

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE  
CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF**

SCHEILA THAÍS NICOLAU

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-*Trypanosoma cruzi* E  
IMUNOMODULADORA DE EXTRATO DE FOLHAS DE EMBAÚBA (*Cecropia  
pachystachya Trécul*) *in vivo* E *in vitro*.**

CASCAVEL  
2023

**SCHEILA THAÍS NICOLAU**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-*Trypanosoma cruzi* E  
IMUNOMODULADORA DE EXTRATO DE FOLHAS DE EMBAÚBA (*Cecropia  
pachystachya Trécul*) *in vivo* E *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

**Orientador:** Rafael Andrade Menolli  
**Coorientadora:** Thais Soprani Ayala

CASCADEL  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Nicolau, Scheila Thaís

Avaliação das atividades anti-Trypanosoma cruzi e imunomoduladora de extrato de folhas de embaúba (Cecropia pachystachya Trécul) in vivo e in vitro. / Scheila Thaís Nicolau; orientador Rafael Andrade Menolli; coorientadora Thaís Soprani Ayala. -- Cascavel, 2023.

67 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. . I. Andrade Menolli, Rafael, orient. II. Soprani Ayala, Thaís, coorient. III. Título.

**SCHEILA THAÍS NICOLAU**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-*Trypanosoma cruzi* E  
IMUNOMODULADORA DE EXTRATO DE FOLHAS DE EMBAÚBA (*Cecropia  
pachystachya Trécul*) *in vivo* E *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Thais Soprani Ayala.

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná – UNIOESTE  
Orientador



---

Prof. Dra. Sara C. Sagae Schneider  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná – UNIOESTE



---

Prof.  
Dra. Maria Isabel Lovo Martins  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

**Cascavel – PR  
2023**

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Scheila Thaís Nicolau, nascida em 11 de outubro de 1989, natural da cidade de Palmitos, Santa Catarina, Brasil, graduada em Farmácia, no ano de 2012 pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Cascavel. Ingressou no programa de Pós-Graduação – *latu sensu* – Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas no ano de 2015 e finalizou no ano de 2016. Atuou como farmacêutica em farmácias de dispensação comercial privadas durante 9 anos, e atualmente exerce a função de Propagandista médica na Indústria Farmacêutica, na empresa L'Oréal. Em julho de 2021 iniciou as atividades como aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, e desde então desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientado pelo Professor Dr. Rafael Andrade Menolli e coorientada pela Professora Dra. Thais Soprani Ayala.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá.”  
**(Ayrton Senna)**

À minha família, presente em todas as etapas da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos concedidas em toda minha existência.

À minha mãe, por todo amor e apoio em minha vida profissional e acadêmica, que sempre incentivou eu e minha irmã a estudarmos, e nunca mediu esforços para investir em nossa educação e conhecimento. Nesse mundo, isso é o maior privilégio.

À minha irmã, meu maior orgulho e motivo de elogios. Tem um pedaço dela em tudo que faço na vida.

Ao meu marido, que me incentiva a nunca desistir, que esteve ao meu lado em todos os momentos, e que foi paciente durante esse período de rotina de trabalho e estudos.

Ao meu cachorro, que é puro amor, deixa meus dias mais leves e me lembra de desacelerar em meio a turbulências.

À Juliana e Daniele, presentes que ganhei no mestrado e fizeram esse período muito mais feliz, e nunca mediram esforços para me ajudar.

À todas meninas ICs do laboratório, em especial Amanda, Vitória e Rebeca, que auxiliaram muito em todas as etapas da minha pesquisa.

À Jana, técnica do laboratório de imunologia, nutricionista e mestranda, pelas conversas e leveza em todos os dias que estivemos juntas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli e a minha coorientadora Dra. Thaís Soprani Ayala por todo conhecimento transmitido, pela empatia e por toda paciência. Exemplo de professores e disseminadores de conhecimento, com muita humanidade. Obrigada por me concederem essa oportunidade e por não terem soltado minha mão, mesmo quando eu não merecia.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) por cultivar a excelência, primando pelo amplo desenvolvimento de seus alunos e por todos esses anos de história.

À todos que, de uma forma ou outra, colaboraram para que o trabalho fosse realizado com êxito.



