HIGO FERNANDO SANTOS SOUZA

Avaliação do efeito de memantina na infecção experimental pelo *Trypanosoma*
cruzi (*in vivo* e *in vitro*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

HIGO FERNANDO SANTOS SOUZA

Avaliação do efeito de memantina na infecção experimental pelo *Trypanosoma*
cruzi (*in vivo e in vitro*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Souza, Higo Fernando Santos.

Avaliação do efeito de memantina na infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi (*in vivo* e *in vitro*) / Higo Fernando Santos Souza. --
São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Potenciais alvos para quimioterapia da doença de Chagas.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effect memantina in
experimental *Trypanosoma cruzi* infection (*in vivo* and *in vitro*).

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Memantina 3. NMDA 4. Receptor 5.
Tripanocida 6. Sistema imune I. Silber, Prof. Dr. Ariel Mariano II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0188/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Higo Fernando Santos Souza.

Título da Dissertação: Avaliação do efeito de memantina na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* (*in vivo* e *in vitro*).

Orientador(a): Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.041/2012.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 107/12/CEUA, datado de 31.07.12 e por solicitação do Prof. Dr. **Ariel Mariano Silber**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Higo Fernando Santos Souza** ao Projeto de Pesquisa "*Avaliação do efeito, e das perspectivas terapêuticas de memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantina), um antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), na infecção experimental aguda pelo Trypanosoma cruzi*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Vice- Coordenador da CEUA
ICB/USP

Trabalho realizado com auxílios financeiros concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus Pais, Fátima e Fernando, pelo apoio,
amor e compreensão incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber pela grande oportunidade que me concedeu, pela orientação, paciência, apoio e amizade. Muito obrigado por tudo!

À Elizabeth Pral pelo apoio, amizade, ajuda e todo o suporte técnico.

À minha amiga Sandra Carla Rocha pela amizade, apoio, ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados e por me fazer acreditar que era possível a realização desse sonho e pelo apoio e estímulo nessa caminhada.

À minha família: meus pais Maria de Fátima e Fernando Antônio; minhas irmãs: Charlina, Haoana, Andressa e ao meu irmão, Gabriel; meu sobrinho (a) Kemillyn e Luis Fernando; ao meu grande amigo Ronaldo D'Elia pelo apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Aos meus amigos (as) do laboratório: Letícia Marchese, Raissa Melo, Maria Julia, Flávia Damasceno, Ludmila Nakamura, Carolina Manchola, Marcell Crispim, Brian Suarez, Rossana Duque, Richard pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos meus grandes amigos: Shirley, Eraldo e Regiane por todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Carsten Wrenger e seu grupo: Flávia Zimbres, Kamila Meissner, Jasmin Lindner, Sory Boch e Thales Kronenberger.

Ao Prof. Dr. Cláudio Marinho e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Mauro Cortez e aos integrantes do seu laboratório pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro desse trabalho.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a
fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Souza HFS. Avaliação do efeito de memantina na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A busca por novos alvos terapêuticos têm sido de extrema importância para o tratamento específico da doença de Chagas. A quimioterapia disponível é insatisfatória, principalmente em relação à eficácia do tratamento na fase crônica da doença, bem como os efeitos colaterais adversos. O nosso grupo está explorando como alternativa para a identificação de novas estratégias de tratamento o reposicionamento de drogas. Nesse contexto, nosso laboratório mostrou que a memantina, uma droga atualmente utilizada para o tratamento de doenças neurodegenerativas, apresenta uma atividade tripanocida no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, *in vitro*. Com base nessas informações, avaliamos o efeito da memantina, um antagonista de receptores de glutamato NMDA dependentes, na infecção experimental com *T. cruzi* (*in vivo* e *in vitro*). Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^3 formas de tripomastigotas da cepa Y e submetidos a tratamento com memantina (10 mg/kg dia). Os camundongos tratados, mostraram uma redução significativa da parasitemia (40%) no 8º dia após a infecção (dpi), quando comparado com o controle ($p < 0,05$). No 15º dpi, os tecidos dos camundongos infectados ou não, foram coletados para análise de carga parasitária tecidual por qPCR. Esses dados mostraram uma redução na carga parasitária no tecido cardíaco dos animais tratados. Uma vez que a cepa utilizada no presente estudo é reticulotrópica, invadindo preferencialmente macrófagos, e que estes tem um papel importante na defesa contra agentes patogênicos, decidimos avaliar o efeito de memantina na linhagem celular RAW 264.7. Os nossos dados mostraram que memantina diminuiu a produção de NO por células estimuladas com LPS (10 µg/mL). Quando incubadas na presença de baixas concentrações de memantina, essas células mostraram uma diminuição de cálcio intracelular, e não houve uma redução de EROs, sugerindo que, em concentrações mais elevadas, memantina apresenta um perfil pró-oxidante, resultando em estresse oxidativo. Além disso, foi observado que a memantina interfere com o ciclo intracelular do parasita, reduzindo o número de células infectadas. Nossos resultados sugerem que o tratamento com memantina apresenta um efeito tripanocida e pode direcionar o sistema imune de modo a modular os receptores de tipo NMDA macrófagos, através de um efeito direto ou indireto produzido pelo tratamento.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Memantina. Receptor de glutamato.

ABSTRACT

Souza HFS. Evaluation of the effect of memantine in experimental *Trypanosoma cruzi* infection (*in vivo* and *in vitro*). [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The search for new therapeutic targets has been of extreme importance for the specific treatment of Chagas disease. The chemotherapies presently available are unsatisfactory mainly regarding the effectiveness of treatment in the chronic phase of the disease. In addition, they present adverse side effects. Our group is exploring as an alternative, a strategy for drug repurposing. In this context, our laboratory showed that memantine, a drug currently used to treat neurodegenerative diseases which is antagonistic of NMDA glutamate receptors, has a trypanocidal activity along the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the aetiological agent of Chagas disease, *in vitro*. Based on this information, we evaluated the effect of memantine in the experimental infection with *T. cruzi* (*in vivo* and *in vitro*). BALB/c mice were infected with 1×10^3 trypomastigote of Y strain and treated with memantine (10mg/kg day). The treated mice showed a significant reduction of parasitemia (40% in 8th day after infection (dpi)) when compared to the control ($p < 0.05$). At 15th dpi, the tissues were collected for analysis of parasitic loads by qPCR. It was evidenced a reduction on the parasitic load in the memantine-treated cardiac tissues. Since the strain used in our study is reticulotropic, (with tropism for macrophages, which in turn have a role in the defense against pathogens) we decided to evaluate the effect of memantine in the cell line RAW 264.7. Our data showed that memantine decreased NO production by cells stimulated with LPS line (10 $\mu\text{g/mL}$) at low concentrations, showed a decrease in the intracellular calcium and did not cause a reduction in ROS, suggesting that at higher concentrations memantine could have a pro-oxidant effect, resulting in oxidative stress. Moreover, memantine interferes with the intracellular cycle of the parasite, reducing the number of infected cells. Our results suggest that treatment with memantine has a trypanocidal effect and can target the immune system to modulate the NMDA receptor type macrophage, through a direct or indirect effect caused by the treatment.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Memantine. Glutamate receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Esquema do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	20
Figura 2 – Esquema do receptor de NMDA.....	29
Figura 3 - Estrutura química de memantina.....	30
Figura 4 - Parasitemia em camundongos BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i>.....	40
Figura 5 – Taxa de sobrevivência.....	41
Figura 6 - Carga parasitária tecidual.....	42
Figura 7 - Densidade parasitária no tecido cardíaco.....	43
Figura 8 - Viabilidade celular em células RAW 264.7.....	45
Figura 9 - Produção de NO em função da concentração de LPS.....	46
Figura 10 - Cinética da ativação de células RAW 264.7.....	46
Figura 11 - Efeito de memantina na produção de NO.....	47
Figura 12 - Representação gráfica dos níveis intracelular de Ca^{2+}.....	48
Figura 13 - Representação gráfica dos níveis de EROs.....	49
Figura 14 - Representação gráfica dos níveis de EROs em células infectadas.....	49
Figura 15 - Representação gráfica do efeito de memantina no ciclo intracelular.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aβ	Peptídeos β -amilóides
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AP	<i>Activator protein</i> (Proteína ativadora)
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ATP	Adenosina trifosfato
CHO-K₁	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (linhagem celular proveniente de ovário de hamster chinês)
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Threshold cycle</i> (Ciclo limiar de detecção)
DA	Doença de Alzheimer
DC	Células dendríticas
DCF	2',7'- diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
d.p.i	Dias pós-infecção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAg	DNA genômico
DO	Densidade ótica

DTUs	<i>Discrete Typing Units</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Aminoácido γ -aminobutírico
H&E	Hematoxilina e eosina
IC₅₀	Metade da concentração máxima inibitória
IgG	Imunoglobulina G
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
I_{K(IR)}	Canais de potássio de retificação interna
IL	Interleucina
INF	Interferon
K⁺	Potássio
K⁺_{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilogramas
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i> (Repetições ricas em leucinas)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i> (Proteína ativada por mitógeno)
MEM	Memantina
mg	Miligramas
Mg²⁺	Magnésio
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MgSO₄	Sulfato de magnésio

mL	Mililitros
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromo tetrazolio)
MyD88	<i>Myeloid differentiation fator 88</i> (Fator de diferenciação mielóide 88)
Na²⁺	Sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaNO₂	Nitrito de sódio
NF-κB	<i>Nuclear fator-kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
ng	Nanogramas
NH₄⁺	Íon amônio
NK	<i>Natural Killer</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento Padrão)

RNA	Ácido ribonucleíco
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
Th	Célula T auxiliadora
TGF	Fator transformador de crescimento
TIRAP	Proteína adaptadora relacionada a TIR
TLR	<i>Toll-like Receptors</i> (Receptores tipo Toll)
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon- β
U	Unidade
UI	Unidade internacional
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Doença de Chagas.....	18
1.2 Fases da doença.....	19
1.3 Ciclo de vida.....	19
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	21
1.5 Tratamento da doença de Chagas.....	22
1.6 Aspectos imunológicos da doença de Chagas.....	22
1.7 Metabolismo de aminoácidos.....	26
1.8 Glutamato.....	27
1.9 N-metil-D-aspartato (NMDA).....	28
1.10 Memantina.....	29
1.11 Memantina e <i>T. cruzi</i>.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 <i>in vivo</i>.....	33
3.1.1 Animais.....	33
3.1.2 Obtenção e manutenção da cepa Y de <i>T. cruzi</i>.....	33
3.1.3 Delineamento experimental.....	33
3.1.4 Avaliação da parasitemia e sobrevida.....	33
3.1.5 Análise de carga parasitária tecidual por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCRq).....	34
3.1.5.1 Extração de DNAg de tecidos.....	34
3.1.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa.....	34
3.1.5.3 Tratamento dos dados.....	35
3.1.6 Densidade da carga parasitária do tecido cardíaco.....	35
3.2 <i>in vitro</i>.....	35
3.2.1 Manutenção das células hospedeiras.....	35
3.2.2 Obtenção de formas tripomastigotas.....	36

3.2.3 Viabilidade Celular.....	36
3.2.4 Determinação da concentração de LPS.....	37
3.2.5 Cinética da ativação da linhagem celular RAW 264.7.....	37
3.2.6 Determinação da produção de NO.....	37
3.2.7 Análise do nível de Ca^{2+} intracelular.....	38
3.2.8 Determinação da produção de EROs.....	38
3.2.9 Efeito do tratamento no ciclo intracelular.....	38
3.3 Análises dos resultados.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Análises <i>in vivo</i>.....	40
4.1.1 Parasitemia e mortalidade.....	40
4.1.2 Carga parasitária tecidual.....	41
4.1.3 Carga parasitária tecidual cardíaca.....	43
4.2 Análises <i>in vitro</i>.....	44
4.2.1 Viabilidade Celular.....	44
4.2.2 Determinação da concentração de LPS.....	44
4.2.3 Cinética da ativação da linhagem celular RAW 264.7.....	46
4.2.4 Avaliação do tratamento com memantina em linhagem celular RAW 264.7.....	47
4.2.5 Avaliação dos níveis de cálcio intracelular.....	47
4.2.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	48
4.2.7 Efeito do tratamento no ciclo intracelular.....	50
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma parasitose endêmica em vários países da América Latina. Essa doença foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas em uma campanha anti-palúdica, durante a construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, realizada em 1907, em Laussence, no norte de Minas Gerais. No entanto, somente em 1909, a descoberta de Chagas foi divulgada nacional e internacionalmente (CHAGAS, 1909a, 1909b). Nesse trabalho, Carlos Chagas descreveu vários aspectos da doença, tais como: o agente etiológico, o inseto vetor, a morfologia do parasito, o ciclo evolutivo e o primeiro relato da doença em humanos. A doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (HOARE, 1972).

