

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação do potencial terapêutico de antioxidantes
naturais na doença de Chagas experimental**

Maiara Voltarelli Providello

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Determinação do potencial terapêutico de antioxidantes
naturais na doença de Chagas experimental**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biotecnologia
Aplicada à Farmácia.

Orientada: Maiara Voltarelli Providello

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada a Farmácia em 30/06/2017. A
versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto

2017

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

Providello, Maiara Voltarelli

Determinação do potencial terapêutico de antioxidantes naturais na doença de Chagas experimental. Ribeirão Preto, 2017.

82 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientador: de Albuquerque, Sérgio.

1. Antioxidantes 2. Doença de Chagas 3. Estresse oxidativo

RESUMO

PROVIDELLO, M. V. **Determinação do potencial terapêutico de antioxidantes naturais na doença de Chagas experimental.** 2017. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Sete milhões de pessoas são acometidas pela doença de Chagas atualmente. A patologia endêmica em vinte e um países na América Latina tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Existe hoje a necessidade por novas alternativas terapêuticas, pois os fármacos atualmente utilizados apresentam eficácia limitada na fase crônica, trazendo toxicidade relacionada especialmente ao dano oxidativo, devido ao princípio ativo destes medicamentos, além de ser parte natural da infecção. Antioxidantes vêm sendo estudados na terapia da doença e os resultados parecem promissores. Avaliamos ácido ascórbico (AA), cianocobalamina (B₁₂) e melatonina (MEL) sozinhos e associados a uma dose subclínica de benzonidazol (BZ). O objetivo foi determinar os efeitos destas substâncias no desenvolvimento da fase aguda. Para isso, utilizamos camundongos *Swiss*, infectados com *T. cruzi* cepa Y. Os resultados mostram sinergia na associação AA+BZ10 em reduzir a parasitemia; concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular e os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no coração também foram diminuídos. AA e AA+BZ10 promoveram redução do parasitismo cardíaco detectado por qPCR e análises histológicas. AA+BZ10 mostrou redução no infiltrado inflamatório cardíaco. B₁₂ ou B₁₂+BZ10 não foram eficazes em reduzir a parasitemia. Observou-se uma redução do infiltrado inflamatório cardíaco para B₁₂+BZ10, além do combate a EROs intracelular. No grupo B₁₂ foi detectado o aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). MEL e MEL+BZ10 reduziram a parasitemia, porém não foram eficazes na diminuição de EROs intracelular. Níveis de TBARS cardíacos foram reduzidos no grupo MEL e um aumento na atividade da SOD foi observado para MEL e MEL+BZ10. Nestes grupos, o parasitismo cardíaco e o infiltrado inflamatório foram reduzidos. Estes dados revelam que possa haver benefício no uso de antioxidantes na terapia da doença de Chagas, seja por ação tripanocida ou pela atenuação do dano oxidativo que em longo prazo podem resultar em maior preservação tecidual.

Palavras – chave: Ácido ascórbico; antioxidantes; cianocobalamina; doença de Chagas; estresse oxidativo; melatonina

ABSTRACT

PROVIDELLO, M. V. **Determination of the therapeutic potential of natural antioxidants in experimental Chagas' disease.** 2017. 82f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Seven million people are currently afflicted with Chagas' disease. The endemic pathology in twenty one Latin America countries has as its etiological agent the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It is necessary new therapeutic alternatives for this disease, because the drugs currently used have limited efficacy in the chronic phase, and have toxicity especially related to oxidative damage, due to the active principle of these drugs, in addition to being a natural part of the infection. Antioxidants have been studied in the therapy of the disease and the results seem promising. We evaluated ascorbic acid (AA), cyanocobalamin (B₁₂) and melatonin (MEL) alone and in combination with a subclinical dose of benznidazole (BZ). Our aim was to determine the effects of antioxidants in the development of the acute phase of the disease. For this, we used Swiss mice, infected with *T. cruzi*, Y strain. Our results showed synergy in the association of AA+BZ10 to reduce parasitemia; concentration of intracellular ROS (Reactive oxygen species) and the levels of TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) in the heart were also decreased. AA and AA+BZ10 were effective in reducing cardiac parasitism detected by qPCR and histological analyzes. The AA+BZ10 group presented reduction in cardiac inflammatory infiltrate. B₁₂ and B₁₂+BZ10 were not effective in reducing parasitemia. B₁₂+BZ10 reduced cardiac parasitism and cardiac inflammatory infiltrate; furthermore it acted against intracellular ROS. In group B₁₂ an increase in SOD (Superoxide dismutase) activity was detected. MEL and MEL+BZ10 reduced parasitemia, but were not effective in decreasing intracellular ROS. Levels of cardiac TBARS were reduced in the MEL group and an increase in SOD activity was observed in MEL and MEL+BZ10. In these groups, reduction in parasitism and inflammatory infiltrate were observed in the heart. Our results show that the use of antioxidants can be beneficial, either by trypanocidal action or by attenuation of oxidative damage, which in the long term may result in greater preservation of tissue damage.