## RESUMO

A Doença de Chagas (DC), conhecida como tripanossomíase americana é considerada uma doença parasitária fatal. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e seu principal vetor é um triatomíneo hematófago, conhecido como barbeiro. Um dos aspectos mais importantes do curso da DC talvez seja a resposta imune, pois as manifestações clínicas são dependentes de fatores inerentes ao parasita e ao hospedeiro. Seu tratamento é parcialmente eficaz, baseado em medicamentos como Benzonidazol (BZN) e Nifurtimox, mais eficazes se administrados na fase aguda. No entanto, sua eficácia diminui com o tempo, e podem ocorrer efeitos adversos. *Cecropia pachystachya*, uma planta conhecida como embaúba, explorada na medicina tradicional com várias propriedades, incluindo ação anti-inflamatória, possui como um dos seus componentes o ácido ursólico, que já demonstrou atividade tripanocida na DC, inibindo o parasita em testes com camundongos. Estudos com a planta embaúba podem representar uma esperança na busca por novas opções de tratamento e menos efeitos adversos. Buscou-se avaliar a ação do extrato de *Cecropia pachystachya in vitro* através da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* sobre formas amastigotas do *T. cruzi* em macrófagos peritoneais murinos. Foram realizados também experimentos *in vivo*, analisando a toxicidade do extrato em animais não-infectados, além de sua atividade na infecção experimental aguda de *T. cruzi* em camundongos (BALB/c e C57Bl/6) infectados. Na atividade *in vitro* foi possível observar que o extrato de embaúba foi capaz de inibir a produção de nitrito em todas as concentrações, mas essa inibição foi significativa na concentração de 300 ug/mL. Ao avaliar a toxicidade do extrato em animais não infectados, com relação aos leucócitos sanguíneos, a redução mais significativa dos leucócitos entre os grupos, aconteceu no grupo tratado com o extrato. Em experimento com animais infectados, suscetíveis BALB/c, o grupo tratado com extrato apresentou porcentagem de sobrevivência de apenas 40% ao final do experimento, além de ser o único grupo que não diminuiu significativamente a quantidade de leucócitos sanguíneos. Neste mesmo grupo, o extrato impediu um aumento significativo do baço, quando comparado aos outros grupos. Em relação às citocinas TNF-alfa e IL-6 do soro dos animais BALB/c, estas estão diminuídas no grupo tratado com BZN, possivelmente devido a ação do medicamento em diminuir a carga parasitária. Ao realizar o experimento em animais resistentes C57Bl/6, notamos que em relação à sobrevivência, o extrato sozinho foi capaz de diminuir a parasitemia dos animais e o grupo tratado com o extrato apresentou a mesma sobrevivência que o tratado com o BZN. Ao analisarmos a produção de nitrito, o grupo tratado com BZN teve a menor produção, enquanto o grupo da associação do BZN com o extrato teve a maior, nesse caso, possivelmente o extrato da embaúba interferiu no aumento da produção de NO. Em relação a concentrações da citocina pró-inflamatória IL-6 pode-se inferir que o extrato de *C. pachystachya* não foi capaz diminuir sua produção em relação ao grupo controle (não-tratado), que apresentou a menor concentração de IL-6.