A transmissão do *T. cruzi* para os hospedeiros vertebrados, incluindo o homem e mais de 150 espécies de animais domésticos e animais selvagens, ocorre principalmente por mecanismo vetorial, por intermédio de um inseto triatomíneo hematófago da família Reduviidae (DEANE, 1964), com destaque para *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (ZELEDON; RABINOVICH, 1981). O parasita também pode ser transmitido ao homem, em menor frequência, através de mecanismos não-vetoriais (SHIKANAI-YASUDA et al., 1990). Dentre esses é possível destacar: transfusão de sangue (MAZZA, 1936), transplante de órgãos (SCHMUNIS, 2007), transmissão congênita (BITTENCOURT, 1976) e por via oral. Segundo Coura, a transmissão por via oral vem sendo considerada como relevante na manutenção do ciclo de transmissão natural (COURA, 2006). Esse tipo de transmissão se dá através da ingestão de alimentos contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas, que já foi demonstrado experimentalmente serem capazes de infectar o epitélio da mucosa gástrica (YOSHIDA, 2009).

Estima-se que o número de indivíduos infectados reduziu de 20 milhões (1981) para cerca 10 milhões em 2009 nas áreas endêmicas, que se estendem desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Devido à imigração de indivíduos infectados de regiões endêmicas para regiões não endêmicas, têm sido relatados casos no continente europeu e no oeste do Pacífico (COURA; DIAS, 2009; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). Além do mais, cerca 25 milhões de indivíduos estão expostos à infecção, ocorrendo por ano, aproximadamente, 40 mil novos

casos e 12 mil mortes, devido a complicações cardíacas e digestivas. A prevalência da doença está correlacionada com os problemas socioeconômicos e médico-sanitários (WHO, 2012).

1.2 Fases da doença

A infecção pelo *T. cruzi* é caracterizada por duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda, que pode ocorrer de 30 a 90 dias, é caracterizada por uma alta parasitemia e a ausência ou baixa produção de anticorpos IgGs. É geralmente assintomática, embora em alguns casos, sinais e sintomas inespecíficos possam ser observados, tais como: febre, edema localizado e generalizado, dor de cabeça, poliadenia, miocardite e/ou meningoencefalite (TANOWITZ et al., 1992). O desenvolvimento de uma forma aguda mais grave pode ser observado em pacientes imunossuprimidos e crianças, com comprometimento cardíaco e encefalomielite (ZHANG; TARLETON, 1999). De acordo com Guarner e colaboradores, a fase aguda é destacada como uma infecção generalizada, acometendo quase todos os órgãos (GUARNER et al., 2001). Nessa fase é possível visualizar em análises de secções histológicas, a presença da forma amastigota, tanto nos tecidos como no interior de diversos tipos celulares, sendo geralmente acompanhado por infiltrado inflamatório mononuclear, congestão aguda e edema. Já, a fase crônica, é caracterizada pelo decaimento da parasitemia e alta produção de anticorpos específicos. Nessa fase, cerca de 70% dos indivíduos infectados apresentam a forma indeterminada da doença, que é assintomática e pode durar por toda a vida (MACÊDO, 1980). Cerca de 30% dos pacientes evoluem para as formas sintomáticas da doença, caracterizadas principalmente por manifestações cardíacas e/ou digestivas (DIAS, 1993; TANOWITZ et al., 1992).

1.3 Ciclo de vida

O ciclo biológico do parasita é complexo, pois alterna entre o hospedeiro invertebrado e o hospedeiro mamífero. O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo, quando o inseto vetor hematófago é infectado ao picar o hospedeiro mamífero, que possui formas tripomastigotas circulantes no sangue. Na porção média do tubo digestivo do inseto vetor ocorre a diferenciação de tripomastigotas para epimastigotas (BRENER, 1973). Na porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se aderem ao epitélio intestinal e sofrem diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (BONALDO et al., 1988), que por sua vez são eliminados junto às fezes e urina durante um novo repasto sanguíneo. Ao penetrarem na pele do hospedeiro

mamífero através de lesões, mucosa ocular ou oral (BRENER, 1971; COURA, 2006), os tripomastigotas irão invadir diferentes tipos de células. Após a internalização celular ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo e a liberação dos parasitas no citoplasma, onde se diferenciam para amastigotas. Após sucessivas fissões binárias, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, passando por uma forma transiente denominada epimastigota intracelular (ALMEIDA-DE-FARIA et al., 1999). Uma vez ocorrida a diferenciação, os tripomastigotas rompem a célula e são liberados para o meio extracelular, podendo atingir células vizinhas, ou a corrente sanguínea, sendo capazes neste caso de invadirem células de outros tecidos. Uma vez circulantes no sangue, os tripomastigotas podem ser ingeridos por um novo inseto vetor, que eventualmente adquirira a infecção através do repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo de vida (ALVES; COLLI, 2007; BARRETT et al., 2003). O esquema do ciclo de vida do *T. cruzi* está representado na **Figura 1**.

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do *T. cruzi*.

O parasita apresenta um ciclo de vida que alterna entre o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado (hemípteros hematófagos da família Reduviidae). No hospedeiro mamífero foram descritas as formas amastigotas (estágio replicativo e infectivo), epimastigota intracelular (epimastigote-like – forma replicativa intermediária entre amastigota e tripomastigota) e tripomastigota (estágio infectivo); No hospedeiro invertebrado foram descritas as formas epimastigota (forma replicativa e não infectiva) e a forma tripomastigota metacíclico (forma infectiva e não replicativa).

1.4 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório, que apresenta um ciclo de vida digenético, caracterizado por mudanças morfológicas complexas. Diferentes cepas, clones e isolados de *T. cruzi* apresentam um elevado grau de variabilidade intraespecífica quando avaliadas por marcadores biológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos (MACEDO et al., 2001). Diante dessa variabilidade, o parasita pode apresentar algumas particularidades, tais como: diferenças morfológicas (ANDRADE, 1985), de susceptibilidade à drogas (TOLEDO et al., 2004), na infectividade (CORTEZ et al., 2012), virulência (LAURIA-PIRES; BOGLIOLO; TEIXEIRA, 1996) e patogenicidade (MACEDO; PENA, 1998). Nesse sentido, estudos recentes, baseados em distintos marcadores biológicos, bioquímicos e moleculares, padronizaram a taxonomia subespecífica desse parasita, de forma com que houvesse um consenso entre a comunidade científica. As diferentes cepas e isolados de *T. cruzi* foram subdividas em seis linhagens filogenéticas denominadas DTUs (*Discrete Typing Units*), numerados de I a VI (ZINGALES et al., 2009).

O *T. cruzi* possui a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, os quais incluem macrófagos, células musculares lisas e estriadas, além de fibroblastos (ANDRADE; ANDREWS, 2005). A cepa Y de *T. cruzi*, isolada de um caso agudo em 1950 por Pereira de Freitas e estudada por Silva e Nussenzweig em 1953, é uma cepa reticulotrópica, (apresenta tropismo por células do sistema retículo-endotelial, tais como baço, fígado, linfonodos e medula), que infecta preferencialmente macrófagos (ANDRADE; LOPES, 1963). Tal cepa, quando utilizada para infectar camundongos da linhagem BALB/c, apresenta uma alta virulência e picos parasitêmicos precoces, com altos índices de mortalidade e lesões tissulares graves (ANDRADE et al., 1970). Por essas características, a infecção de camundongos BALB/c com trypomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* cepa Y constitui um modelo experimental bem aceito para o estudo da infecção aguda da doença de Chagas.

Outras características da cepa são o predomínio de formas tripomastigotas delgadas no sangue, com cinetoplasto pontual localizado na região posterior, flagelo curto e, núcleo alongado e situado na posição mediana (BRENER; CHIARI, 1963). Como descrito na literatura, a cepa Y possui uma maior resistência quando comparada a outras cepas, ao tratamento quimioterápico.

1.5 Tratamento da doença de Chagas

No final da década de 1960 e início da década de 1970, surgiram duas drogas nitro-heterocíclicas com atividade antiparasitária, o Nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), com IC_{50} de 150 μM e o Benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida), cujo IC_{50} é de 19 μM (DA SILVA MELO; DURAN; HAUN, 2000; DE CASTRO, 1993; MURTA et al., 1998). Dados da literatura evidenciam que a ação desses fármacos é mais efetiva na fase aguda da doença, apresentando em média 80% de cura parasitológica. No entanto, essas drogas apresentam baixa eficiência durante a fase crônica, além de efeitos tóxicos. O efeito das drogas sobre o parasito pode estar diretamente relacionado com a duração do tratamento, a idade do paciente, a emergência de variantes resistentes para algumas cepas, e a distribuição geográfica dos pacientes (SOEIRO; DE CASTRO, 2009). Atualmente, somente o Benzonidazol é comercializado no Brasil, sendo eficiente para o tratamento da fase aguda da doença, mas a sua eficiência na fase crônica é ainda controversa, e também apresenta sérios efeitos colaterais tais como dermatite, febre, dores articulares, vômitos e diarreia. Por outro lado, o Nifurtimox foi descontinuado, devido a efeitos tóxicos mais sérios (KIRCHHOFF, 1993).

Diante dessa situação, a busca por novas alternativas terapêuticas têm sido de extrema importância para o tratamento específico da doença de Chagas. Nas ultimas décadas, pesquisas que visam o tratamento da doença tem evoluído devido à descoberta de novos alvos bioquímicos (URBINA, 2010), levando em consideração o estudo das vias metabólicas em tripanossomatídeos, uma vez que seus transportadores e enzimas podem ser interessantes alvos para o desenvolvimento de novos compostos (MOREIRA et al., 2009; SILBER et al., 2005).

1.6 Aspectos imunológicos da doença de Chagas

Como descrito no ciclo de vida do parasita, as formas infectivas ao serem depositadas na pele do hospedeiro por triatomíneos infectados durante um novo repasto sanguíneo, induzem diferentes tipos de respostas imunológicas (SACKS; SHER, 2002). Ao se depararem com as barreiras iniciais do sistema imune inato, o parasita promove a ativação de macrófagos, células dendríticas (DCs), células *Natural Killer* (NK) e proteínas do sistema complemento (TARLETON, 2007), que posteriormente resultam no aparecimento de respostas humorais e celulares específicas (ALIBERTI et al., 1996). A ausência de alguns

desses componentes da resposta imune pode acarretar uma maior taxa de parasitemia e mortalidade (BOSCARDIN et al., 2010).

O sistema imune inato fornece a primeira linha de defesa, iniciada pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são expressos nas células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e células dendríticas, que então reconhecem estruturas denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes, por sua vez, compreendem moléculas conservadas compartilhadas por um amplo espectro de agentes infecciosos, tais como: bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus, DNA e RNA, protozoários e fungos. Essas moléculas são capazes de direcionar a ativação da resposta inata do hospedeiro (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011; KAWAI; AKIRA, 2011). Dentre os PRRs mais estudados, estão a família dos receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like Receptors*, TLRs) (TRINCHIERI; SHER, 2007).

Os TLRs são uma família de proteínas transmembranas do tipo I, altamente conservadas, que participam da detecção e reconhecimento de padrões moleculares expressos em patógenos. Esses receptores atuam nas vias de sinalização específicas que culminam no desencadeamento da expressão de genes pró-inflamatórios e na produção de proteínas (KAWAI; AKIRA, 2011; TARLETON, 2007). Os TLRs são caracterizados pela presença de um domínio extracelular com repetições ricas em leucinas (LRR) e uma porção citoplasmática formada por um domínio similar ao domínio do receptor de Interleucina-1 (IL-1R), denominado de domínio TIR (Toll/IL-1 Receptor), que é requerido para desencadear a geração de sinais intracelulares (KAWAI; AKIRA, 2011). Todos os TLRs, com exceção do TLR3, induzem uma via de transdução que leva a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (*Nuclear fator kappa B*) e MAP quinase (MAPK – *mitogen-activated protein*). Atualmente, existem 13 TLRs descritos em mamíferos, sendo que 10 são funcionais em humanos e 12 em camundongos (O'NEILL, 2008; ZHU; MOHAN, 2010).