Keywords: Ascorbic acid; antioxidants; Chagas disease; cyanocobalamin; oxidative stress; melatonin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

Fazendo parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) ao lado de outras moléstias como dengue, leishmaniose, esquistossomose, tuberculose e hanseníase, a doença de Chagas acomete hoje, aproximadamente sete milhões de pessoas ao redor do mundo (WHO, 2017; DNDi 2017).

Descrita pela primeira vez em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, o feito representa um dos mais bem sucedidos no ramo da biologia e patologia parasitária, pois pela primeira vez na história um único pesquisador fora capaz de constatar a doença, seu agente etiológico, vetor, reservatórios doméstico e silvestre além de animais de laboratório suscetíveis à infecção (COURA & PEREIRA, 2012; URBINA, 2009).

O agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida, sendo que a via natural da infecção necessita de um hospedeiro invertebrado, o triatomíneo (Família Reduviidae, Ordem Hemiptera) e um hospedeiro vertebrado mamífero (NUNES *et al.*, 2013).

Seu ciclo heteroxênico inicia-se quando o inseto no momento da hematofagia entra em contato com o sangue de reservatórios mamíferos, ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas que migrarão para o estômago do inseto, transformando-se em formas epimastigotas. Essas formas se multiplicam por divisão binária no intestino médio do vetor e posteriormente, o parasita inicia a metaciclogênese, gerando as formas tripomastigotas metacíclicas que se deslocarão para o intestino posterior e reto do inseto. Este processo envolve alterações morfológicas e biomoleculares que favorecem a infecção celular nos mamíferos, pois é essa forma morfológica que será liberada em uma nova atividade hematofágica através das fezes do triatomíneo (COURA & PEREIRA, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012; BERN, 2015).

Componentes moleculares de *T. cruzi* medeiam a interação que inicialmente acontece com macrófagos locais, fibroblastos e células musculares (CHIODINI, MOODY & MANSER, 2003; SOUZA, CARVALHO & BARRIAS,

2010). Uma vez no interior das células, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que após nove ciclos de divisão binária simples irão novamente se diferenciar em tripomastigotas, que devido a sua intensa movimentação levarão a célula hospedeira à lise, sendo assim liberados no interstício. Estes tripomastigotas ganham a corrente circulatória, atingindo outras células para cumprir um novo ciclo celular ou serão destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. Podem ainda ser ingeridos por triatomíneos, onde cumprirão seu ciclo extracelular (ANDRADE & ANDREWS, 2005; MUNOZ-SARAVIA *et al.*, 2012; BERN, 2015).

A transmissão vetorial ainda representa um dos mais importantes mecanismos de infecção. Desde o ano de 1950 são realizadas ações de controle vetorial no Brasil, porém, essas medidas não eram regulares devido a menor importância dada a doença de Chagas em relação a outras endemias (SILVEIRA & DIAS, 2011). Foi a partir de 1975 que essas ações foram exercidas de forma regular, diante aos inquéritos epidemiológicos realizados na época (URBINA, 2009).

Estas medidas de controle culminaram numa redução na incidência da doença que atingiu 70% no ano 2000 (VINHAES *et al.*, 2014); e em 2006 foi comprovada no Brasil a interrupção da transmissão pelo vetor *Triatoma infestans*. Entretanto, a vigilância precisa ser mantida uma vez que esta espécie continua presente em países da América do Sul como Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (COURA, 2013). Além disso, existem outras espécies se destacam como vetores do parasito, merecendo atenção especial *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* (MUNOZ-SARAVIA *et al.*, 2012, COURA, 2015).

A infecção pode ocorrer ainda por transmissão oral, através de alimentos e bebidas contaminados, transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, via congênita (a qualquer momento da gestação), ou ainda por acidentes laboratoriais (PEDRA *et al.*, 2011; CHATELAIN & KONAR, 2015).

O indivíduo infectado inicialmente desenvolve a chamada fase aguda, caracterizada por alta parasitemia. Porém, na grande maioria dos casos é assintomática, fato este que dificulta o diagnóstico neste período. Quando o paciente apresenta sintomas, estes geralmente são inespecíficos, como febre,

mal-estar geral, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e linfocitose atípica (COURA & PEREIRA, 2010; BERN, 2015).