**Palavras-chave:** *Cecropia pachystachya*; *Trypanosoma cruzi*; Imunomoduladora.

## ABSTRACT

Chagas Disease (CD), American trypanosomiasis, is a fatal parasitic disease. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, with its primary vector being a hematophagous triatomine bug, commonly known as the "kissing bug." One of the crucial aspects influencing the course of CD is the immune response, as clinical manifestations depend on factors inherent to both the parasite and the host. Its treatment is partially effective, relying on medications such as Benznidazole (BZN) and Nifurtimox, which are more effective when administered during the acute phase. However, their efficacy diminishes over time, and adverse effects may occur. *Cecropia pachystachya*, a plant known as "embaúba" and utilized in traditional medicine for various properties, including anti-inflammatory action, contains ursolic acid as one of its components. Ursolic acid has demonstrated trypanocidal activity in CD, inhibiting the parasite in mouse experiments. Studies involving the embaúba plant may offer hope in the search for new treatment options with fewer adverse effects. This study aimed to assess the *in vitro* action of *Cecropia pachystachya* extract through its anti-*Trypanosoma cruzi* activity on amastigote forms within murine peritoneal macrophages. *In vivo* experiments were also conducted to analyze the extract's toxicity in non-infected animals and its activity in the acute experimental infection of *T. cruzi* in mice (BALB/c and C57Bl/6). *In vitro* activity revealed that the embaúba extract inhibited nitrite production at all concentrations, with significant inhibition observed at 300 µg/mL. Assessing extract toxicity regarding blood leukocytes in non-infected animals showed a more substantial reduction in the group treated with the extract. In experiments with infected animals, susceptible BALB/c mice treated with the extract exhibited a 40% survival rate at the end, remaining the only group that did not significantly decrease blood leukocyte count. Additionally, this group prevented a significant increase in spleen size compared to other groups. Concerning TNF-alpha and IL-6 cytokines in BALB/c animals' serum, the BZN-treated group exhibited decreased levels, likely due to the drug's action in reducing parasite load. In resistant C57Bl/6 animals, the extract reduced parasitemia and showed comparable survival rates to the BZN-treated group. Nitrite production analysis revealed that the BZN-treated group had the lowest production. In contrast, the BZN-extract combination group had the highest, suggesting the embaúba extract may interfere with increased nitric oxide production. Regarding pro-inflammatory cytokine IL-6 concentrations, it can be inferred that *C. pachystachya* extract did not decrease its production compared to the untreated control group, which exhibited the lowest IL-6 concentration.

**Keywords:** *Cecropia pachystachya*; *Trypanosoma cruzi*; Immunomodulatory.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas.....	9
1.2 Doença de Chagas .....	9
1.3 Interação com o sistema imune do hospedeiro .....	12
1.4 Diferenças imunológicas entre linhagens de camundongos BALB/c e C57Bl/6 .....	16
1.5 <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	17
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Aspectos éticos da pesquisa .....	21
3.2 Extratos.....	21
3.3 Animais .....	21
3.4 Cultivo e manutenção de células L929 .....	22
3.5 Parasitas: manutenção das formas tripomastigotas .....	22
3.6 Obtenção de macrófagos peritoneais .....	23
3.7 Avaliação do extrato em células estimuladas por LPS .....	23
3.8 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade tripanocida sobre formas amastigotas em macrófagos peritoneais murinos .....	24
3.9 Avaliação da toxicidade do extrato em animais não-infectados.....	24
3.10 Avaliação da atividade do extrato na infecção experimental aguda de <i>T.</i> <i>cruzi</i> em camundongos (BALB/c e C57Bl/6).....	25
3.11 Dosagem da produção de óxido nítrico (NO).....	26

3.12 Detecção da secreção de citocinas IL- 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10.....	27
3.13 Análise histológica dos corações dos camundongos C57BL/6.....	28
3.14 Análise estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
4.1 Atividades <i>in vitro</i> do extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> .....	28
4.2 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i>	30
4.3 Avaliação da ação do extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> sobre a Doença de Chagas experimental aguda em animais suscetíveis BALB/c.....	32
4.4 Avaliação da ação do extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> sobre a Doença de Chagas experimental aguda em animais resistentes C57Bl/6 .....	37
4.5 Análise histológica do coração .....	42
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
<b>Figura 2.</b>	Imunidade inata e adquirida durante infecção por <i>T. cruzi</i> .....	13
<b>Figura 3.</b>	Folhas de embaúba – <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	14
<b>Figura 4.</b>	Linha do tempo do curso do experimento em camundongos BALB/c e C57Bl/6.....	17
<b>Figura 5.</b>	(a) Produção de NO por macrófagos murinos submetidos ao tratamento com extrato supercrítico de <i>Cecropia pachystachya</i> e LPS simultaneamente. (b) Efeitos do extrato supercrítico das folhas de <i>C. pachystachya</i> sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	24
<b>Figura 6.</b>	(a) Eritrócitos sanguíneos, (b) leucócitos sanguíneos, (c) metabólitos séricos (Uréia, AST, ALT e CK), e (d) NO de macrófagos peritoneais de camundongos não infectados e tratados (brancos) e não infectados e não tratados (pretos) com extrato supercrítico de folhas de <i>C. pachystachya</i> .....	25
<b>Figura 7.</b>	(a) Relação peso corporal final/inicial de animais infectados com <i>T. cruzi</i> tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). (b) Relação peso corporal final/peso do baço final de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	26
<b>Figura 8.</b>	(a) Percentual de sobrevivência de animais BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN) após 20 dias de acompanhamento. (b) Leucócitos sanguíneos de animais BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). .....	27
<b>Figura 9.</b>	(a) Dosagem de NO, (b) IFN-gama e (c) IL-4 do sobrenadante de células esplênicas totais retiradas de animais BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). .....	28

