, 13(4).

Silva , L. H. P. d. & Nussenzweig , V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clínica et Biologica*, Volume 20, pp. 191-208.

Silva, J. S. et al., 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, Volume 63, pp. 4862-4867.

Soeiro, M. N. & de Castro, S. L., 2009. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*, Volume 13, pp. 105-121.

- Souto, R. P. et al., 1996.** DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, Volume 83, pp. 141-152.
- Stuart, K. et al., 2008.** Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J.Clin.Invest*, Volume 118, pp. 1301-1310.
- Takehara, H. A., Perini, A., Silva, M. H. & Mota, I., 1981.** *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp Parasitol*, Volume 52, pp. 137-146.
- Tanowitz Herbert B., et al., 1992.** Chagas' Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 5(4), pp. 400-419.
- Tanowitz, H. B., Weiss, L. M. & Montgomery, S. P., 2011.** Chagas Disease Has Now Gone Global. *Plos Neglected Tropical Disease*, Volume 5(4):e1136.
- Teixeira, A. R., Nascimento, R. J. & Strum, N. R., 2006.** Evolution and Pathology in Chagas diseases. A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Volume 101(5), pp. 463-491.
- Telleria, J. et al., 2006.** *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*, Volume 114, p. 279–288.
- Telleria, J. et al., 2006.** *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental parasitology*, Volume 114, p. 279–288.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F. J., 2002.** The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.*, Volume 18, p. 405–410.
- Tyler, K. & Egman, D., 2001.** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, Volume 31, pp. 472-481.
- Umekita, L. F. & Moita, I., 2000.** How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*?. *Braz J Med Biol Res*, Volume 33, pp. 253-258.
- Umekita, L. F., Takehara, H. A. & Mota, I., 1988.** Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters*, Volume 17, pp. 85-89.
- Urbina, J. & Docampo, R., 2003.** Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitology*, Volume 19 (11), pp. 495-501.
- Urbina, J. A., 2010.** Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, Volume 115, p. 55–68.

Venturini , C. G., Nicolini, J., Machado, C. & Machado, V. G., 2008. Propriedades e aplicações recentes das Ciclodextrinas. *Quim. Nova*, 31(2), pp. 360-368.

Villar, J. C. et al., 2002. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Walum, E., 1998. Acute Oral Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(2).

WHO, 2002. *WHO Technical Report Series N° 905. Control of Chagas Disease*, Geneve: World Health Organization.

WHO, 2007. *WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests*, Geneva: World Health Organization

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

WHO, 2014. *World Health Statistics 2014. A wealth of information on global public health*. Geneve: World Health Organization.

Zingales, B. et al., 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Volume 104(7), pp. 1051-1054.

Zingales, B. et al., 2012. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Volume 12, pp. 240-253.

Anvisa, 2013[Online]. www.anvisa.gov.br. [Acesso em 2013].

Berenice, 2013 [Online] <http://www.berenice-project.eu>. [Acesso em 2013].

Apêndice A – Imagens da Dose Máxima Tolerada

Fármacos: BNZ- Abarax, excipientes e nano formulações do BNZ



Administração dos compostos:



Sinais clínicos observados:



Animal controle



Animal administrado BNZ



Animais após administração das nanoformulações do BNZ (apatia e sonolência).

Apêndice B – Soluções e Meio de Cultivo

PBS:

137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,4

Soluções Elisa Sandwich IL-4:

Para a determinação do título de IL-4 no soro foram utilizadas as soluções de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, filtrada a 0,2 µm); tampão de lavagem (Tween20 a 0,05% em PBS pH 7.4); tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS), reagente diluente (BSA a 0,1%, Tween20 a 0,05% em PBS, pH 7.4); solução do substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e a solução de paragem (2 N H₂SO₄). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente, abrigo da luz e sob agitação orbital.

Soluções Elisa Sandwich IFN-γ

Para a determinação do título de IFN-γ no soro recorreu-se à técnica de ELISA fazendo uso do kit comercial *DuoSet Elisa mouse IFN-γ (R&D systems)* e das soluções de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.4); tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7.4); tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS a 0,05%), reagente diluente (BSA a 0,1%, Tween 20 em TBS a 0,05%, pH 7.4 e filtrado a 0,2µm); solução do substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e solução de paragem (2N H₂SO₄). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob agitação orbital.

Soluções Elisa Sandwich TGF- β

Para a determinação do título de TGF- β no soro recorreu-se à técnica de ELISA fazendo uso do kit comercial *DuoSet Elisa mouse TGF- β (R&D systems)* e das soluções de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, filtrada a 0,2 μ m); tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7.4); tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS a 0,05%), reagente diluente (BSA a 0,1%, Tween 20 em TBS a 0,05%, pH 7.4); solução do substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e solução de paragem (2N H₂SO₄). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob agitação orbital.