Dentre os sintomas específicos que podem ser observados na fase aguda destacam-se o Sinal de Romaña, um edema bipalpebral e unilateral presente quando o parasita penetra pela conjuntiva, e o chagoma de inoculação, inflamação aguda que acomete a derme e hipoderme no local de inoculação do parasita. A taxa de mortalidade nesta fase é baixa, em torno de 2-8 %, atingindo em maior número crianças e pacientes imunossuprimidos (MUÑOZ-SARAVIA *et al.*, 2010; URBINA, 2014, CHATELAIN, 2017), com ressalva à infecção oral que apresenta altas taxas de mortalidade ainda neste estágio (YOSHIDA, TYLER & LLEWELLYN, 2011; BERN, 2015).

Passado esse período, o paciente chagásico pode permanecer por vários anos sem apresentar sintomas, em um período de latência denominado forma indeterminada, caracterizado pelos seguintes parâmetros diagnósticos: sorologia e testes parasitológicos positivos, ausência de sinais/sintomas, eletrocardiograma normal e coração, esôfago e cólon sem alterações anatomopatológicas (MARIM-NETO & RASSI, 2009; CHATELAIN, 2015).

Aproximadamente 20-30% dos pacientes desenvolvem a doença de Chagas crônica depois da fase de latência. A sintomatologia aqui apresentada irá caracterizar a forma da doença, podendo ser cardíaca, digestiva ou mista (cardíaca e digestiva) (TEIXEIRA *et al.*, 2012; URBINA, 2014).

A doença de Chagas cardíaca é a forma mais comum no Brasil, afetando até 40% dos indivíduos chagásicos na fase crônica (PEDRA *et al.*, 2011). Os danos ao miocárdio são um processo progressivo, cujo mecanismo de patogênese ainda não é totalmente compreendido pelos pesquisadores, porém acredita-se que a presença do parasita no tecido cardíaco destruindo suas fibras musculares e o processo inflamatório instalado sejam as principais causas, mesmo a carga parasitária sendo baixa neste período. É comum observar nesses pacientes o aneurisma de ponta, uma lesão na base dos ventrículos, causada pela ausência de células musculares e herniação do endocárdio (DINARDI *et al.*, 2012; BERN, 2015). Ocorre alteração dos batimentos cardíacos, com isso, em determinado momento, os mecanismos de compensação do coração tornam-se incapazes de suplantar as deficiências de

contração, culminando no quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), que pode levar o indivíduo ao óbito (URBINA, 2014).

Já a forma digestiva da doença é caracterizada por megaesôfago e magacólon, alterações morfológicas e funcionais que podem levar a quadros graves de desnutrição e obstrução intestinal. Além disso, Gullo *et al.* (2014) relataram que a chance de desenvolvimento de um carcinoma nos referidos órgãos, chega a ser 33 vezes maior nestes pacientes em relação a um indivíduo sadio.

Nesta fase, o acometimento cardíaco ou digestivo pode variar de leve a grave, estando diretamente relacionado à extensão do dano tecidual que definirá a morbidade da doença (ANDRADE & ANDREWS, 2005).

1.2 Tratamento para a doença de Chagas

Foram extensas as pesquisas por compostos que possuíssem atividade tripanocida. Em 1935, quando Carlos Chagas e Evandro Chagas publicaram o “Manual de Doenças Tropicais e Infectuosas”, a doença continuava sem um tratamento específico. Substâncias como fucsina, cloreto de mercúrio, compostos antimaláricos, arsenobenzóicos, anfotericina B e mais de trinta antibióticos foram testados até a década de 60 (COURA & CASTRO, 2002).

Foi entre os anos de 1952 e 1957 que surgiram pesquisas envolvendo compostos derivados de nitrofuranos, apresentando atividade tripanocida limitada, porém o que parecia promissor levava a graves efeitos tóxicos. Entretanto, foram estes estudos iniciais com os nitrofuranos que instauraram as pesquisas que no futuro culminariam no desenvolvimento dos dois medicamentos atualmente disponíveis: o Benzonidazol (BZ) (LAFEPE) e o Nifurtimox (Lampit® - Bayer), sendo que este último não é comercializado no Brasil (URBINA, 2010; BERN, 2015) e nos Estados Unidos, por exemplo, nenhum deles é aprovado pelo Food and Drug Administration U.S. (FDA) (FDA, 2016).

Ambos os fármacos são pertencentes ao grupo de substâncias da classe dos nitroheterocíclicos. O princípio ativo do nifurtimox está associado com a produção de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs),

como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, formados pela redução do oxigênio na reação com metabólitos do nitrofurano, inibindo assim o desenvolvimento de *T. cruzi*.