<b>Figura 10.</b> (a) Dosagem de NO, (b) IL-6 e (c) TNF-alfa do sobrenadante de macrófagos peritoneais retirados de animais BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	29
<b>Figura 11.</b> (a) Dosagem de TNF-alfa e (b) IL-6 do soro de animais BALB/c infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	30
<b>Figura 12.</b> (a) Tripomastigotas sanguíneos contados entre o sexto e o décimo oitavo dia de infecção de animais C57Bl/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). (b) Percentual de sobrevivência de animais infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN) após 20 dias de acompanhamento.....	30
<b>Figura 13.</b> (a) Leucócitos e (b) hemácias do sangue de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). (c) variação de peso inicial/final.....	31
<b>Figura 14.</b> (a) Dosagem de IL-4 e (b) NO do sobrenadante de células esplênicas totais retiradas de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benzonidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	32
<b>Figura 15.</b> (a) Dosagem de NO, (b) TNF-alfa e (c) IL-6 do sobrenadante de macrófagos peritoneais retirados de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	33
<b>Figura 16.</b> (a) Número de células no tecido cardíaco de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos, (b) quantidade de colágeno.....	42
<b>Figura 17.</b> Tecidos cardíacos corados por H&E de animais C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i> e tratados com extrato supercrítico de <i>C. pachystachya</i> (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....	43

**Figura 18.** Tecidos cardíacos corados por Tricrômico de Masson de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN).....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

BZN	benzonidazol
CPE	<i>Cecropia pachystachya</i>
DC	Doença de Chagas
DTNs	Doença Tropicais Negligenciadas
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LPS	lipopolissacarídeo
NK	natural killer
NO	óxido nítrico
SFB	soro fetal bovino
TGF- $\beta$	fator de crescimento tumoral
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral



## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas**

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) compreendem uma lista de dezoito condições médico-sanitárias, sendo doze delas com ocorrência reconhecida no Brasil (WHO, 2017). Estima-se que essas doenças estejam presentes em 149 países e atinjam cerca de um bilhão de pessoas, tendo um importante impacto na morbidade dos indivíduos. São enfermidades que ocorrem principalmente nos trópicos, devido ao clima quente e úmido, e são predominantes em países subdesenvolvidos, por apresentarem condições precárias de vida, onde grande parte da população não tem acesso ao saneamento básico e água potável (VANLERBERGHE et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, tais mazelas causam grandes impactos sociais e econômicos, pois pessoas afetadas por deficiências e incapacidades causadas por DTNs, muitas vezes sofrem estigma em suas comunidades, dificultando seu acesso aos cuidados necessários e levando ao isolamento social (WHO, 2021).

No Brasil, as DTNs estão presentes em todos os estados brasileiros e são consideradas um problema de saúde pública, sendo importante causa de incapacidade e morte prematura, afetando indivíduos de todas as idades, com maior prevalência em homens, jovens, crianças (< 1 ano) e pessoas com idade mais avançada (>70 anos) (MARTINS-MELO et al., 2018).

As doenças negligenciadas têm sido consideradas prioridade pelo governo do Brasil, que instituiu em 2006, o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) em doenças negligenciadas, com foco em sete doenças: dengue, doenças de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose. A iniciativa Ministério da Saúde em parceria com a Fiocruz buscam controle e à erradicação dessas doenças através de financiamentos em pesquisas cujos resultados contribuam para a condução da Política Nacional de Saúde e para a melhoria da qualidade dos serviços prestados pelo Sistema Único de Saúde, com intuito de beneficiar o maior número de pessoas e abordar os principais problemas de saúde da população nacional (Ministério da Saúde, 2008).