A ativação dos TLRs desencadeia uma sinalização intracelular que culmina com a ativação de macrófagos. Essa, por sua vez, ocorre através da ativação de fatores de transcrição, tais como: NF- κ B e AP-1. Esses fatores de transcrição ativam genes relacionados à produção de citocinas inflamatórias, dentre essas: TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), IL-1 (proliferação celular) e IL-12 (apoptose) (DOYLE; O'NEILL, 2006). Desse modo, a sinalização desses receptores é feita através de uma das quatro moléculas adaptadoras: MyD88 (*Myeloid differentiation fator 88*), TICAM1 (ou TRIP-TIR *domain-containing adaptor protein inducing IFN-b*), TIRAP (ou MAL) e TICAM2 (ou TRAM e TRIP). Com

excessão do TLR3, que sinaliza via TICAM1, todos os demais TLRs e os membros da família de receptores IL-1, sinalizam via MyD88 (TAKEDA; AKIRA, 2007).

Campos & Gazzinelli (CAMPOS; GAZZINELLI, 2004) demonstraram que alguns PAMPs derivados de *T. cruzi* são reconhecidos pelos TLRs, dentre eles, o receptor tipo Toll 4 (TLR-4). De fato, observou-se que camundongos nocautes para TLR-4 são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi*. Por outro lado, Campos e colaboradores (CAMPOS et al., 2004) demonstraram que camundongos nocautes para o receptor tipo Toll 2 (TLR-2) quando infectados com *T. cruzi*, não apresentam diferença na taxa de mortalidade e parasitemia em relação ao grupo controle. Nesse mesmo trabalho, avaliou-se a influência da molécula adaptadora MyD88. Camundongos nocautes para essa molécula apresentaram uma maior susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, resultando em uma alta parasitemia e taxa de mortalidade, sugerindo que a resistência a esta infecção é dependente da sinalização dos TLRs. Em outro enfoque experimental, Bafica e colaboradores (BAFICA et al., 2006) demonstraram que camundongos nocautes para TLR-9 são altamente susceptíveis à infecção. Esses dados em conjunto, indicam a importância dos TLRs na resposta imune inata em relação à infecção por *T. cruzi*.

A infecção pelo *T. cruzi* é acompanhada por um processo inflamatório, que resulta no recrutamento de diferentes tipos celulares, tais como células NK, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. Como mencionado anteriormente, o parasita possui a capacidade de infectar diferentes tipos de células do hospedeiro mamífero, incluindo macrófagos (ANDRADE; ANDREWS, 2005). Uma vez que os macrófagos foram infectados, ocorre a liberação de IL-12, que por sua vez irá ativar as células NK, estimulando assim a produção de IFN- γ , que tem como função direcionar os macrófagos para uma atividade microbicida (ALIBERTI et al., 1996; GAZZINELLI et al., 1992).

A produção de TNF- α por macrófagos durante a infecção interage de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ , induzindo a expressão da óxido-nítrico sintase induzível (iNOS) e consequente produção de óxido nítrico (NO) (MILLER; COHEN; RITCHEY, 2002). NO é um importante fator citostático e citotóxico na resposta imune mediada por células a uma variedade de patógenos, dentre eles *T. cruzi*, resultando na eliminação ou controle da invasão do parasita (PAVANELLI; SILVA, 2010), embora outros mecanismos independentes dessa via também participem desse controle (CUMMINGS; TARLETON, 2004). Vespa e colaboradores (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994) demonstraram que os níveis de NO em esplenócitos de camundongos resistentes à infecção (C57BL/6) eram maior que os

encontrados em camundongos susceptíveis (BALB/c), ambos, infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, sugerindo que a resistência à infecção está correlacionada com a produção de NO. No entanto, Cummings e colaboradores (CUMMINGS; TARLETON, 2004) demonstraram que a produção de NO é importante, mas não essencial para o controle da infecção, uma vez que, camundongos nocautes para iNOS e infectados com *T. cruzi*, poderiam compensar a ausência da produção de NO através do aumento de outras citocinas importantes para o controle imune da infecção.

As citocinas reguladoras que possuem funções imunossupressoras, IL-10 e IL-4, atuam através da inibição da ativação de macrófagos e da produção de NO por essas células (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Ainda assim, sabe-se que IL-10 e TGF- β , estão associadas à susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, provavelmente devido a seu papel inibitório da atividade de INF- γ (SILVA et al., 1992). Abrahamsohn & Coffman demonstraram o papel inibitório de IL-10, utilizando camundongos nocautes para IL-10 e observaram que os níveis de parasitemia eram baixos nas fases iniciais da infecção, sugerindo, provavelmente, a ação de citocinas inflamatórias como: INF- γ , IL-12 e TNF- α . Diante do observado, podemos verificar que o balanço entre as respostas Th₁ e Th₂ é necessário para direcionar o curso da infecção (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996).

A IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas (responsável pela interação entre o sistema imune inato e adaptativo) promove a diferenciação dos linfócitos T helper CD4⁺ (Th₁) e a ativação das células NK. Ambas as células são responsáveis pela produção de INF- γ , como já mencionado, o qual atua na ativação de macrófagos, linfócitos T CD8⁺ e células B (JUNQUEIRA et al., 2010; UEMATSU; AKIRA, 2007). No entanto, Padilla e colaboradores descreveram que a ativação de células T CD8⁺, que exercem um papel citotóxico contra células do hospedeiro, não seria dependente de células T CD4⁺ (PADILLA et al., 2007). Além da função citotóxica, as células T CD8⁺ são importantes em mecanismos protetores, juntamente com os macrófagos, e contribuem para o controle da proliferação do parasita. Além disso, estão associadas à imunopatologia da doença durante a fase crônica, já que nos estágios tardios da doença, representam a maioria das células do infiltrado inflamatório encontrado no tecido cardíaco (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Durante a fase aguda da infecção, ocorre a ativação policlonal de linfócitos B, resultando na hiperprodução de imunoglobulinas. A distribuição desses anticorpos é invariável ao longo da infecção, porém é observado a predominância da produção de anticorpos antígenos-específicos da classe IgG dos isotipos IgG2a e IgG2b (BRENER;

GAZZINELLI, 1997). Cardillo e colaboradores observaram que camundongos nocautes para células B apresentam baixa quantidade de citocinas inflamatórias e menores quantidades de células T CD8⁺ ativadas, sugerindo uma modulação dos linfócitos T para uma resposta Th₁ (CARDILLO et al., 2007)

1.7 Metabolismo de aminoácidos

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos patogênicos abrange diferentes ambientes em seus hospedeiros. O *T. cruzi*, por exemplo, está exposto fundamentalmente ao trato intestinal do inseto vetor, à corrente sanguínea e ao citoplasma da célula do hospedeiro mamífero. Nesses ambientes a sobrevivência do parasita está relacionada com sua capacidade de manter a homeostase intracelular de íons e nutrientes, além de catabolizar diferentes substratos como fonte de energia. Assim, a utilização de carboidratos e aminoácidos são processos cruciais para a sobrevivência do parasita como fonte de energia e carbono (SILBER et al., 2005; TONELLI et al., 2004; ZILBERSTEIN, 1993).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* usam preferencialmente a glicose, abundante nos fluídos dos seus hospedeiros vertebrados (SILBER et al., 2009). No entanto, no hospedeiro invertebrado, a maior fonte de carbono e energia para os epimastigotas são os aminoácidos, especialmente prolina, aspartato, glutamato e glutamina, os quais são abundantes na hemolinfa e nos fluídos teciduais do inseto vetor hematófago (CANNATA; CAZZULO, 1984; SYLVESTER; KRASSNER, 1976). Por outro lado, no hospedeiro mamífero, os epimastigotas intracelulares transportam preferencialmente a prolina quando comparado a glicose (SILBER et al., 2009).

O metabolismo de aminoácidos desempenha um papel importante em uma variedade de processos biológicos do *T. cruzi*. Além de serem utilizados pelo parasita como fonte de energia e carbono (KRASSNER; SYLVESTER; MUNSON, 1973), os aminoácidos, como por exemplo, a prolina, o glutamato e o aspartato estão envolvidos no processo de diferenciação que, acontece no inseto vetor, sendo esse processo denominado metaciclogênese (CONTRERAS et al., 1985; HOMSY; GRANGER; KRASSNER, 1989). Os aminoácidos glicina, alanina, prolina e glutamato estão envolvidos na osmorregulação e controle do volume celular do parasita (ROHLOFF; MONTALVETTI; DOCAMPO, 2004; ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003). A prolina, particularmente, é importante no fornecimento de energia para a invasão das células do hospedeiro mamífero (MARTINS et al., 2009), no sustento energético das formas intracelulares (SILBER et al., 2009), na

diferenciação celular de epimastigotas intracelulares para tripomastigotas (TONELLI et al., 2004) e também participa nos mecanismos de resistência a diferentes tipos de estresse (MAGDALENO et al., 2009). Além dos mencionados, outros aminoácidos como asparagina, glutamina, leucina e isoleucina também são metabolizados pelo *T. cruzi*, pois também são oxidados através da sua conversão em glutamato e aspartato. Esses aminoácidos são desaminados, e os cetoácidos resultantes podem ser processados via Ciclo de Krebs (SILBER et al., 2005).

1.8 Glutamato

O glutamato cumpre uma série de papéis em diferentes organismos: participa do metabolismo energético, e da comunicação intercelular. Em mamíferos, o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o qual exerce um papel crucial em mecanismos adjacentes à plasticidade sináptica, sendo então capaz de induzir a excitotoxicidade, mediados pelo aumento de Ca^{2+} (Cálcio) intracelular, resultando em estresse oxidativo (WANG; MICHAELIS, 2010). O rol descrito até agora para esse aminoácido em *T. cruzi* é puramente relacionado com a bioenergética do parasita. O glutamato uma vez dentro da célula pode ser convertido em α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase e, então processado via ciclo de Krebs para obtenção de energia (CAZZULO et al., 1979). Esse aminoácido é incorporado às formas epimastigotas e tripomastigotas através de um sistema de transporte possivelmente energizado através do gradiente de H^+ na membrana plasmática (SILBER et al., 2006).

Em mamíferos, o glutamato pode atuar através de dois subtipos de receptores presentes na membrana plasmática dos neurônios: 1. ionotrópicos (iGluRs) e 2. Metabotrópicos (mGluRs) (FUNDYTUS, 2001; PIN et al., 1992). Os membros da família iGluRs são subdivididos em três subtipos de receptores, de acordo com sua resposta aos agonistas N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato. Os receptores ionotrópicos possuem uma estrutura molecular bastante similar, consistindo em quatro subunidades protéicas, cada uma com quatro domínios (M1, M2, M3 e M4) que interagem fisicamente com a membrana plasmática. Essas subunidades juntas formam um canal permeável a cátions (CHEN; WYLLIE, 2006). Por sua vez, os mGluRs são acoplados a proteína G e agem através de segundos mensageiros via ativação da proteína C, gerando uma resposta pós-sináptica mais lenta (PINHEIRO; MULLE, 2008).

1.9 N-metil-D-aspartato (NMDA)

Os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) são hetero-oligômeros, formados por diferentes combinações das subunidades NR1, NR2 e NR3, presentes nas membranas pós-sinápticas e envolvidos com o processo de memória tardia (SCHMIDT, 1994). Tais receptores são formados por canais iônicos que possuem alta permeabilidade aos cátions monovalentes sódio (Na^+), potássio (K^+) e divalentes, como o cálcio (Ca^{2+}) (PARSONS; GILLING, 2007). Esses canais (dependentes de voltagem) são bloqueados por Mg^{2+} quando estão em potencial de repouso (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003), impedindo dessa forma, a passagem de outros íons. De forma simplificada, o excesso de glutamato no meio extracelular promove a ativação constante dos receptores ionotrópicos, principalmente dos receptores de NMDA, desencadeando um processo de neurotoxicidade (CHOI; ROTHMAN, 1990). Para que haja a remoção desse bloqueio é necessária uma despolarização prévia da membrana neural pós-sináptica, mediada por correntes evocadas pelos receptores do tipo AMPA e cainato, permitindo assim a passagem de íons pelo canal, o qual resulta no influxo de Na^+ e principalmente Ca^{2+} , e no influxo de K^+ (PARSONS; STOFFLER; DANYSZ, 2007) (**Figura 2**). Uma vez dentro do citoplasma do neurônio, o Ca^{2+} se associa com a calmodulina, adquirindo a capacidade de ativar a enzima Óxido Nítrico sintase neural (NOSn), uma das três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS), formando por sua vez, NO (BARRETO; CORREIA, 2005).