Já o benzonidazol, admite-se que atue por meio da ligação covalente de derivados nitro reduzidos, gerados durante sua bioativação, com macromoléculas de *T. cruzi*. Complementarmente, sabe-se que a metabolização de BZ gera ainda EROs, como produto da reoxidação de radicais nitro-ânion (PEDROSA *et al.*, 2001; GUPTA, WEN & GARG, 2009; URBINA, 2010).

E é justamente o mecanismo de ação deste fármaco apontado como o responsável pelos efeitos colaterais que muitas vezes representam a principal causa do abandono ao tratamento (URBINA, 2014). Para BZ são efeitos colaterais comuns manifestações cutâneas, linfadenopatia e, mais raramente, supressão de medula óssea (BERN, 2015).

1.3 Radicais livres e o estresse oxidativo

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou no caso do rompimento de uma ligação covalente. E esta instabilidade eletrônica confere-lhes alta reatividade (HALLIWELL, 2007; UTTARA *et al.*, 2009, CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Os intermediários reativos de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio são exemplos de radicais livres, sendo originados pelo desvio de elétrons da cadeia respiratória durante o processo de produção de adenosina trifosfato (ATP) ocorrido nas mitocôndrias ou pela atividade enzimas oxidantes, como por exemplo, NADPH oxidases (NOXs) que possuem a função de transferir elétrons através das membranas celulares através da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)(Figura 1).

A formação de EROs, portanto, é consequência do metabolismo aeróbio, onde o oxigênio (O₂) sofre redução tetravalente gerando duas moléculas de água. Porém, devido a sua configuração eletrônica, o O₂ tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando compostos

intermediários altamente reativos, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) (TURRENS, 2004; GUPTA, WEN & GARG, 2009;).

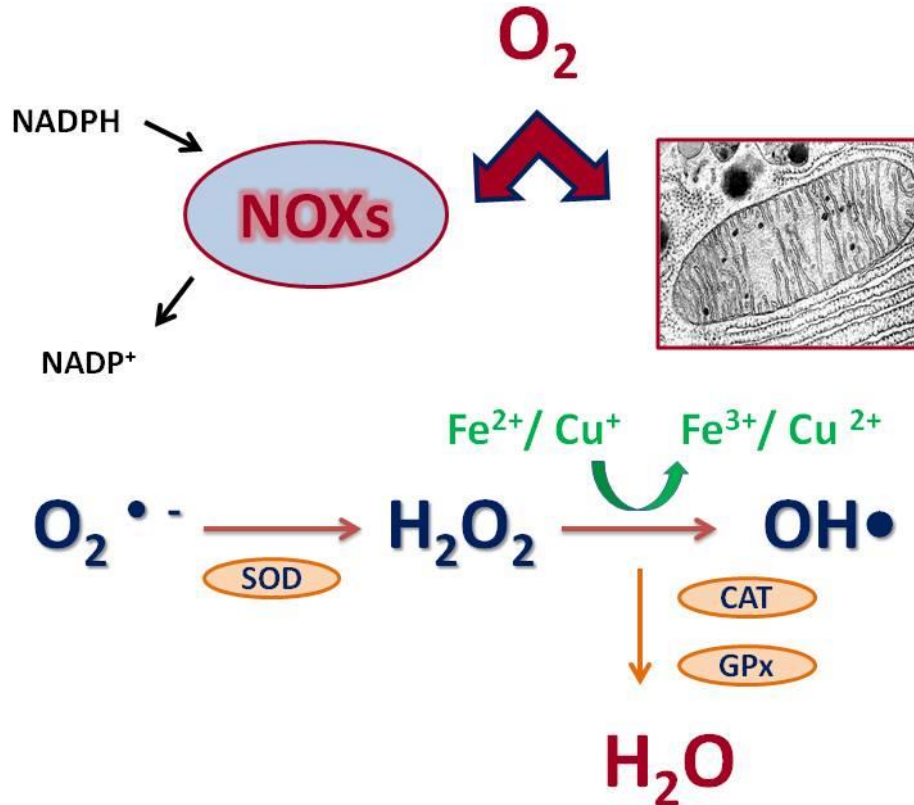


Figura 1: Formação de EROs. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas pela atividade de enzimas oxidantes, como o complexo enzimático NOXs (NADPH oxidases) ou pelo extravasamento de elétrons da cadeia respiratória ocorrido nas mitocôndrias. Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($OH\cdot$) são exemplos de EROs formados nestes processos. Em laranja foi representada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Em verde, demonstra-se a atividade de íons metálicos no processo. Intermediários reativos são formados pela redução monovalente do oxigênio. Fonte: autoria própria.

Logo, EROs estão envolvidas em diversos processos metabólicos, sendo fundamental, por exemplo, em processos de sinalização e diferenciação celular, apoptose, controle da inflamação e eliminação de patógenos, contrariando o que por muitos anos se pensou, que as espécies reativas de oxigênio estavam relacionadas apenas ao dano oxidativo (SCHIEBER & CHANDEL, 2014).