### **1.2 Doença de Chagas**

A doença de Chagas (DC) é classificada como uma DTN e foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. É também conhecida

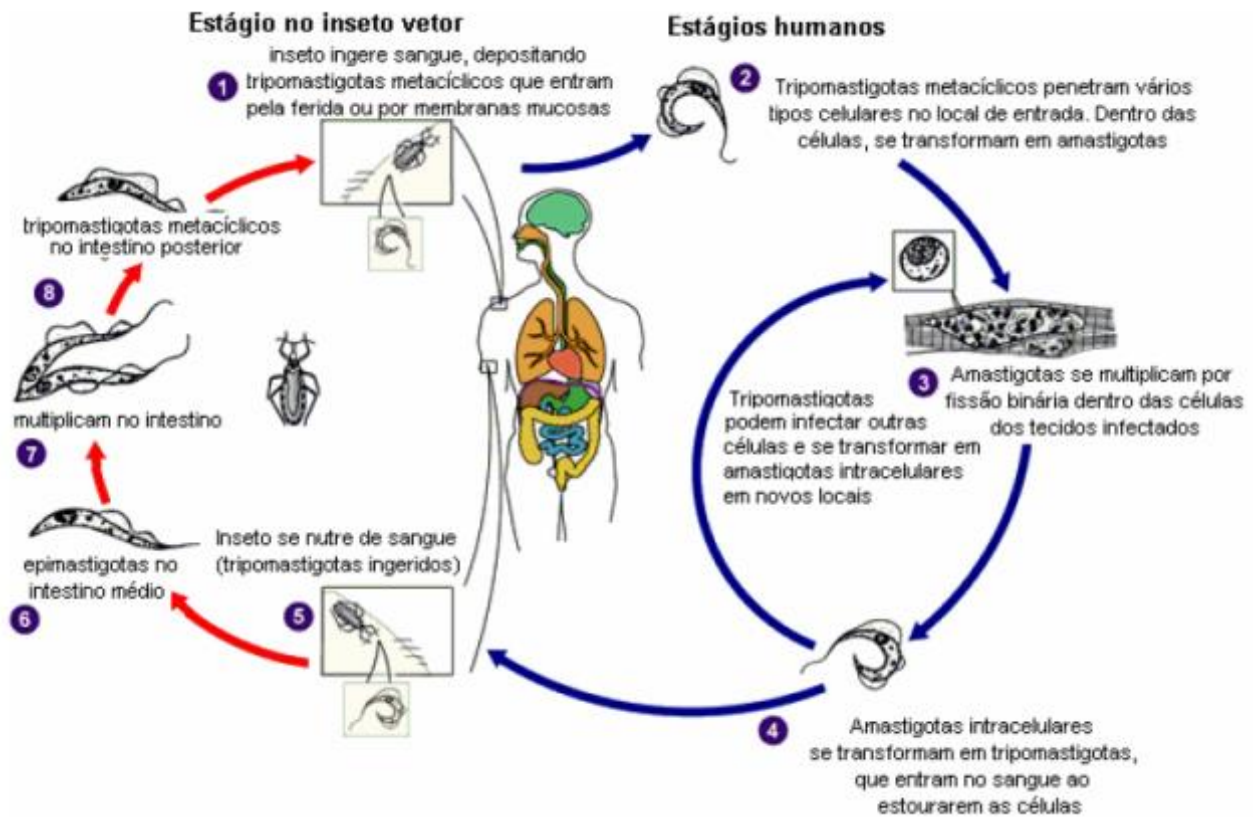
como tripanossomíase americana e considerada uma doença parasitária fatal. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas, e na América Latina, 21 países estão em áreas endêmicas (WHO 2021).

No Brasil, ações como controle químico vetorial e um aumento na triagem de candidatos à doação de sangue, desde 1975, geraram reduções no número de casos da DC (DIAS et al., 2016) mesmo assim, estima-se que um (1) milhão de brasileiros estão infectados, especialmente devido à variabilidade de vetores existentes e a grande quantidade de migrações para áreas endêmicas (HOTEZ et al., 2014).

A DC é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e classificada como uma antropozoonose. O principal vetor é um triatomíneo hematófago, do gênero triatoma, popularmente conhecido como barbeiro. Sua transmissão pode ocorrer ao homem via vetorial (repasto sanguíneo com excretas de triatomíneo na pele ou mucosa lesada); via transfusional, por transfusão de hemoderivados ou transplantes de órgãos por doadores contaminados; via vertical ou congênita entre gestante e feto; acidentes laboratoriais; e, até mesmo, por via oral (BALIZA et al., 2018; FERREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2020).