O receptor de NMDA desempenha importantes funções fisiológicas, como por exemplo, a regulação de mecanismos de morte ou sobrevivência de neurônios durante os estágios precoces do desenvolvimento. Na fase adulta, esse receptor está envolvido na plasticidade sináptica, aprendizado, consolidação da memória, transmissão sensorial e coordenação, entre outras funções (MARINELLI et al., 2007).

Figura 2 - Esquema do receptor de NMDA.

O esquema representa um receptor de NMDA – um hetero-oligômero de duas subunidades NR1 obrigatórias e duas subunidades NR2 localizadas regionalmente. Tal receptor é formado por canais iônicos que possuem alta permeabilidade a Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . A ativação do receptor de NMDA pelo glutamato determina a despolarização prévia da membrana neural pós-sináptica, mediada por correntes evocadas pelos receptores do tipo AMPA e cainato, e subsequente remoção dos íons de Mg^{2+} e abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. A abertura desses canais (voltagem-dependente) permite a passagem de íons, o qual resulta no influxo de Na^+ e principalmente Ca^{2+} , e no influxo de K^+ (PARSONS; GILLING, 2007).

1.10 Memantina

Memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantina) foi sintetizada pela primeira vez na década de 1960, como um agente antidiabético por pesquisadores do laboratório Eli Lilly (**Figura 3**). No entanto, constatou-se que sua ação era ineficaz na redução dos níveis de glicose no sangue (GERZON et al., 1963). Somente em 1972, sua ação no sistema nervoso central (SNC) foi demonstrada por Merz Pharmaceuticals (Frankfurt, Germany) e inicialmente relacionada ao tratamento da doença de Parkinson e de diversas outras doenças cerebrais (GROSSMANN; SCHUTZ, 1982; MILTNER, 1982; SCHNEIDER et al., 1984). Em 1983, evidências experimentais mostraram que memantina possui atividade dopanimomimética e também apresenta efeito sobre os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico (WESEMAN; SONTAG; MAJ, 1983). Interessantemente, somente em 1989, foi constatado que a memantina era um antagonista do receptor de NMDA do glutamato.

Figura 3 - Estrutura química de memantina

A memantina atua como um antagonista não competitivo, com afinidade baixa/moderada pelo receptor NMDA do glutamato. Atualmente, a dose diária recomendada é de 20 mg, administrada duas vezes ao dia (10 mg cada). , Sabe-se que a absorção de memantina ocorre no trato gastrointestinal, com picos séricos entre três e oito horas e sua eliminação é fundamentalmente renal, o qual não interage com o citocromo P₄₅₀ e, portanto não possui interações farmacocinéticas (FORLENZA, 2005). A droga apresenta baixa toxicidade em doses terapêuticas (GORDON; DUBNER; DIONNE, 1999; HEWITT, 2000; SCHMID; SANDLER; KATZ, 1999), sendo os efeitos colaterais, quando relatados, diarreia, vertigens, cefaléia, insônia, inquietação, excitação e cansaço em pacientes com demência leve/moderada (JARVIS; FIGGITT, 2003). Em condições fisiológicas, memantina atua como os íons de Mg²⁺, como descrito anteriormente no item 1.9, no entanto, em condições patológicas, não se desprende do receptor de NMDA (MISZTAL et al., 1996).

1.11 Memantina e *T. cruzi*

Na forma epimastigota de *T. cruzi*, foi demonstrado por Paveto e colaboradores a existência de um mecanismo similar ao realizado pela enzima NOS de mamíferos (PAVETO et al., 1995). Mais especificamente, foi mostrado que a atividade da enzima NOS de *T. cruzi* é modulada por meio da ativação dos canais iônicos dos receptores de NMDA, como descrito para células nervosas e endoteliais. Em células endoteliais, a produção de NO estimula a enzima guanilato ciclase e a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) intracelular, o qual resulta no relaxamento muscular. Pereira e colaboradores demonstraram em seu trabalho que a estimulação da atividade da guanilato ciclase quando mediada por NO pode ser responsável pelo aumento da motilidade em epimastigotas (PEREIRA et al., 1997). Além disso, moléculas envolvidas em vias de transdução de sinal como segundos mensageiros, tais como, 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (NAULA; SEEBECK,

2000), Ca^{2+} (MORENO; DOCAMPO, 2003) e NO (PAVETO et al., 1995) têm um papel importante na diferenciação e invasão celular do *T. cruzi*.

Tanto glutamato quanto GABA são metabolitos relatados na literatura como os principais neurotransmissores excitatório e inibitórios. Nosso grupo vem estudando a produção, metabolismo, degradação e importação desses metabólitos em *T. cruzi* (artigo submetido). Diante dos fatos mencionados acima, e as evidências obtidas pelo nosso grupo mostrando a presença de transportadores específicos para esses substratos, nosso grupo considerou relevante o estudo de fármacos utilizados para o tratamento clínico de várias patologias nas quais glutamato e/ou GABA estivessem envolvidos. Nesse sentido, abordou-se o estudo de compostos que atuem nas vias glutamatérgicas e GABAérgicas do sistema nervoso central, os quais poderiam apresentar uma possível atividade anti-*T. cruzi*. Dos fármacos avaliados, memantina, um antagonista não competitivo do receptor de NMDA, apresentou relevantes efeitos tripanocida (DAMASCENO et al., 2014). Nesse trabalho, foi demonstrado que memantina apresenta um efeito inibitório do crescimento de formas epimastigotas, com um IC_{50} de 172.6 μM . O processo de metaciclogênese também foi afetado pelo tratamento, ocorrendo uma diminuição de 30% de formas metacíclicas em relação ao controle. O tratamento com memantina foi capaz de desencadear morte celular programada compatível com apoptose em formas epimastigotas, apresentando exposição de fosfatidilserina na membrana externa, aumento de Ca^{2+} intracelular, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de diminuição nos níveis de ATP e mudanças morfológicas. Foi observado que durante o período de invasão celular, a capacidade de infecção de formas tripomastigotas foi diminuída, com um IC_{50} de 206.3 μM , bem como uma redução significativa no número de tripomastigotas liberados após infecção em relação ao grupo controle. Finalmente, foi demonstrado também que a memantina interfere no ciclo intracelular apresentando um IC_{50} de 31 μM .

Diante do exposto, foi considerado relevante avaliar o efeito de memantina, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, utilizando a cepa Y, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que os dados acima citados foram obtidos com a cepa CL14, sendo esta uma cepa que apresenta ausência completa de parasitemia e patologia em camundongos, portanto considerada uma cepa avirulenta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito de memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantina), um antagonista do receptor de NMDA na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* (*in vivo* e *in vitro*).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de memantina em camundongos BALB/c infectados pela cepa Y de *T. cruzi* utilizando três parâmetros: (i) parasitemia; (ii) mortalidade e (iii) carga parasitária tecidual.
- Avaliar a toxicidade de memantina em células da linhagem celular RAW 264.7.
- Avaliar a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de linhagem celular RAW 264.7.
- Avaliar os níveis de Ca^{2+} intracelular em células de linhagem celular RAW 264.7.
- Avaliar o efeito de memantina em células de linhagem celular RAW 264.7 infectadas pelo *T. cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises *in vivo*

3.1.1 Animais

Os camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas entre 6-8 semanas, foram obtidos do Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB, USP. Os animais foram mantidos em condições climáticas controladas com acesso livre a ração e água (*ad libitum*). Todos os procedimentos laboratoriais envolvendo animais foram previamente autorizados pela Comissão de Ética em Uso de Animais para experimentação do ICB-USP (Protocolo 107, Fls 132, Livro 02).

3.1.2 Obtenção e manutenção da cepa Y de *T. cruzi*

Através de repiques semanais, a cepa Y foi mantida em camundongos da linhagem BALB/c, com inóculo de 1.000 (parasitas/animal) formas de tripomastigotas sanguícolas, por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram anestesiados e, através de punção cardíaca, na presença de heparina 5.000 UI (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil), o sangue contendo formas tripomastigotas foi obtido.

3.1.3 Delineamento experimental

Por via intraperitoneal foram inoculadas 1.000 formas tripomastigotas sanguícolas nos animais. Após 6 horas da inoculação, foram administrados 200 µL de memantina (10 mg/kg/dia) e PBS para o grupo controle. Os animais foram tratados durante 10 dias consecutivos. O efeito da dose foi avaliado seguindo os seguintes parâmetros: (i) parasitemia, (ii) sobrevivência e (iii) carga parasitária tecidual.

3.1.4 Avaliação da parasitemia e sobrevivência

A parasitemia foi avaliada entre o 7º e o 10º dia pós-infecção (d.p.i). Foram coletados 10 µL de sangue da veia caudal dos animais e colocados entre lâmina (26 x 76 mm) e lamínula (22 x 22 mm). Em seguida foi realizada a leitura de 25 campos em microscópio óptico (Nikon

Eclipse E200), com objetiva de 40X e ocular de 10X (BRENER, 1962). Os valores obtidos foram multiplicados por um fator de correção e os dados expressos em parasitas/mL. A sobrevivência dos camundongos foi acompanhada até o 40º d.p.i.

3.1.5 *Análise de carga parasitária tecidual por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCRq)*

A técnica de PCRq utilizada nesse trabalho foi adaptada de Cummings e Tarleton (2003) (CUMMINGS; TARLETON, 2003). A sensibilidade obtida foi suficiente para detectar até 5 ng de DNA genômico (DNAg) do parasita proveniente dos tecidos dos animais infectados. Para o tratamento dos dados foi utilizado o método de quantificação absoluta utilizando uma curva padrão, onde a concentração de DNAg em cada ponto é conhecida.

3.1.5.1 Extração de DNAg de tecidos

Para a extração de DNAg dos tecidos retirados dos camundongos no 15º d.p.i, foi utilizado o “*Dnaeasy Blood and Tissue Kit*” conforme recomendações do fabricante (*Qiagen*, Alemanha). A determinação da pureza e concentração do DNAg, foi realizada por espectrofotometria, absorvância de 260 e 280 nm, em aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000) e ajustada a uma concentração final de 2,5 ng/µL.

3.1.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

Foram utilizados *primers* que amplificam um produto de 182 pares de bases. Cada reação continha 0,5 µM de *primers* específicos de *T. cruzi* TCZ direto 5'-GCTCTTGCCACAMGGTGC-3' (onde M corresponde aos nucleotídeos A ou C) e TCZ reverso 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' (Bionner; Bionner Corporation; Daedeok-gu, Daejeon, Korea do Sul), 5ng de DNAg, 10 µl de Syber Green Master Mix (Fermentas®; Fermentas Canada Inc; Burlington, Ontário, Canadá) e água Nuclease-free (Fermentas®), em um volume final de 20 µl. Para normalização dos valores obtidos pelos *primers* TCZ, estabelecemos uma reação com 0,5 µM de *primers* específicos para fator de necrose tumoral-α (TNF- α) murino, TNF-5241 direto 5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3' e TNF-5411 reverso 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3' (Bionner).

A programação consistiu de uma fase inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida por uma fase de amplificação dividida em 3 etapas e submetidas a 40 ciclos: 95 °C por 10 segundos, 63 °C por 15 segundos e 72 °C por 8 segundos. A última fase foi a construção da curva de desnaturação (95 °C por 1 segundo, 60 °C por 30 segundos e 90 °C por 1 segundo). A PCRq foi realizada no termociclador *Eppendorf RealPlex 2/2*.

3.1.5.3 Tratamento dos dados

A quantificação absoluta baseada na utilização da curva-padrão foi o método escolhido para análise dos dados. Os valores de Ct obtidos pelo *software Eppendorf RealPlex 2/2* versão 1.5 foram transformados em números de parasitas equivalentes a 5 ng de DNA de tecido murino e suas médias foram corrigidas de acordo com os produtos de TNF- α (CUMMINGS; TARLETON, 2003).