Porém, após décadas de pesquisas envolvendo os radicais livres, indubitavelmente se sabe que as espécies reativas de oxigênio, quando

formadas de maneira exacerbada, podem ser danosas ao organismo humano, vindo a oxidar biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (VASCONCELLOS *et al.*, 2007; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Radical superóxido sofre dismutação, processo onde duas moléculas deste radical reagem formando peróxido de hidrogênio, reação esta catalisada pela enzima superóxido dismutase. Já o peróxido de hidrogênio é conhecido pela capacidade de oxidar proteínas.

Radical hidroxil é considerado a ERO mais reativa, pela sua capacidade de atravessar membranas biológicas, tendo, portanto, o potencial de reagir com todas as biomoléculas. Sua formação é consequência da reação de H₂O₂ com íons Fe²⁺ ou Cu⁺ (SCHIEBER & CHANDEL, 2014).

Devido ao potencial oxidante das espécies reativas o organismo conta com sistemas de eliminação de radicais livres, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos como, por exemplo, a já citada superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase que agem nas mitocôndrias e no citoplasma, reduzindo os níveis de EROs nas células (RIBEIRO *et al.*, 2005).

E o quadro de estresse oxidativo é estabelecido então quando ocorre um intenso desequilíbrio entre a formação dos radicais livres e a capacidade do nosso organismo em detoxificá-las (HALIWELL, 2010).

Diante a diversos processos infecciosos, EROs são formadas em grandes quantidades no interior de células fagocíticas na tentativa de controlar a infecção. Na doença de Chagas sua formação é consequência ainda da destruição tecidual, estimulação de mediadores inflamatórios e danos secundários às mitocôndrias (WRENGER, SCHETTERT & LIEBAU, 2013).

Alguns estudos mostram que além de intensificar a geração de EROs, o processo inflamatório envolvido na patologia pode ser capaz de inibir alguns mecanismos antioxidantes. É o caso da TNF- α que pode diminuir a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e GPx. Essa análise sugere que a resposta antioxidante possa não ser ativada adequadamente para eliminar EROs durante a infecção chagásica (GUPTA, WEN & GARG, 2009).

Por estes motivos, o uso de antioxidantes exógenos na infecção chagásica vem sendo amplamente estudado. Estima-se que estas substâncias possam intervir na geração de ROS ou reduzir seus efeitos, prevenindo deste modo os danos causados pelo estresse oxidativo.

1.4 Antioxidantes

Segundo Halliwell (2011, v.32, p. 125), “antioxidante é uma molécula capaz de proteger um alvo biológico contra o dano oxidativo”.

Galano, Tan e Reiter (2011) relataram as propriedades desejáveis a uma substância antioxidante, destacando-se: a versatilidade, para reagir com espécies reativas de várias naturezas; a habilidade de cruzar as barreiras fisiológicas sendo facilmente transportada para dentro das células; ser acessível quando necessário, sendo obtida de maneira endógena ou exógena podendo ser adquirida através da dieta; possuir propriedade regenerativa, ou seja, a reação com o radical livre gera uma forma oxidada do composto antioxidante, a qual ainda pode reagir eficientemente, combatendo outros radicais livres; ser reabsorvido adequadamente depois de filtrado pelos rins; e finalmente não apresentar toxicidade ao organismo antes ou depois da reação com a espécie reativa.

O ácido ascórbico ou vitamina C é um micro nutriente necessário em múltiplas funções biológicas. Muitos animais são capazes de produzir a substância a partir da glicose, porém o homem, alguns primatas e os morcegos são exemplos de espécies que precisam obter o nutriente por meio da dieta (DUARTE & LUNEC, 2005).

Dentre as principais funções da vitamina C é possível destacar o importante papel na absorção do ferro pelo organismo, participação na síntese de colágeno e carnitina, atuação sobre os neurotransmissores dopamina e noradrenalina, além de atuar na regulação da expressão gênica, função essa que ainda não foi totalmente elucidada (DE TULLIO, 2012; PISOSCHI & POP, 2015).

Além de todas essas aplicabilidades, a substância possui ainda ação antioxidante que é alvo de inúmeras pesquisas na atualidade, envolvendo principalmente doenças infecciosas e mutações gênicas.

Sua atividade sob os radicais livres baseia-se na doação de elétrons, além de ser capaz de reativar outras moléculas antioxidantes importantes para o organismo como α -tocoferol (vitamina E) e glutathiona.