Conforme ilustrado na figura 1, o parasita *T. cruzi* é um protozoário flagelado intracelular, que possui três morfologias principais: epimastigota, forma replicativa encontrada apenas no triatomíneo; tripomastigota, encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado e responsável pelo início da infecção; e amastigota, que se replica intracelularmente nas células do hospedeiro vertebrado (OLIVEIRA et al., 2008). Apresenta um ciclo biológico do tipo heteroxeno, alternando entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado. Na transmissão vetorial, as fezes do inseto, contendo a forma tripomastigota metacíclica, são depositadas próximas ao local onde o triatomíneo realizou a picada, possibilitando que essas formas adentrem o organismo do hospedeiro vertebrado (SOUZA NETO et al., 2020). Em seguida, alcançam a corrente sanguínea e infectam várias células fagocíticas e não-fagocíticas. Dentro das células, as formas tripomastigotas transformam-se em amastigotas e iniciam o processo de multiplicação por divisão binária. Após intensa replicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos flagelados, que rompem a célula, podendo infectar células próximas ou se disseminar e invadir células e tecidos em locais distantes do corpo. Os tripomastigotas podem infectar outros triatomíneos no momento do repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo biológico no hospedeiro invertebrado. No intestino do

vetor, os tripomastigotas se transformam em epimastigotas, e depois em tripomastigotas biológico (GIRONES et al., 2005).



Fonte: Adaptador de Center for Disease Control and Prevention (2019).

**Figura 1** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas.

As manifestações da DC podem se apresentar em três fases: a fase aguda, a fase crônica assintomática e a fase crônica sintomática. Os sintomas da fase aguda costumam ser caracterizados por febre, mal estar, sinal de Romanã (nódulo na região ocular), chagoma de inoculação (nódulo cutâneo), alta parasitema, dentre outros (DA SILVA et al., 2019). No caso da fase crônica, 70% das infecções são assintomáticas, enquanto 20 a 30% apresentam manifestações irreversíveis, como cardiopatia chagásica, alterações no trato digestivo (megacólon e megaesôfago) e mudanças neurológicas que podem ser fatais (OPAS/WHO 2019; TARLETON 2016).

Algumas ações simples auxiliam na prevenção da transmissão, como colocar mosquiteiros e telas metálicas em janelas e portas para evitar a entrada do vetor, e o uso de roupas compridas e repelentes, principalmente à noite, por ser o período de maior infecção (SIMIONI, 2019).

Atualmente, a terapêutica da DC permanece parcialmente ineficaz, pois no mundo inteiro, dispõe-se apenas de dois fármacos para combater especificamente o parasita: Benzonidazol (BZN) e Nifurtimox. No Brasil, a única droga disponível no momento para o tratamento é o BZN. O Nifurtimox teve a sua comercialização interrompida na década de 1980, sendo disponibilizado pelo Ministério da Saúde (MS) em casos específicos de resistência ou graves efeitos colaterais associados ao BZN (AMATO et al., 2009; PONTES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, se administrados logo após a infecção, no início da fase aguda, ambos os medicamentos são totalmente eficazes na cura da doença, incluindo os casos de transmissão congênita. No entanto, a eficácia de ambos diminui, quanto mais tempo a pessoa está infectada, e as reações adversas são mais frequentes em idades mais avançadas (WHO, 2023).

Embora o uso clínico do BZN seja considerado seguro, efeitos adversos relativamente frequentes têm sido descritos na literatura. Dentre os mais graves estão a dermatopatia alérgica, depressão da medula óssea e a polineuropatia periférica, que em alguns casos, pode acarretar a interrupção do tratamento (AMATO et al., 2009; MORILLO et al., 2015; CANÇADO et al., 2002).

### **1.3 Interação com o sistema imune do hospedeiro**

Um dos aspectos mais importantes do curso da DC talvez seja a resposta imune, pois as manifestações clínicas são dependentes de fatores inerentes ao parasita e ao hospedeiro (SILVA et al., 1992). Após ultrapassar as barreiras físicas da pele e mucosas, a infecção pelo *T. cruzi* induz uma resposta inflamatória pela imunidade inata e adaptativa, humoral e celular do hospedeiro, dispondo de diversos mecanismos para evadir e modular a resposta imune em prol de sua sobrevivência (ACEVEDO et al., 2018).