3.1.6 Densidade da carga parasitária do tecido cardíaco

No 15º d.p.i, o tecido cardíaco dos animais controle e tratados com memantina (10mg/kg/dia) foram coletados e transferidos para frascos individuais contendo formaldeído 10 % diluído em solução tampão PBS. Em seguida, foram processados por desidratação gradual em soluções de etanol, seguido de imersão em xileno, e posteriormente incluídos em parafina e as seções de 5 μ m de espessura foram coradas segundo o método de hematoxilina-eosina (H&E). A densidade parasitária do número de ninhos de amastigotas por mm² foi realizada através da contagem desses ninhos em todo o corte do coração de cada animal. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ, e os valores expressos em ninhos/mm².

3.2 Análises *in vitro*

3.2.1 Manutenção das células hospedeiras

A linhagem de macrófagos de camundongos, RAW 264.7, gentilmente cedidas pelo Dr. Mauro Javier Cortez Veliz - Laboratório de Imunobiologia da interação *Leishmania*-macrófagos, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (VitrocellTM, Brasil), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) (v/v), 0,15% (m/v)

de NaHCO_3 , penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e 2 mM de piruvato de sódio.

A linhagem de fibroblasto de rim de macaco Rhesus, LLCMK2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute - VitrocellTM*), suplementado com 3% de SFB (Soro Fetal Bovino) (v/v), 0,15% (m/v) de NaHCO_3 , penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$).

Ambas linhagens celulares foram cultivadas à 37 °C sob atmosfera úmida a 5% de dióxido de carbono (CO_2).

3.2.2 Obtenção de formas tripomastigotas

Para obtenção de formas tripomastigotas provenientes de cultura celular, as células de linhagem celular LLC-MK₂ foram infectadas com formas tripomastigotas para manutenção dos parasitas em cultura. Os parasitas foram obtidos do sangue de animais infectados, por punção cardíaca. As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada, à 37 °C e 5% de CO_2 , por sete dias.

3.2.3 Viabilidade Celular

Células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e incubadas em estufa com atmosfera umidificada, à 37 °C, 5% de CO_2 . As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*VitrocellTM*), suplementadas com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) (v/v), 0,15% (m/v) de NaHCO_3 , penicilina (100 U/mL),estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e 2 mM de piruvato de sódio, na presença de diferentes concentrações de memantina (10-800 μM) por 24, 48 e 72 horas. Após esse período a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se um ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazolio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Esse método tem como finalidade avaliar as células viáveis. Para isso, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionado 300 μL de PBS e 60 μL MTT (5 mg/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO_2 por 3 horas (protegidos da luz). A reação foi interrompida com a adição de 200 μL de SDS 10%. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm.

3.2.4 Determinação da concentração de LPS

Para determinar a concentração de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) (0111.B4, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) a ser utilizada nos ensaio de produção de NO por células da linhagem RAW 264.7, incubamos $2,5 \times 10^5$ células/poço com diferentes concentrações de LPS (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Após esse período, analisamos a produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Para isso, alíquotas de 50 μL de cada condição experimental a serem dosadas foram incubadas com 50 μL dos reagentes de Griess (25 μL da solução de sulfanilamida 1% em 5% H_3PO_4 e 25 μL da solução de Naftiletilenodiamino – bicloridrato 0,1% em 5% H_3PO_4), à temperatura ambiente por 10 minutos, em câmara escura. A densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA, utilizando um filtro de 515 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2). Os valores utilizados para o cálculo da curva padrão de NaNO_2 foram de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μM . Os valores foram expressos em μM .

3.2.5 Cinética da ativação da linhagem celular RAW 264.7

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas ou não, com 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, analisamos a produção de nitrito pela reação de Griess (GREEN et al., 1982), como previamente descrito no item 3.2.4.

3.2.6 Determinação da produção de NO

Os ensaios de produção de óxido nítrico foram realizados através da quantificação de nitrito no sobrenadante de células da linhagem RAW 264.7. As células ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços, com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) e estimuladas ou não com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Após esse período, analisamos a produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982), como previamente descrito no item 3.2.4.

3.2.7 Análise do nível de Ca^{2+} intracelular

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^4$ cel/poço) estimuladas ou não com LPS ($10 \mu\text{g/mL}$), foram tratadas com diferentes concentrações de memantina ($1\text{-}100 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com $5 \mu\text{M}$ Fluo-4 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 45 min à 37°C e lavadas com o tampão HEPES-glicose (50 mM HEPES, 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 5.5 mM glicose e 2 mM CaCl_2 , pH 7.4). A leitura foi realizada no fluorímetro SpectraMax® i3 (*Molecular Devices*), utilizando-se λ excitação 490 nm e λ emissão 518 nm , como descrito (DAMASCENO et al., 2014).

3.2.8 Determinação da produção de EROs

A quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi analisada medindo a oxidação da sonda não-fluorescente 2',7' – Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (CHENG et al., 2011). No interior das células, as esterases (enzimas citosólicas) desacetilam o DCFH-DA para formar um substrato oxidável e fluorescente, 2',7'- diclorofluoresceína (DCF). Resumidamente, células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^4$ cel/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após a aderência, as células foram infectadas ou não, com formas tripomastigotas cepa Y ($2,5 \times 10^5$ cel/poço) e tratadas com diferentes concentrações de memantina ($1\text{-}100 \mu\text{M}$) por 24, 48 e 72 horas. Após cada período, as células foram incubadas com $100 \mu\text{M}$ de DCFH-DA à 37°C por 30 min. A taxa de oxidação foi analisada no fluorímetro SpectraMax® i3 (*Molecular Devices*), com de λ excitação de 485 nm e λ emissão de 535 .

3.2.9 Efeito do tratamento no ciclo intracelular

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram plaqueadas para aderência em placas de 24 poços. Após aderência, as células foram infectadas com formas tripomastigotas, cepa Y ($2,5 \times 10^5$ cel/poço), provenientes de cultura celular. Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de 4 horas. Após esse período, os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos e seguiu-se o tratamento com diferentes concentrações de memantina ($10\text{-}100 \mu\text{M}$) por 72 horas. Depois desse período, retirou-se o sobrenadante de cada poço e as células foram lavadas uma vez com PBS (pH 7,4). Para

fixação das células na placa, adicionamos 100 μ L de paraformaldeído 4%, por 5 minutos. As células foram novamente lavadas uma vez com PBS (pH 7,4) e adicionou-se 100 μ L do *Hoechst* 33258 (diluído 1:2000), por 1 minuto. As células foram novamente lavadas com PBS (pH 7,4). Em seguida, foram selecionados campos aleatoriamente por microscopia de fluorescência e contados um total de 400 células. Desse total, foram contados o número de células infectadas e os dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3.3 Análises dos resultados

Os dados foram inseridos em gráficos utilizando-se o programa computacional *GraphPad Prism* versão 4.0, *GraphPad Software*. Para analisar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os dados obtidos pelos grupos experimentais, foi realizada a análise de variância: *One-Way ANOVA* e *Tukey post-test*. Para analisar os dados de sobrevida foi utilizado o teste estatístico *Log-rank test*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes, exceto que outro valor tenha sido explicitamente indicado.

4 RESULTADOS

4.1 Análises *in vivo*

4.1.1 Parasitemia e mortalidade

De acordo com os dados clínicos sobre o uso de memantina, e levando-se em consideração a concentração administrada em pacientes com doenças neurodegenerativas, selecionamos como a concentração ideal para nossos ensaios, a dose de 10 mg/kg. Para escolha da dose, foram levados em consideração os efeitos colaterais relatados para o uso de memantina em outros animais, tais como ataxia, relaxamento muscular e amnésia. Esses efeitos só foram observados em doses relativamente altas em relação às consideradas de importância terapêutica (PARSONS; DANYSZ; QUACK, 1999). Baseado nisso, camundongos da linhagem BALB/c infectados com 1×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, foram submetidos ao tratamento com memantina durante 10 dias consecutivos. Os animais submetidos ao tratamento apresentaram uma diminuição da parasitemia nos dias correspondentes ao pico parasitêmico (**Figura 4**). A memantina diminuiu a quantidade de tripomastigotas no sangue nos dias 7º a 10º d.p.i, sendo esta redução de aproximadamente 40% nos dias do pico parasitêmico.

Figura 4 – Parasitemia em camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*

Parasitemia em camundongos BALB/c infectados por via intraperitoneal com 1×10^3 formas de tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Foi avaliado o número de tripomastigotas sanguíneas nos dias equivalentes ao pico parasitêmico em camundongos infectados, tratados ou não com memantina (10mg/kg/dia) (N=40). Comparação entre os grupos tratados e não tratados com memantina ($p < 0,05$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Em relação à sobrevida dos animais tratados com memantina e o grupo controle, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. No entanto, nos quatro experimentos independentes, foi observada uma maior sobrevida dos animais tratados em relação ao controle (**Figura 5**).

Figura 5 – Taxa de sobrevida

Animais infectados, tratados ou não com memantina (10mg/kg/dia) (N=40). Comparação entre os grupos tratados e não tratados com memantina (*Log-rank test*).

4.1.2 Carga parasitária tecidual

Com o intuito de avaliar a carga parasitária tecidual, utilizamos a técnica de PCR em tempo real, adaptada da literatura (CUMMINGS; TARLETON, 2003), uma vez que os dados de parasitemia apresentaram diferenças estatísticas. O tecido que apresentou maior carga parasitária foi o coração com 3.427 ± 451 parasitas equivalentes a 5 ng de DNA tecidual ($P_E/5$ ng de DNA), seguido pelo intestino com $509.7 \pm 185.5 P_E/5$ ng de DNA, bexiga com $201.4 \pm 21.38 P_E/5$ ng de DNA e músculo esquelético, com $165.4 \pm 53.60 P_E/5$ ng de DNA. Os tecidos que apresentaram menor carga parasitária foram o baço e o fígado, com 38.10 ± 9.7 e $16.67 \pm 4.52 P_E/5$ ng de DNA, respectivamente (**Figura 6**). O tratamento com memantina não mostrou uma redução significativa da carga parasitária do intestino (**Figura 6b**), músculo esquelético (**Figura 6d**), fígado (**Figura 6f**), baço (**Figura 6e**) ou bexiga (**Figura 6c**). No entanto, no coração observou-se uma redução de 35,3% da carga parasitária, sendo esse valor estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 6a**).

Figura 6 – Carga parasitária tecidual

Mensuração da carga parasitária no 15ºd.p.i em tecidos de camundongos BALB/c infectados com 1×10^3 formas de tripomastigotas sanguíneas e submetidos ao tratamento com memantina (MEM) – 10 mg/kg/dia – durante dez dias consecutivos. **(a) Coração** (N=30), **(b) Intestino** (N=15), **(c) Bexiga** (15), **(d) Músculo esquelético** (N=15), **(e) Baço** (N=15) e **(f) Fígado** (N=15). Os gráficos mostram o número de parasitas equivalentes a 5 ng de DNA tecidual.

4.1.3 Carga parasitária tecidual cardíaca

Com o intuito de confirmar a redução da carga parasitária cardíaca, quantificamos o número de parasitas por mm^2 . Como observado na **Figura 7**, o número de ninhos de amastigota no tecido cardíaco do grupo controle apresentou 2.250 ± 0.3475 ninhos/ mm^2 , enquanto o grupo tratado com memantina apresentou 1.200 ± 0.1453 ninhos/ mm^2 , confirmando assim os dados obtidos por PCR em tempo real e demonstrando que o tratamento com memantina reduz a carga parasitária tecidual no tecido cardíaco.

Figura 7 – Densidade parasitária no tecido cardíaco

Ninhos de amastigotas por mm^2 no tecido cardíaco no 15º d.p.i. Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com 1×10^3 formas de tripomastigotas sanguíneas e submetidos ao tratamento com memantina (MEM) – 10 mg/kg/dia – durante dez dias consecutivos. Os dados são apresentados em número de ninhos por área do corte analisado.