A vitamina B₁₂ (cianocobalamina) é essencial ao organismo humano, pois participa das reações de degradação de alguns aminoácidos e ácidos graxos, além de ser necessária para a produção de células sanguíneas pela medula óssea, especialmente a eritropoiese e à síntese de ácidos nucleicos. É obtida através da dieta, onde produtos de origem animal, como carne e derivados do leite, são ricos deste nutriente e sua deficiência representa um grave problema nutricional em idosos e em países subdesenvolvidos (WOLTERS, STRÖHLE & HAHN, 2004; PAWLAK, LESTER & BABATUNDE, 2014).

Para Birch *et al.* (2009) o efeito antioxidante da cianocobalamina é resultado da sua reação direta com as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inibindo por exemplo a produção de peróxidos intracelularmente, além de ações indiretas como a estimulação da atividade da metionina, aminoácido essencial na síntese de glutatona.

O potencial antioxidante desta vitamina vem sendo testado em alguns trabalhos, inclusive na doença de Chagas por Cicarellil *et al.* (2012), onde bons resultados foram obtidos em relação a inibição no desenvolvimento do parasita.

Já a melatonina (MEL), hormônio secretado pela glândula pineal que atinge picos de concentração durante a noite, possui um importante papel na regulação do ritmo circadiano (VIELMA *et al.*, 2014) e suas múltiplas funções movem inúmeros estudos envolvendo a substância. Atualmente se sabe que a melatonina inibe a progressão do câncer (GALANO, TAN & REITER, 2011; SANTOS & CONSTANTINO, 2015), regula o sistema imune atuando na secreção de citocinas (SANTELLO *et al.*, 2008; BRAZÃO *et al.* 2015) e regula a função da retina (ALLEGRA *et al.*, 2003).

A capacidade deste hormônio reagir com os radicais livres foi descrita pela primeira vez em 1993 e desde então pesquisadores se dedicam na compreensão de seu mecanismo de ação, que ainda não foi totalmente esclarecido. Sabe-se que a melatonina possui propriedades antioxidantes e é capaz de penetrar todas as barreiras morfofisiológicas devido ao seu caráter anfifílico, apresentando, portanto, acesso ilimitado às mitocôndrias. Além disso, os metabólitos primários e até mesmo secundários da MEL ainda podem agir como captadores de radicais livres (ALLEGRA *et al.*, 2003; RAMIS *et al.*, 2016).

2. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem-nos concluir que o ácido ascórbico em associação ao benzonidazol potencializou o efeito tripanocida do fármaco, evidenciado por uma maior redução na parasitemia observada no grupo AA+BZ10 em relação ao grupo BZ10.

Além disso, vimos que AA e AA+BZ10 reduziram o parasitismo no coração, explicitado pelas técnicas de qPCR e contagem de ninhos de amastigota, porém, no grupo AA vimos que apesar da diminuição do número de parasitas no tecido cardíaco, o infiltrado inflamatório ainda estava presente de maneira mais acentuada. Paralelamente, no grupo AA+BZ10 a redução do número de células inflamatórias foi superior, o que em longo prazo poderia culminar na prevenção do dano tecidual e consequente preservação da funcionalidade do órgão.

O ácido ascórbico associado ao benzonidazol também se mostrou capaz de reduzir significativamente a concentração de EROs intracelular, comparando este grupo àqueles tratados com benzonidazol em dose clínica (BZ100) ou subterapêutica (BZ10), além de reduzir os níveis de TBARS cardíacos em relação ao grupo CI. Estes dados sugerem, portanto, que benefícios em relação ao estresse oxidativo possam ser alcançados com o tratamento do fármaco associado ao antioxidante.

No que diz respeito à cianocobalamina, apesar de verificar algumas vantagens em seu uso, no que diz respeito aos parâmetros oxidativos avaliados, não observamos sinergia quando esta substância foi associada à BZ em relação ao parasitismo tecidual e ainda que a substância não foi eficaz em reduzir a parasitemia em modelo experimental murino, seja associada ou não ao benzonidazol. Estes dados nos permitem concluir que a vitamina B₁₂ não apresentou atividade tripanocida nas concentrações utilizadas, entretanto devido as suas propriedades antioxidantes, a substância pode trazer benefícios no quadro de dano tecidual.

Sobre a melatonina, infere-se que essa substância em dose 10mg/kg, apresentou atividade tripanocida no decurso da fase aguda dessa patologia,

seja em associação ou não ao benzonidazol, evidenciado pela significativa redução no número de parasitas durante o pico parasitêmico.

Ao avaliarmos o parasitismo tecidual cardíaco vimos também que o hormônio agiu de modo a reduzir este parâmetro, detectado pela qPCR e contagem de ninhos de amastigota. E ainda que os grupos tratados com MEL e MEL+BZ10 apresentaram diminuição do infiltrado inflamatório neste órgão.