Meio LIT:

LIT - *Liver Infusion Tryptose* (68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM Dextrose; 0,3% Liver Infusion Broth; 0,5% Tryptose) e 1% de hemin (2,5 mg/mL) (Fernandes; Castellani, 1966). O pH foi ajustado para 7,2 e a solução autoclavada. Após o arrefecimento, adicionou-se 10% de soro fetal bovino estéril e inativado também estéril e armazenada à 4 °C.

Apêndice C – Análises Estatísticas

Biomarcadores de função hepática 24 horas após administração do BNZ-Abarax ®:

Toxicidade em 24 horas		
Tabela de análise da ALT	ANOVA	
Alfa (0,05)		
F	30,82	
<i>P value</i>	<0,0001	
Sumário do <i>P value</i>	***	
Existe diferença estatística entre as médias? (P <0.05)	Sim	
R	0,9536	
Múltipla Comparação	Diferença das Médias	Significância?
PBS vs. 100 mg BNZ	-16,64	Sim
PBS vs. 1000 mg BNZ	-30,99	Sim
100 mg BNZ vs. PBS	16,64	Sim
100 mg BNZ vs. 1000 mg BNZ	-14,36	Não
Toxicidade em 24 horas	AST	
Tabela de análise do AST	One ANOVA	
Alfa (0,05)		
F	21,58	
<i>P value</i>	0,0166	
Sumário do <i>P value</i>	*	
Existe diferença estatística entre as médias? (P < 0.05)	Sim	
R square	0,935	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
PBS vs. 100 mg BNZ	-10,47	Não
PBS vs. 1000 mg BNZ	-27,57	Sim
100 mg BNZ vs. PBS	10,47	Não
100 mg BNZ vs. 1000 mg BNZ	-17,11	Sim

Biomarcadores de função hepática 5 dias após a administração do princípio ativo (BNZ-PA) e do Abarax® (BNZ-A):

Toxicidade em 5 dias		
Tabela de análise da ALT	One ANOVA	
Alfa (0,05)		
F	28,19	
<i>P value</i>	0,0002	
Sumário do <i>P value</i>	***	
Existe diferença estatística entre as médias? (P <0.05)	Sim	
R	0,8757	
Múltipla Comparação	Diferença das Médias	Significância?
PBS vs. BNZ-A	-4,697	Não
PBS vs. BNZ-PA	-23,3	Sim
BNZ-A vs. PBS	4,697	Não
BNZ-A vs. BNZ-PA	-18,6	Sim
Toxicidade em 5 dias		
Tabela de análise do AST	ANOVA	
Alfa (0,05)		
F	5,536	
<i>P value</i>	0,0434	
Sumário do <i>P value</i>	*	
Existe diferença estatística entre as médias? (P <0.05)	Sim	
R	0,6486	
Múltipla Comparação	Diferença das Médias	Significância?
PBS vs. BNZ-A	-11,81	Não
PBS vs. BNZ-PA	-19,53	Sim
BNZ-A vs. PBS	11,81	Não
BNZ-A vs. BNZ-PA	-7,722	Não

Biomarcadores de função hepática 24 horas após administração dos excipientes das nanoformulações:

Toxicidade Excipientes em 24 horas		
Tabela de análise da ALT	2way ANOVA	
Alfa (0,05)		
F	30,82	
<i>P value</i>	<0,0001	
Sumário <i>P value</i>	****	
Existe diferença estatística entre as médias? (P <0.05)	Sim	
R	0,9536	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Fêmea		
PBS vs. Benznidazol	-3,086	Não
PBS vs. BCDEL- S 59	4,696	Sim
PBS vs. BCPA 12	3,757	Não
PBS vs. NLC S-V	6,708	Sim
Macho		
PBS vs. Benznidazol	-7,782	Sim
PBS vs. BCDEL- S 59	0,6708	Não
PBS vs. BCPA 12	-0,6708	Não
PBS vs. NLC S-V	2,549	Não
Fêmea		
BNZ-A vs. PBS	3,086	Não
BNZ-A vs. S59	7,782	Sim
BNZ-A vs. A12	6,842	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -V	9,794	Sim
Macho		
BNZ-A vs. PBS	7,782	Sim
BNZ-A vs. S59	8,453	Sim
BNZ-A vs. A12	7,111	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -V	10,33	Sim