4.2 Análises *in vitro*

4.2.1 Viabilidade Celular

Para o estudo *in vitro*, inicialmente foi avaliada a toxicidade de memantina em macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram incubadas por 24 horas (**Figura 8a**), 48 horas (**Figura 8c**) e 72 horas (**Figura 8e**) na presença de diferentes concentrações de memantina (10-800 μM) ou não (controle). Como podemos observar memantina não interfere na viabilidade das células RAW 264.7 até a concentração de 100 μM em cada período avaliado. Os valores de IC_{50} foram obtidos utilizando-se uma curva de regressão não-linear. Diante disto, determinamos os valores para 24 horas, sendo esse de $580 \pm 22 \mu\text{M}$, para 48 horas, $279 \pm 2 \mu\text{M}$, e para 72 horas, de $257 \pm 4,7 \mu\text{M}$, como observado na **Figura 8 (b), (d) e (f)**, respectivamente. Com base nesses resultados, escolhemos como limite de concentração para os seguintes ensaios, a concentração de 100 μM .

4.2.2 Determinação da concentração de LPS

Com o intuito de avaliar a produção de NO por células da linhagem RAW 264.7, incubamos as células com diferentes concentrações de LPS (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) no período de 24 horas. A produção de nitritos, avaliada pela técnica de Griess, aumentou com a concentração de LPS utilizada para estimular as células, refletindo assim um aumento na produção de NO (**Figura 9**). Baseado neste dado, utilizamos como concentração padrão para os seguintes ensaios, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 8 – Viabilidade celular em células RAW 264.7

Avaliação da viabilidade celular em células RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de memantina (10-800 μ M), incubadas por (a) 24 horas, (c) 48 horas e (e) 72 horas. O IC_{50} determinado foi (b) 580 ± 22 μ M (d) 279 ± 2 μ M e (f) $257 \pm 4,7$ μ M, para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Comparação entre os grupos tratados e não tratados com memantina ($p < 0,05$). Dados expressos em porcentagem $\pm$ desvio padrão.

Figura 9 – Produção de NO em função da concentração de LPS.

Células da linhagem RAW 264.7 (1×10^6 células/poço) foram submetidas ao estímulo com diferentes concentrações de LPS (1–100 $\mu\text{g/mL}$). As células foram incubadas por 24 horas. Após esse período foi avaliada a produção de nitritos por reação de Griess. ($p < 0,05$).

4.2.3 Cinética da ativação da linhagem celular RAW 264.7

Após a determinação da concentração de LPS em células da linhagem RAW 264.7 foi necessário avaliar a produção de NO em diferentes tempos, utilizando como estímulo a concentração de LPS de 10 $\mu\text{g/mL}$, com o intuito de verificar em qual momento teríamos um pico na produção de NO. A dosagem de óxido nítrico no sobrenadante de células RAW 264.7 estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) apresentou um aumento significativo no período de 24 horas, seguido por um perfil de platô em 48 e 72 horas (**Figura 10**).

Figura 10 – Cinética da ativação de células RAW 264.7

Dosagem de nitritos no sobrenadante da linhagem celular RAW 264.7 incubadas em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$).

4.2.4 Avaliação do tratamento com memantina em linhagem celular RAW 264.7

Uma vez definido a concentração de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) e o período equivalente ao pico na produção de NO (24 horas), seguimos o tratamento com memantina (1-100 μM), com o intuito de verificar se o tratamento poderia interferir na produção de óxido nítrico, uma vez que, este é um fator citostático e citotóxico na resposta imune. Como observado, memantina não interferiu na produção de NO quando as células não foram estimuladas (**Figura 11a**). No entanto, quando as células foram estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) (**Figura 11b**), memantina apresentou uma redução na produção de NO, porém, a concentração de 100 μM não interferiu na produção de NO, o que poderia sugerir um efeito pró-oxidante.

Figura 11 – Efeito de memantina na produção de NO

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram submetidas ao estímulo com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) ou não. As células foram incubadas com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) por 24 horas. Após esse período foi avaliada a produção de nitritos por reação de Griess. **(a)** Sem estímulo com LPS, **(b)** Estimuladas com LPS. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$).

4.2.5 Avaliação dos níveis de cálcio intracelular

Sabe-se que a ativação patológica dos receptores de NMDA, seja por mecanismos diretos ou indiretos, resulta no acúmulo de cálcio intracelular (ZIPFEL et al., 2000) e que nesta condição, memantina pode produzir efeitos benéficos nas funções cognitivas, protegendo o cérebro dos níveis tóxicos do cálcio. Diante disso, avaliamos também a concentração de cálcio intracelular na linhagem celular RAW 264.7, submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) e estimuladas ou não com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$).

Como se pode observar na **Figura 12**, a exposição das células ao tratamento com memantina, estimuladas com LPS (10 µg/mL), apresentou uma diminuição do Ca^{2+} intracelular. Quando as células foram expostas a concentrações crescentes de memantina (1-100 µM), foi possível verificar que quanto maior a concentração, menor foram os níveis de cálcio intracelular, sugerindo assim, um perfil dose-dependente. No entanto, não foi observado diferenças nos níveis de cálcio intracelular das células que não foram estimuladas.

Figura 12 – Representação gráfica dos níveis intracelulares de Ca^{2+}

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram submetidas ao estímulo com LPS (10 µg/mL) ou não. As células foram incubadas com diferentes concentrações de memantina (1-100 µM) por 24 horas. Após esse período as células foram incubadas com 5 µM de FLUO-4 AM, por 1 hora, à 33°C. A avaliação foi realizada no fluorímetro *SpectraMax i3* (Molecular Devices), utilizando-se λ excitação 490 nm e λ emissão 518. **($p < 0,01$).

4.2.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A ativação constante dos receptores de NMDA leva a um excessivo influxo de íons cálcio nos neurônios, que gera EROs, que ativam a óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988). Como no nosso modelo de linhagem celular a produção de óxido nítrico não é dependente de cálcio, resolvemos avaliar a produção de EROs em células da linhagem RAW 264.7, incubadas por um período de 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações de memantina (1-100 µM). Como observado na **Figura 13**, memantina não promoveu a diminuição de EROs, o qual apresentou um efeito dose-dependente, sugerindo assim que memantina em concentrações acima de 50 µM apresenta um perfil pró-oxidante, resultando, portanto, em estresse oxidativo.

Figura 13 – Representação gráfica dos níveis de EROs

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) incubadas com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as células foram incubadas com 100 μM de DCFH-DA, por 30 min, à 37 °C. A avaliação foi realizada no fluorímetro *SpectraMax i3* (Molecular Devices), utilizando-se λ excitação 495 nm e λ emissão 535. Os dados foram expressos em Unidades Arbitrárias de Fluorescência (UA).

Baseado nesses dados, verificamos também o efeito de memantina na infecção. Células da linhagem RAW 264.7 foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes de cultura de células, na proporção de 1:10 (célula : parasita). Após 3 horas de infecção, as células foram incubadas com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) por 24, 48 e 72 horas. Como observado na **Figura 14**, memantina promoveu o aumento na produção de EROS em células infectadas.

Figura 14 – Representação gráfica dos níveis de EROs em células infectadas

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ parasitas/poço) provenientes de cultura celular, incubadas com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM) por 24, 48 e 72 horas. Após esse período as células foram incubadas com 100 μM de DCFH-DA, por 30 min, a 37 °C. A avaliação foi realizada no fluorímetro *SpectraMax i3* (Molecular Devices), utilizando-se λ excitação 495 nm e λ emissão 535. Os dados foram expressos em Unidades Arbitrárias de Fluorescência (UA).

4.2.7 Efeito do tratamento no ciclo intracelular

Com o objetivo de verificar o efeito de memantina no ciclo intracelular do *T. cruzi*, avaliou-se o efeito do tratamento após a infecção. Células RAW 264.7 foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes de cultura celular e, após invasão pelos parasitas, seguiu-se com o tratamento com diferentes concentrações de memantina (1-100 μM), por 72 horas. Como observado na **Figura 15**, o tratamento com memantina reduziu significativamente o número de células infectadas em todas as concentrações testadas, em relação ao grupo controle.

Figura 15 – Representação gráfica do efeito de memantina no ciclo intracelular

Células da linhagem RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ parasitas/poço) provenientes de cultura celular, incubadas com diferentes concentrações de memantina (10-100 μM) por 72 horas. Após esse período as células foram incubadas com **Hoechst** (1:2000), por 1 min. As células foram observadas em microscopia de fluorescência, utilizando-se λ excitação 350 nm e λ emissão 460. Foram contadas 400 células. Os dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$). ***($p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

Memantina é uma droga antagonista, não-competitiva, do receptor voltagem-dependente N-metil-D-aspartato (NMDA), que em condições patológicas bloqueia os efeitos dos níveis elevados de glutamato (DANYSZ et al., 2000). Atualmente, memantina é utilizada no tratamento de pacientes em estágios moderado a grave da doença de Alzheimer (DA). O receptor de NMDA pertence à família de receptores de glutamato ionotrópicos e estão envolvidos em uma variedade de funções e processos do sistema nervoso central (SNC) (GONDA, 2012). Em mamíferos, desempenham importantes funções fisiológicas e, apesar da predominância no SNC, os receptores NMDA também foram identificados em sítios periféricos e viscerais, localizados na membrana pós-sináptica dos dendritos (GONDA, 2012; VON DONGEN, 2009).

Em *T. cruzi*, não existem relatos na literatura da caracterização do receptor de glutamato do tipo NMDA. No entanto, nosso grupo mostrou que *T. cruzi* é sensível a memantina de uma forma compatível com a presença de um receptor com funções análogas (DAMASCENO et al., 2014). Por sua vez, Paveto e colaboradores sugerem um mecanismo similar realizado pela enzima NOS de mamíferos, como descrito em células nervosas e endoteliais (PAVETO et al., 1995). Pereira e colaboradores (1997) demonstraram em seu trabalho que a estimulação da atividade da GMPc quando mediada por NO pode ser responsável pelo aumento da motilidade em epimastigotas, relatando que a motilidade pode ser controlada por agonistas, intermediários e efetores da via de sinalização de NO (PEREIRA et al., 1997). Diante disto, no presente trabalho, foi avaliado o potencial terapêutico de memantina na infecção experimental pelo *T. cruzi* (*in vivo* e *in vitro*), tendo como base para esse estudo o trabalho de Damasceno e colaboradores onde os autores demonstraram que a forma intracelular (amastigota), é a forma mais susceptível ao tratamento com memantina, com IC₅₀ de 31 µM (DAMASCENO et al., 2014).

Animais infectados com formas tripomastigotas, cepa Y e submetidos ao tratamento com memantina (10 mg/kg/dia), durante 10 dias consecutivos, apresentaram uma redução de aproximadamente 40% da parasitemia nos dias equivalentes ao pico parasitêmico (8º-9º d.p.i) em relação o grupo controle. Dados da literatura evidenciam que as doses de 10 mg/dia ou 20 mg/dia, apresentam benefícios do uso de memantina quando comparada ao grupo controle no tratamento da DA. Esses dados mostraram uma melhora na capacidade funcional das atividades cotidianas e dos distúrbios comportamentais característicos da DA. Outros dados sugerem uma farmacocinética linear no intervalo de dose entre 10 e 40 mg. Esses dados

corroboram com a eficácia da concentração utilizada nesse trabalho, onde doses terapêuticamente relevantes levam a níveis plasmáticos de aproximadamente 1 μM (KORNHUBER; QUACK, 1995), fornecendo assim proteção tanto *in vivo* como *in vitro* em uma variedade de modelos de sistemas relevantes à toxicidade mediada pelo receptor de NMDA.

Em relação à sobrevida, em nosso modelo experimental não foi observada uma diferença significativa entre os camundongos infectados e tratados e os não tratados. No entanto, sabe-se, que a infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* em camundongos é caracterizada por uma alta parasitemia, grande disseminação do parasito e imunossupressão, acarretando alta taxa de mortalidade (MINOPRIO et al., 1989), o qual não foi revertida pelo tratamento com memantina na concentração utilizada. Além do mais, dados da literatura evidenciam que a cepa Y, utilizada nesse trabalho, apresenta alta virulência e patogenicidade para camundongos, com taxa de mortalidade de 100%, independente do tamanho do inóculo, o que possivelmente justificaria os dados de sobrevida observados nesse trabalho.