A figura 2 demonstra a cascata de eventos da imunidade inata e adquirida, que ocorrem durante o curso da infecção. Durante a infecção, a imunidade inata desempenha papel fundamental, controlando a replicação e disseminação do parasita e atuando na patogênese da doença. (SILVA et al., 1992).

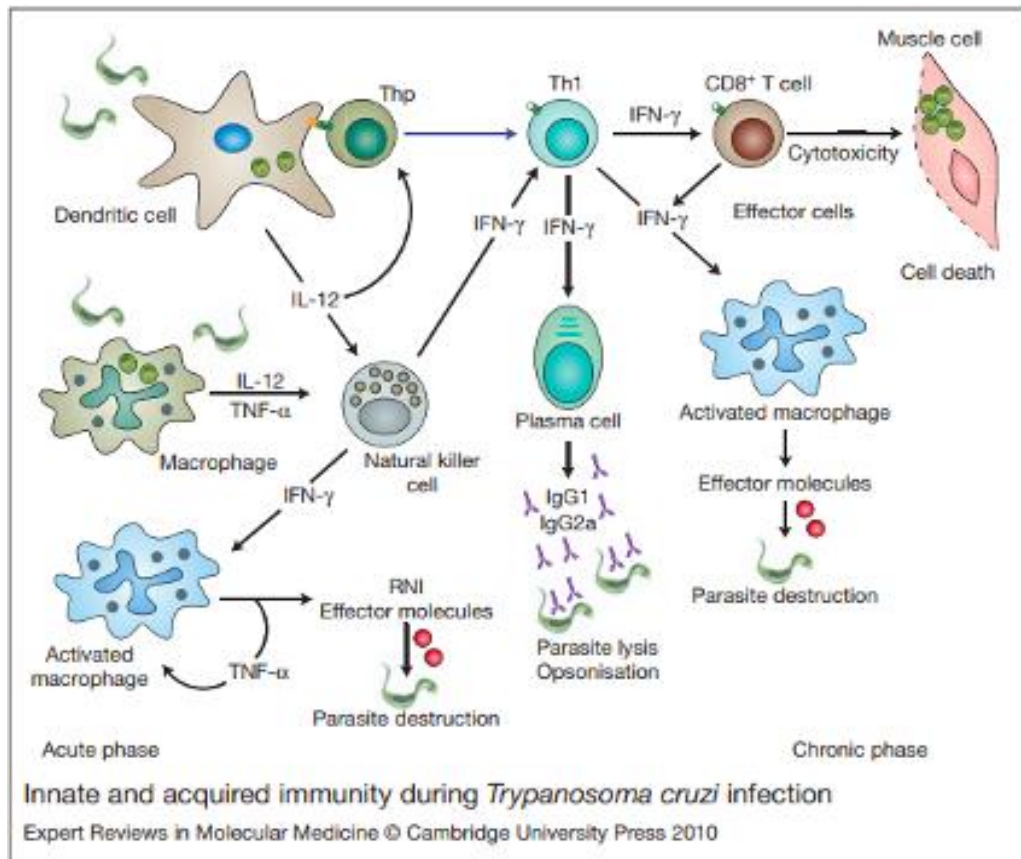


Figura 2 Imunidade inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*.  
Fonte: JUNQUEIRA et al., 2010.

Células com papéis na imunidade inata, como células natural killer (NK), células dendríticas e macrófagos, são elementos-chave no controle inicial da replicação de *T. cruzi*. As células NK limitam o crescimento parasitário e promovem o desenvolvimento da imunidade adaptativa (SCOTT et al., 1995). O macrófago é o principal atuante contra o parasita, pois, no início da infecção, quando o *T. cruzi* é fagocitado por macrófagos, ocorre indução da produção de interleucina-12 (IL-12), que age sobre as células NK levando à sua ativação. Há então o aumento da produção de IL-12 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) este, com o auxílio do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), atua sobre o macrófago, induzindo a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e levando à síntese de radicais livres de oxigênio (superóxido) e de nitrogênio (peroxinitrito), que possuem atividade tóxica contra o parasita (ALIBERTI et al., 1996).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas pela resposta à infecção do *T. cruzi*, provem da redução do oxigênio, gerando um grupo de íons, moléculas e radicais altamente reativos. As espécies reativas atuam principalmente causando sérios danos em macromoléculas biológicas, tais como, lipídios, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas (KLAUNIG et al.,

2011). Participam também de processos biológicos, tais como a biossíntese hormonal, sinalização celular e destruição de patógenos intracelulares (ROMA et al., 2016).