Toxicidade Excipientes em 24 horas		
Tabela de análise da AST	2way ANOVA	
Alfa (0,05)		
Existe diferença estatística entre as médias? (P <0.05)	Sim	
R	0,9536	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Fêmea		
PBS vs. BNZ-A	-19,56	Sim
PBS vs. BCDEL-S59	-3,622	Não
PBS vs. BCPA12	-1,69	Não
PBS vs. NLC-S -V	0,7245	Não
Macho		
PBS vs. BNZ-A	-24,15	Sim
PBS vs. BCDEL-S59	-1,57	Não
PBS vs. BCPA12	-4,83	Não
PBS vs. NLC-S -V	-4,709	Não
Fêmea		
BNZ-A vs. PBS	19,56	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S59	15,94	Sim
BNZ-A vs. BCPA12	17,87	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -V	20,29	Sim
Macho		
BNZ-A vs. PBS	24,15	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S59	22,58	Sim
BNZ-A vs. BCPA12	19,32	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -V	19,44	Sim

Biomarcadores de função hepática 24 horas após administração das nanoformulações:

Toxicidade Nanoformulações em 24 horas		
Tabela de análise da ALT	2way ANOVA	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Fêmea		
PBS vs. BNZ-A	-4,428	Sim
PBS vs. BCDEL-S61	-1,878	Não
PBS vs. BCPA11	1,073	Não
PBS vs. NLC-S -20% BNZ	2,384E-07	Não
Macho		
PBS vs. BNZ-A	-6,038	Sim
PBS vs. BCDEL-S61	-3,086	Não
PBS vs. BCPA11	-2,818	Não
PBS vs. NLC-S -20% BNZ	-4,562	Sim
Fêmea		
BNZ-A vs. PBS	4,428	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S61	2,549	Não
BNZ-A vs. BCPA11	5,501	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -20% BNZ	4,428	Sim
Macho		
BNZ-A vs. PBS	6,038	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S61	2,952	Não
BNZ-A vs. BCPA11	3,22	Não
BNZ-A vs. NLC-S -20% BNZ	1,476	Não
Toxicidade Nanoformulações		
Tabela de análise do AST	2way ANOVA	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Fêmea		
PBS vs. BNZ-A	-41,18	Sim
PBS vs. BCDEL-S61	-8,09	Não
PBS vs. BCPA11	-8,453	Não
PBS vs. NLC-S -20% BNZ	-10,87	Não

Macho		
PBS vs. BNZ-A	-28,62	Sim
PBS vs. BCDEL-S61	4,709	Não
PBS vs. BCPA11	-0,2415	Não
PBS vs. NLC-S -20% BNZ	-3,743	Não
Fêmea		
BNZ-A vs. PBS	41,18	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S61	33,09	Sim
BNZ-A vs. BCPA11	32,72	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -20% BNZ	30,31	Sim
Macho		
BNZ-A vs. PBS	28,62	Sim
BNZ-A vs. BCDEL-S61	33,33	Sim
BNZ-A vs. BCPA11	28,38	Sim
BNZ-A vs. NLC-S -20% BNZ	24,87	Sim

Biomarcadores de função hepática 24 horas após administração das nanoformulações complexadas com ciclodextrina (CD):

Toxicidade Nanoformulações-CD em 24 horas		
Tabela de análise da ALT	2way ANOVA	
Alfa	0,05	
<i>P-value</i>	< 0,0001	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Fêmea		
Água vs. CD	-9,947	Não
Água vs. BNZ	-64,99	Sim
Água vs. 12%	-7,693	Não
Água vs. 24%	-50,72	Sim
Água vs. 50%	-48,3	Sim
Macho		
Água vs. CD	-10,47	Não
Água vs. BNZ	-33,52	Sim
Água vs. 12%	-15,15	Sim
Água vs. 24%	-47,2	Sim
Água vs. 50%	-45,88	Sim
Fêmea		
BNZ vs. Água	64,99	Sim
BNZ vs. CD	55,04	Sim
BNZ vs. 12%	57,29	Sim
BNZ vs. 24%	14,27	Sim
BNZ vs. 50%	16,69	Sim
Macho		
BNZ vs. Água	33,52	Sim
BNZ vs. CD	23,05	Sim
BNZ vs. 12%	18,38	Sim
BNZ vs. 24%	-13,68	Não
BNZ vs. 50%	-12,36	Não
Toxicidade Nanoformulações		
Tabela de análise da AST	2way ANOVA	
Alfa	0,05	
<i>P-value</i>	< 0,0001	
Múltipla comparação	Diferença das Médias	Significância?
Água vs. CD	6,979	Não

Água vs. BNZ	-40,66	Sim
Água vs. 12%	-19,32	Sim
Água vs. 24%	-35,35	Sim
Água vs. 50%	-34,47	Sim
Fêmea		
BNZ vs. Água	40,66	Sim
BNZ vs. CD	47,64	Sim
BNZ vs. 12%	42,59	Sim
BNZ vs. 24%	3,12	Não
BNZ vs. 50%	7,072	Não
Macho		
BNZ vs. Água	63,45	Sim
BNZ vs. CD	50,06	Sim
BNZ vs. 12%	44,13	Sim
BNZ vs. 24%	28,1	Sim
BNZ vs. 50%	28,98	Sim