Não se constatou reduções significativas na concentração de EROs intracelular média entre os grupos tratados com melatonina e melatonina associada ao benzonidazol em relação aos demais grupos experimentais, porém, alguns benefícios foram observados quando exploramos parâmetros oxidativos no coração, onde os grupos MEL e MEL+BZ10 apresentaram um aumento no percentual de inibição da SOD e nos animais que receberam apenas o hormônio os níveis de TBARS cardíacos também foram reduzidos em relação a CI.

Concluimos, portanto, que a melatonina possa vir a ser um potencial candidato no tratamento da doença de Chagas.

Em suma, os dados obtidos sugerem que ácido ascórbico e melatonina apresentaram atividades importantes no decurso da patologia durante a fase aguda, seja por apresentar propriedades tripanocidas ou pelos benefícios em relação aos danos oxidativos.

Acredita-se que os antioxidantes possam trazer benefícios no quadro patológico e que se associados a reduzidas doses de BZ poderão trazer melhorias ao tratamento usual.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, M. *et al.* New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: a pilot short-term follow-up study with adult patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 2, p. 833-837, 2015.

ANDRADE, L.; ANDREWS, N. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.

BELLOMO, G. *et al.* Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. I Biochemical and immunocytochemical features. *Journal of Cellular Physiology*, v. 143, p. 118-128, 1990.

BERN, C. Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, v.373, p. 456-466, 2015.

BETTIOL, E. *et al.* Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening. *Neglected Tropical Diseases*, v.3, n. 2, p. 01-12, 2009.

BIRCH, C. S. *et al.* A novel role for vitamin B12: Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, n. 2, p. 184-188, 2009.

BRAZÃO, V. *et al.* Interleukin-17, oxidative stress, and inflammation: role of melatonin during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal Pineal Research*, v. 59, n. 4, p.488-496, 2015.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experiment ally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, p. 389- 396, 1962.

BRUGGISSER, R. *et al.* Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

BUEGE, J. A.; AUST, S, D. Microsomal lipidic peroxidation. In: FLEISCHER, S.; PACKER, L. (Eds.). *Methods in Enzymology: Biomembranes - part C: Biological Oxidations*, v. 52, 1978, p. 595-597.

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

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

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

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Journal of drug design, development and therapy*, v. 9, p. 4807-4823, 2015.

CHIODINI, P. L.; MOODY A.H.; MANSER, D. W. **Atlas of medical helminthology and protozoology**. 4. ed. Londres: Churchill Livingstone, 2003.

CICCARELLI, A. B. *et al.* Antiparasitic Effect of Vitamin B12 on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, n.10, p.5315-5320, 2012.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 8, p. 962-967, 2013.

_____. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n.1, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B. Chagas disease: 100 years after its discovery. A sistemic review. *Acta Tropica*, v. 115, p.5-13, 2010.

_____. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, p. 286-296, 2012.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 38, p.1041-1047, 1996.

DE TULLIO, M. C. Beyond the antioxidant: the double life of vitamin C. *Subcellular Biochemistry*, v. 56, p. 49-65, 2012.

DESOTI, V. C. *et al.* The combination of vitamin K3 and vitamin C has synergic activity against forms of *Trypanosoma cruzi* through a redox imbalance process. *Plos One*, v. 10, n. 12, p.133-144, 2015.

DI MONTE, D. *et al.* Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 235, n. 2, p. 343-350, 1984.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.25, p. 7-86, 2016.

DINARDI, L. F. L. *et al.* Transplante cardíaco na doença de Chagas. *Revista Medicina*, v. 91, n.4, p. 229-240, 2012.

DNDi. DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Whats is Chagas Disease? Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>> Acesso em: 01 mar. 2017.

DUARTE, T. L.; LUNEC, J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research*, v. 39, n.7, p. 671-686, 2005.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION U.S. Public Meeting on Chagas Disease Patient Focused Drug Development. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/NewsEvents/UCM446721.pdf> > Acesso em: 04 out.2016.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Conheça as principais doenças tropicais negligenciadas: saiba mais sobre os principais agravos que estão em pauta no XVIII Congresso Internacional de Medicina Tropical e Malária. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1585&sid=32>> Acesso em: 25 ago. 2016.

FREITAS, J. *et al.* Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, v. 2, n. 3, p. e24, 2006.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal Pineal Research*, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GARAVELLO, W. *et al.* The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatologica*, v.58, p. 25-34, 2009.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-immune system relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

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

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease*, v. 2009, p. 01-08, 2009.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 01, p.236-245, 2009.

HALLIWELL, B.. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. 5, p.1147-1150, 2007.

_____. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

KYLE, J.A. *et al.* Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *British Journal of Nutrition*, v. 103, p. 429-436, 2010.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p. 265-275, 1951.