Durante a fase aguda da doença de Chagas, sabe-se que os parasitas se distribuem através de muitos tecidos do hospedeiro. Diante disto, Cummings e Tarleton (CUMMINGS; TARLETON, 2003) desenvolveram uma técnica de PCR quantitativa que fornece uma detecção sensível e precisa do parasita nos tecidos de camundongos infectados, uma vez que, as técnicas utilizadas para detectar *T. cruzi* nos tecidos, tais como: hematoxilina e eosina, PCR *in situ* e PCR competitiva, são semi-quantitativas. Baseado na sensibilidade e precisão da técnica acima descrita, em identificar variações na carga parasitária tecidual em animais infectados com diferentes cepas, diferentes períodos pós-infecção e variações de doses de infecção, avaliamos seis tecidos (coração, intestino, músculo esquelético, fígado, baço e bexiga) no 15ºd.p.i.

Nossos dados, mostraram uma alta carga parasitária no coração com 3427 ± 451 parasitas equivalentes a 5 ng de DNA tecidual ($P_E/5$ ng de DNA). Como visto, memantina, na dose utilizada, foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária tecidual nesse tecido em aproximadamente 35,3%, embora nos demais tecidos, não tenhamos observado diferenças em relação ao controle. Segundo Melo e Brener (MELO; BRENER, 1978), animais inoculados com formas tripomastigotas, cepa Y, apresentaram uma carga parasitária extremamente alta no 7º e 8º d.p.i, no baço, fígado e medula óssea, o que justificaria o motivo pelo qual não observamos diferenças significativas e uma carga parasitária consistente em nossos dados, sendo o baço e o fígado, os tecidos que apresentaram menor carga parasitária, com 38.10 ± 9.7 e $16.67 \pm 4.52 P_E/5$ ng de DNA, respectivamente. Nesse mesmo trabalho, foi

observado que os tecidos como: bexiga, pulmão, coração, músculo esquelético e intestino, avaliados antes do 11ºd.p.i, apresentaram uma carga parasitária relativamente baixa em relação ao controle. Diante disso, os autores sugerem que o tropismo e o comportamento da cepa deve ser levados em consideração, uma vez que, a cepa Y de *T. cruzi*, é uma cepa reticulotrópica e infecta preferencialmente macrófagos (ANDRADE; LOPES, 1963). Quando avaliamos o número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, nossos resultados apontam que o grupo controle apresenta em média 2.250 ± 0.3475 ninhos/mm², enquanto o animais tratados com memantina (10 mg/kg/dia), apresentaram em média 1.200 ± 0.1453 ninhos/mm², fortalecendo assim os dados obtidos por PCR em tempo real no tecido cardíaco. Esses dados em conjuntos, corroboram com os resultados apresentados por Dasmasceno e colaboradores, quando mostraram que a forma amastigota é a forma mais susceptível com memantina (DAMASCENO et al., 2014).

Quando avaliamos o efeito de diferentes concentrações de memantina sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7, por diferentes tempos: 24 horas ($IC_{50} = 580 \pm 22 \mu M$), 48 horas ($IC_{50} = 279 \pm 2 \mu M$) e 72 horas ($IC_{50} = 257 \pm 4,7 \mu M$), assim nossos resultados demonstram que memantina não interfere na viabilidade das células até a concentração de 100 μM . Prado (PRADO, 2012), demonstrou em células neurais (Neuro-2A), pré-tratadas com memantina (0,5 – 50 μM), um aumento no poder redutor mitocondrial, onde foi constatado que em concentrações baixas, memantina agiria de maneira a diminuir o excesso do influxo de cálcio, aumentando assim o poder redutor mitocondrial. No entanto, em nossos dados, a concentração de 100 μM mostrou um aumento semelhante na função mitocondrial em relação ao controle.

Chen e colaboradores (CHEN et al., 2012), em seu trabalho, observaram que memantina em baixas doses pode exercer um papel anti-inflamatório e neuroprotetivo, embora os efeitos anti-inflamatórios ainda são incertos. Esses achados corroboram com nossos dados, onde houve uma diminuição na produção de NO por células da linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS (10 $\mu g/mL$), nas concentrações de 10 e 50 μM de memantina. Ainda assim, a concentração de 100 μM de memantina, sugere um efeito pró-oxidante em nosso ensaio. Sabe-se que o potencial efeito de memantina como agente neurotransmissor em modelos pré-clínicos já é bem estabelecido e que esse efeito neuroprotetor é geralmente visto em concentrações entre 10-50 μM . Volbracht e colaboradores (VOLBRACHT et al., 2006) confirmaram esses dados e acrescentaram a dose mínima efetiva de memantina como 1 μM . Estudos recentes têm demonstrado que memantina também pode inibir os canais de potássio sensíveis a ATP (K^{+}_{ATP}) em neurônios da substância negra (dopaminérgicos) (GIUSTIZIERI

et al., 2007) e suprimir as correntes internas induzidas por eletroporação (WU et al., 2011). Deste modo, Tsai e colaboradores (TSAI; CHANG; WU, 2013), demonstraram que o IC₅₀ de memantina para a inibição dos canais de potássio de retificação interna (I_{K(IR)}) corresponde a aproximadamente 12 µM em células da linhagem RAW 264.7 e justificam que o valor obtido é bem maior que a concentração de memantina no plasma humano, aproximadamente 0.05 – 0.2 µM. Esses canais atuam como sensores metabólicos e são sensíveis à ATP, ou seja, quando os níveis de cálcio estão elevados, ocorre o fechamento do canal. Damasceno e colaboradores (DAMASCENO et al., 2014) demonstraram que memantina afeta o metabolismo energético do parasita com diminuição dos níveis de ATP e desencadeia mecanismos que levam a apoptose em forma epimastigotas (cepa CL, clone 14).

Em células neuronais, diversos trabalhos têm relatado que o tratamento com memantina pode também afetar os receptores dopaminérgicos, bloqueando o excesso do influxo de cálcio e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzidas por peptídeos β-amiloóides (Aβ). Sabe-se que a secreção de Aβ possui uma atividade antioxidante, ou seja, contribui como antagonista, protegendo as células do estresse oxidativo causado pela excessiva geração de EROs e anomalias mitocondriais (DE FELICE et al., 2007). Em nosso trabalho, a avaliação dos níveis de cálcio intracelular em células da linhagem RAW 264.7, demonstraram um perfil dose-dependente, ou seja, o tratamento com memantina (1-100 µM) diminuiu os níveis de cálcio intracelular tanto em células estimuladas, como não estimuladas por LPS (10 µg/mL), sugerindo que memantina foi capaz de bloquear o receptor de NMDA na linhagem celular utilizada nesse estudo, fortalecendo assim, os trabalhos anteriores, onde se tem demonstrado a existência dos receptores de NMDA em células da linhagem RAW 264.7 (SPENTZAS et al., 2011). Em linfócitos, tem sido reportado que os receptores de NMDA estão envolvidos na regulação dos níveis de cálcio intracelular (LOMBARDI et al., 2001), assim como nos níveis de EROs (TUNEVA; BYCHKOVA; BOLDYREV, 2003) e na modulação da síntese de citocinas (LIU et al., 2011). De acordo com Hamasato e colaboradores (HAMASATO et al., 2013), células imunes podem expressar diferentes receptores de neurotransmissores.

Para avaliar o efeito de memantina em relação ao estresse oxidativo celular, utilizamos uma técnica que fornece os níveis de peróxidos citoplasmáticos. Através dessa técnica, tanto em células não infectadas, como em células infectadas, a produção de ROS se mostrou elevada, de forma dose-dependente, com um pico máximo em 24 horas de exposição ao tratamento com memantina (1-100 µM).

O aumento da produção de EROs no nosso modelo, exposto a diferentes concentrações de memantina, pode ser explicado devido ao período de exposição ao tratamento, uma vez que após 48 horas de exposição, a produção de EROs tende a ser diminuída. McAllister e colaboradores (MCALLISTER et al., 2008) avaliaram a exposição crônica de memantina, em células percussoras neural (NT2) nesse trabalho os autores incubaram as células por duas semanas e, utilizando o ensaio de DCFH-DA, constataram que memantina na concentração baixa de 10 μ M e alta de 60 μ M não apresenta diferenças nos níveis de peróxido citoplasmático em relação ao controle, no entanto, através do ensaio de amplex red, o qual mensura a produção de peróxido de mitocôndria isoladas, foi constatado o aumento dos níveis de peróxido mitocondrial nas mesmas concentrações utilizadas.

Nossos resultados sugerem que o tratamento com memantina apresenta um efeito tripanocida e pode direcionar o sistema imune de modo a modular os receptores de NMDA, através de um efeito direto ou indireto produzido pelo tratamento.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que:

1. O tratamento com memantina (10 mg/kg/dia) apresentou uma redução da parasitemia nos dias do pico parasitêmico.
2. Em relação à sobrevivência, não foram observadas diferenças significativas, embora o tratamento tenha apresentado uma maior sobrevivência dos animais tratados em relação ao controle.
3. A memantina, na dose utilizada, foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária no tecido cardíaco no 15º d.p.i, em aproximadamente 35,3%. Além disso, a análise histológica mostrou uma diminuição no número de ninhos de amastigota por mm² no grupo tratado com memantina (10 mg/kg/dia) em relação ao grupo controle, corroborando assim com os dados obtidos por PCR em tempo real.
4. A memantina não interfere na viabilidade das células de linhagem RAW 264.7 até a concentração de 100 µM nos períodos de 24, 48 e 72 horas.
5. A memantina apresentou uma redução da produção de NO por células da linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS (10 µg/mL) em concentrações baixas, porém, a concentração de 100 µM não interferiu na produção de NO, o que poderia sugerir um efeito pró-oxidante.
6. A exposição das células da linhagem RAW 264.7 ao tratamento com memantina (1-100 µM), estimuladas com LPS (10 µg/mL), apresentou uma diminuição do cálcio intracelular.
7. A memantina (1-100 µM) não promoveu a diminuição de EROs em células da linhagem RAW 264.7, estimuladas com LPS (10 µg/mL), apresentando um efeito dose-dependente, sugerindo assim que memantina em concentrações altas apresenta um perfil pró-oxidante, resultando assim estresse oxidativo. O mesmo perfil foi observado quando as células da linhagem RAW 264.7 foram infectadas com *T. cruzi*.
8. O tratamento com memantina (1-100 µM) apresentou uma redução significativamente no número de células da linhagem RAW 264.7 infectadas.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 231-244, Nov 1996.
- ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 6, p. 1961-1977, Jun 1996.
- ALMEIDA-DE-FARIA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form. **Exp. Parasitol.**, v. 92, n. 4, p. 263-274, August 1999.
- ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 274-279, Apr-May 2007.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 10, p. 819-823, Oct 2005.
- ANDRADE, S. G. et al. [Recovery and characterization of trypanosomas inoculated into immune animals (re-inoculation with different strains of *T. cruzi*)]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 12, n. 6, p. 395-402, Nov-Dec 1970.
- ANDRADE, Z. [The pathology of Chagas disease in man]. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, v. 65, p. 15-30, 1985. Suppl 1.
- ANDRADE, Z. A.; LOPES, E. A. A Histochemical Study of Experimental Chagas' Disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 5, p. 236-242, Sep-Oct 1963.
- BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, Sep 15 2006.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, November 2003.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Adv. Parasitol.**, v. 75, p. 19-47, 2011.
- BITTENCOURT, A. L. Congenital Chagas disease. **Am. J. Dis. Child.**, v. 130, n. 1, p. 97-103, Jan 1976.
- BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. Cell. Biol.**, v. 106, n. 4, p. 1349-1358, Apr 1988.
- BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 6B, p. 1373-1384, Jun 2010.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 4, p. 389-396, Nov-Dec 1962.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 13, n. 3, p. 171-178, May-Jun 1971.

_____. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 5, p. 220-224, Sep-Oct 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, n. 2, p. 103-110, Oct 1997.

CAMPOS, M. A. et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J. Immunol.**, v. 172, n. 3, p. 1711-1718, Feb 1 2004.

CAMPOS, M. A.; GAZZINELLI, R. T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. **Mediators Inflamm.**, v. 13, n. 3, p. 139-143, Jun 2004.

CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 79, n. 3, p. 297-308, 1984.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-595, Dec 2007.

CAZZULO, J. J. et al. NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 64, n. 1, p. 129-131, 1979.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909a.