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

MALVEZI, A. D. *et al.* Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Fems Immunology & Medical Microbiology*, v. 41, n. 1, p.69-77, 2004.

MARIM, R. G. *et al.* Effects of vitamin C supplementation on the chronic phase of Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 3, p. 245-250, 2015.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Update on Chagas Heart Disease on the First Centennial of Its Discovery. *Revista Española de Cardiología (english Edition)*, v. 62, n. 11, p.1211-1216, 2009.

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

MIGUEL, D. C. *et al.* The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi* in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 7, p.945-948, 2010.

MUÑOZ-SARAVIA, S.G. *et al.* Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Review – Springer*, v. 17, p. 45- 64, 2012.

MURTA, S. M. F. *et al.* Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular And Biochemical Parasitology*, v. 93, p.203-214, 1998.

NAS. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). Dietary Reference Intakes. Disponível em: <<https://www.nap.edu/catalog/9810/dietary-reference-intakes-for-vitamin-c-vitamin-e-selenium-and-carotenoids>> Acesso em: 05 out. 2016.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, v. 1840, n. 2, p. 809-817, 2014.

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

NUNES, M. C. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 62, n. 9, p. 767-776, 2013.

OLIVEIRA, L. G. R *et al.* Protective actions of melatonin against heart damage during chronic Chagas disease. *Acta Tropica*, v. 128, n. 3, p. 652-658, 2013.

PAWLAK, R; LESTER, S; BABATUNDE, T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, n. 5, p.541-548, 2014.

PEDRA, R. A. *et al.* Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 13, n. 2, p. 5-9, 2011.

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

PEREIRA DA SILVA, L. H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa altamente virulenta de *Trypanosoma cruzi* para camundongo albino. *Folia clinica et biologica*, v.20, p. 191-207, 1953.

PEREZ-FUENTES, R. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 3, p. 293-299, 2003.

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

PISOSCHI, A.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55-74, 2015.

RAMIS, M. R. *et al.* Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: A review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, p. 2690 - 2711, 2016.

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

RÊGO, J. F.; MACEDO, V. O.; PRATA, A. Alterações neurológicas na doença de Chagas crônica. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 38, n. 1, p. 45-52, 1980.

SANTELLO, F. H. *et al.* Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. *Journal Pineal Research*, v. 45, n. 1, p. 79-85, 2008.

SANTOS, D. M.; CONSTANTINO, D. H. J. Efeito do tratamento com melatonina sobre a produção de metástases neoplásicas. *Salusvita*, v. 34, n. 1, p. 71-86, 2015.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SCHIJMAN, A. G. *et al.* International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *Public Library of Science*, v.05, n.01, p.01 - 13, 2011..

SESTI-COSTA, R. *et al.* Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, p. e3207, 2014.

SILVEIRA, A.C.; DIAS, J.C.P. O controle da transmissão vetorial. *História sobre a doença de Chagas no Brasil*, v.44, n.2, p. 52-63, 2011.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.; BARRIAS, E. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, v. 2010, p. 1-18, 2010.

STRASEN, J. *et al.* Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clinical Research in Cardiology*, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2014.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Public Library of Science*, v. 6, n. 8, p.1749, 2012.

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

URBINA, J. A. New advances in the management of a long-neglected disease. *Clinical Infectious Disease*, v. 49, n. 11, p. 1685-1687, 2009.

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

_____. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.0, p. 1-8, 2014.

UTTARA, B. *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, v. 7, p. 65-74, 2009.

VASCONCELLOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais

métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VIELMA, J.R. *et al.* Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. *Acta Tropica*, v.137, p.31-38, 2014.

VINHAES, M.C. *et al.* Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis. *Acta Tropica*, v. 137, p. 105-110, 2014.

VIOTTI, R *et al.* Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 7, n. 2, p. 157-163, 2009. In: BUSTAMANTE, J.; TARLETON, R. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 7, n. 3, p. 317-325, 2014.

WEI, B. *et al.* Development of a PCR Assay to detect low Level *Trypanosoma cruzi* in blood specimens collected with PAXgene blood DNA tubes for clinical trials treating Chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 12, p. e0005146, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis): fact sheet. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

WOLTERS, M.; STRÖHLE, A.; HAHN, A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 39, n. 6, p. 1256-1266, 2004.

WRENGER C.; SCHETTERT I.; LIEBAU E. Oxidative Stress in human infectious diseases – Present and current knowledge about its druggability. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/drug-discovery/oxidative->

stress-in-humaninfectious-diseases-present-and-current-knowledge-about-its-druggability > Acesso: 20 set. 2016.

YOSHIDA, N.; TYLER, K.; LLEWELLYN, M. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 10, p. 459-466, 2011.