_____. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um trypanozoma, *Trypanozoma cruzi*: Nota prévia. **Brazil-Medico** v. 23, n. 16, p. 161, 1909b.

CHEN, P. E.; WYLLIE, D. J. Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. 8, p. 839-853, Apr 2006.

CHEN, S. L. et al. Low-dose memantine attenuated morphine addictive behavior through its anti-inflammation and neurotrophic effects in rats. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 7, n. 2, p. 444-453, Jun 2012.

CHENG, W. W. et al. Single-walled carbon nanotube induction of rat aortic endothelial cell apoptosis: Reactive oxygen species are involved in the mitochondrial pathway. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 43, n. 4, p. 564-572, Apr 2011.

CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci.**, v. 13, p. 171-82, 1990.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 16, n. 3, p. 315-327, Sep 1985.

CORTEZ, C. et al. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. 1804, 2012.

COURA, J. R. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 113-117, 2006. Suppl 3.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, Jul 2009. Suppl 1.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 129, n. 1, p. 53-59, Jun 2003.

_____. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 7, p. 4081-4089, Jul 2004.

DA SILVA MELO, P.; DURAN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. **Toxicol. Lett.**, v. 116, n. 3, p. 237-242, Aug 16 2000.

DAMASCENO, F. S. et al. Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 2, p. 2717, Feb 2014.

DANYSZ, W. et al. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. **Neurotox. Res.**, v. 2, n. 2-3, p. 85-97, 2000.

DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, v. 53, n. 2, p. 83-98, Apr 1993.

DE FELICE, F. G. et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 15, p. 11590-11601, Apr 13 2007.

DEANE, L. M. Animal Reservoirs of *Trypanosoma Cruzi* in Brazil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 16, p. 27-48, Jan-Mar 1964.

DIAS, J. C. [The clinical, social and occupational aspects of Chagas disease in an endemic area under the control of the state of Minas Gerais, Brazil]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 26, n. 2, p. 93-99, Apr-Jun 1993.

DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. Toll-like receptors: from the discovery of NF-kappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 9, p. 1102-1113, Oct 30 2006.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 12, p. 581-587, Dec 2005.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, Mai/Jun 2005.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, n. 1, p. 29-58, Jan 2001.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 385-388, Nov 24 1988.

GAZZINELLI, R. T. et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, n. 6, p. 1792-1796, Mar 15 1992.

GERZON, K. et al. The Adamantyl Group in Medicinal Agents. I. Hypoglycemic N-Arylsulfonyl-N' - Adamantylureas. **J. Med. Chem.**, v. 6, p. 760-763, Nov 1963.

GIUSTIZIERI, M. et al. Memantine inhibits ATP-dependent K⁺ conductances in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 322, n. 2, p. 721-729, Aug 2007.

GONDA, X. Basic pharmacology of NMDA receptors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, n. 12, p. 1558-1567, 2012.

GORON, S. M.; DUBNER, R.; DIONNE, R. A. Antihyperalgesic effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan in the oral surgery model. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 39, n. 2, p. 139-146, Feb 1999.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, Oct 1982.

GROSSMANN, W.; SCHUTZ, W. [Memantine and neurogenic bladder disorders within the bounds of spastic conditions]. **Arzneimittelforschung**, v. 32, n. 10, p. 1273-1276, 1982.

GUARNER, J. et al. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 2, p. 152-158, Aug 2001.

HAMASATO, E. K. et al. Effects of MK-801 and amphetamine treatments on allergic lung inflammatory response in mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 16, n. 4, p. 436-443, Aug 2013.

HEWITT, D. J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. **Clin. J. Pain**, v. 16, n. 2, p. 73-79, Jun 2000.

HOARE, C. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK 1972.

HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, v. 36, n. 2, p. 150-153, Mar-Apr 1989.

JARVIS, B.; FIGGITT, D. P. Memantine. **Drugs Aging**, v. 20, n. 6, p. 465-476; discussion 477-8, 2003.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 12, p. 29, 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, May 27 2011.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease)--a tropical disease now in the United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 9, p. 639-644, Aug 26 1993.

KORNHUBER, J.; QUACK, G. Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. **Neurosci. Lett.**, v. 195, n. 2, p. 137-139, Aug 4 1995.

KRASSNER, S. M.; SYLVESTER, D.; MUNSON, K. B. Proline metabolism in *Trypanosoma scelopori*. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 2, p. 258, 1973.

- LAURIA-PIRES, L.; BOGLIOLO, A. R.; TEIXEIRA, A. R. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients. II. Isozyme and RFLP Characterizations. **Exp. Parasitol.**, v. 82, p. 182-190, 1996.
- LIU, C. H. et al. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 suppresses glial pro-inflammatory cytokine expression in morphine-tolerant rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 99, n. 3, p. 371-380, Sep 2011.
- LOMBARDI, G. et al. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, n. 6, p. 936-944, Jul 2001.
- MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, Mar 1998.
- MACEDO, A. M. et al. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 407-413, Apr 2001.
- MACÊDO, V. **Forma indeterminada da doença Chagas.** J Bras Med. 38: 34-40 p. 1980.
- MAGDALENO, A. et al. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. 4534, 2009.
- MARINELLI, L. et al. Homology Modeling of NR2B Modulatory Domain of NMDA Receptor and Analysis of Ifenprodil Binding. **Chem. Med. Chem.**, v. 2, n. 10, p. 1498-1510, 2007.
- MARTINS, R. M. et al. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 3023-3032, Jul 2009.
- MAZZA, S. M., A.; BENITEZ, C.; JUZIN, E. Transmission Del "*Schyzotripanum cruzi*" al niño por leche de La madre com enfermedad de Chagas. **Publ. Mepra**, v. 28, p. 41-46, 1936.
- MCALLISTER, J. et al. Effects of memantine on mitochondrial function. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, n. 4, p. 956-964, Feb 15 2008.
- MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, v. 64, n. 3, p. 475-482, Jun 1978.
- MILLER, G. E.; COHEN, S.; RITCHEY, A. K. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. **Health Psychol.**, v. 21, n. 6, p. 531-541, Nov 2002.
- MILTNER, F. O. [Value of symptomatic therapy with memantine in cerebral coma. II. Development of stretch synergisms in coma with brain stem symptoms]. **Arzneimittelforschung**, v. 32, n. 10, p. 1271-1273, 1982.
- MINOPRIO, P. et al. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. Rev.**, v. 112, p. 183-207, Dec 1989.
- MISZTAL, M. et al. Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid--protection by MK-801 and memantine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 296, n. 1, p. 1-8, Jan 18 1996.
- MOREIRA, D. R. et al. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Curr. Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 212-231, Mar 2009.

- MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 359-364, Aug 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.
- MURTA, S. M. et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 93, n. 2, p. 203-214, Jun 1 1998.
- NAULA, C.; SEEBECK, T. Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 1, p. 35-38, Jan 2000.
- O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 158-160, 2008.
- PADILLA, A. et al. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 1, p. 231-235, Jan 2007.
- PARSONS, C. G.; DANYSZ, W.; QUACK, G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 6, p. 735-767, Jun 1999.
- PARSONS, C. G.; GILLING, K. Memantine as an example of a fast, voltage-dependent, open channel N-methyl-D-aspartate receptor blocker. **Methods Mol. Biol.**, v. 403, p. 15-36, 2007.
- PARSONS, C. G.; STOFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 6, p. 699-723, Nov 2007.
- PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. J. N. The role of nitric oxide in immune response against *Trypanosoma cruzi* infection. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 2, n. 1-6, 2010.
- PAVETO, C. et al. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 28, p. 16576-16579, Jul 14 1995.
- PEREIRA, C. et al. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. **J. Eukaryot Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 155-156, Mar-Apr 1997.
- PIN, J. P. et al. Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 21, p. 10331-10335, Nov 1 1992.
- PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 9, n. 6, p. 423-436, Jun 2008.
- PRADO, P. A. F. **Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do Ebselen, Ácido caféico e Memantina em células neurais (NEURO-2A) in vitro.** . Fevereiro. 2012
- RASSI, A., JR.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 26, n. 2, p. 275-291, Jun 2012.
- RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav. Brain Res.**, v. 140, n. 1-2, p. 1-47, Mar 18 2003.

ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 50, p. 52270-52281, Dec 10 2004.

ROHLOFF, P.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, n. 2, p. 219-230, Feb 2003.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1041-7, Nov 2002.

SCHMID, R. L.; SANDLER, A. N.; KATZ, J. Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes. **Pain**, v. 82, n. 2, p. 111-125, Aug 1999.

SCHMIDT, W. J. Behavioural effects of NMDA-receptor antagonists. **J. Neural Transm. Suppl.**, v. 43, p. 63-69, 1994.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, Oct 30 2007. Suppl 1.

SCHNEIDER, E. et al. [Effects of oral memantine administration on Parkinson symptoms. Results of a placebo-controlled multicenter study]. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 109, n. 25, p. 987-990, Jun 22 1984.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 32, n. 1, p. 16-27, Jan-Feb 1990.

SILBER, A. M. et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr. Drug Targets Infect Disord.**, v. 5, n. 1, p. 53-64, Mar 2005.

SILBER, A. M. et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol.**, v. 36, n. 2, p. 157-63, Feb 2006.

SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, n. 1, p. 102-108, Nov 2009.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infec. Immun.**, v. 6, n. 12, p. 4862-4867, December 1992.

SOEIRO, M. N.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, n. 1, p. 105-121, Jan 2009.

SPENTZAS, T. et al. Ketamine inhibits tumor necrosis factor secretion by RAW264.7 murine macrophages stimulated with antibiotic-exposed strains of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Immunol.**, v. 12, p. 11, 2011.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol B.**, v. 55, n. 3B, p. 443-447, 1976.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Curr. Protoc. Immunol.**, v. Chapter 14, p. Unit 14 12, May 2007.

- TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, n. 4, p. 400-419, Oct 1992.
- TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 430-434, Aug 2007.
- TOLEDO, M. J. O. et al. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Antimicrob. Agents e Chemother.**, p. 11-22, 2004.
- TONELLI, R. R. et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Microbiol.**, v. 6, n. 8, p. 733-741, Aug 2004.
- TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 179-190, Mar 2007.
- TSAI, K. L.; CHANG, H. F.; WU, S. N. The inhibition of inwardly rectifying K⁺ channels by memantine in macrophages and microglial cells. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 31, n. 6, p. 938-951, 2013.
- TUNEVA, E. O.; BYCHKOVA, O. N.; BOLDYREV, A. A. Effect of NMDA on production of reactive oxygen species by human lymphocytes. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 136, n. 2, p. 159-161, Aug 2003.
- UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptors and Type I interferons. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 21, p. 15319-15323, May 25 2007.
- URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop.**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, Jul-Aug 2010.
- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, Nov 1994.
- VOLBRACHT, C. et al. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. **Eur. J. Neurosci.**, v. 23, n. 10, p. 2611-2622, May 2006.
- VON DONGEN, A. M. Biology of the NMDA Receptor. **Frontiers Neuroscience**, v. 978, n. 1, p. 4200-4414, 2009.
- WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front. Aging Neurosci.**, v. 2, p. 12, 2010.
- WESEMANN, W.; SONTAG, K. H.; MAJ, J. [Pharmacodynamics and pharmacokinetics of memantine]. **Arzneimittelforschung**, v. 33, n. 8, p. 1122-1134, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Italy, p. 25-27, 2012.
- WU, S. N. et al. Inhibitory effect of memantine, an NMDA-receptor antagonist, on electroporation-induced inward currents in pituitary GH3 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 405, n. 3, p. 508-513, Feb 18 2011.
- YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 101-7, Jul 2009. Suppl 1.
- ZELEDON, R.; RABINOVICH, J. E. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 26, p. 101-133, 1981.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect. Dis.**, v. 180, n. 2, p. 480-486, Aug 1999.

ZHU, J.; MOHAN, C. Toll-Like Receptor Signaling Pathways—Therapeutic Opportunities. **Mediators of Inflammation**, 2010.

ZILBERSTEIN, D. Transport of nutrients and ions across membranes of trypanosomatid parasites. **Adv. Parasitol.**, v. 32, p. 261-291, 1993.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov 2009.

ZIPFEL, G. J. et al. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. **J. Neurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 857-869, Oct 2000.