Em contrapartida, há a produção de citocinas regulatórias, como a interleucina-10 (IL-10), o fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) e a interleucina-4 (IL-4) que agem inibindo iNOS, levando ao aumento da replicação do parasita (WIRTH & KIERSZENBAUM 1985; SILVA et al., 1991; ABRAHAMSOHN & COFFMAN 1996; HÖLSCHER et al., 1998; SILVA et al., 1998). Estas citocinas produzidas durante a resposta imune inata conduzem à resposta imune adaptativa para os diferentes perfis de resposta imune como os perfis Th1 e Th2 (SILVA et al., 1992).

As células Th1 produzem IFN- $\gamma$  e induzem resposta imune efetora predominantemente celular, essencial para a defesa do hospedeiro, enquanto células Th2 produzem principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, atuando na resposta imune humoral. As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 atuam sobre linfócitos Th0 levando sua diferenciação para um perfil Th1 que é amplificado pela produção de mais citocinas inflamatórias. Esse processo ativa mecanismos efetores da imunidade adaptativa, como os linfócitos T citolíticos (CD8), estimulando sua diferenciação e proliferação (SILVA et al., 1992; HÖLSCHER et al., 1998; SILVA et al., 1995; VESPA et al., 1994; CARDILLO et al., 1996). Os linfócitos T CD8 são as principais células envolvidas na defesa contra agentes infecciosos intracelulares, e podem destruir as células parasitadas pelo *T. cruzi* que apresentam antígenos do patógeno via MHC-I. (DE SOUZA et al., 2004).

O sistema complemento é um dos principais integrantes da resposta imune inata, e atua na opsonização do patógeno, no recrutamento de células fagocíticas e provocando a lise parasitária por meio de uma cascata de eventos proteolíticos, a fim de interromper a infecção (CESTARI et al., 2010). O processo de ativação deste conjunto de proteínas plasmáticas pode ocorrer por três vias, clássica, alternativa e da lectina, as quais estão suscetíveis à interferência e modulação de moléculas expressas na superfície do parasita (LIDANI et al., 2017), em especial, as vias alternativas e das lectinas, que representam a primeira linha de defesa do organismo contra os parasitas (LAMBRIS et al., 2000).

O êxito do parasita em estabelecer uma infecção é estreitamente relacionado às várias formas evolutivas em seus ciclos de vida, já que a metaciclo-gênese concede as ferramentas necessárias à tripomastigota para sobreviver ao sistema imune do hospedeiro. Ademais, apenas as formas evolutivas que estejam expostas

à ação do sistema complemento durante a infecção é que irão apresentar adaptações específicas para evasão do parasita (JOKIRANTA et al., 1995).

No decorrer das transformações de suas formas evolutivas, o *Trypanosoma cruzi* adquire proteínas de membrana que permitem a sua sobrevivência (JOKIRANTA et al., 1995). Para conseguir resistir e estabelecer a infecção, o *T. cruzi* expressa moléculas de ligação do complemento, como a calreticulina, uma proteína ligada à superfície da tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT); proteína reguladora do complemento de *T. cruzi* (TcCRP) ou gp 160; proteína inibidora do receptor C2 do complemento trifuncional de *Trypanosoma cruzi* (TcCRIT); gp 58/68 e Fator Acelerador de Decaimento de *Trypanosoma* (T-DAF). (CESTARI et al., 2010; LIDANI et al., 2017).

O T-DAF é uma proteína de superfície presente na tripomastigota metacíclica e na tripomastigota sanguínea (RIMOLDI et al., 1988). O T-DAF se liga às proteínas do complemento e acelera a dissociação das C3 convertases, levando à inibição de sua atividade catalítica e inibindo as três vias do sistema complemento (TAMBOURGI et al., 1993; CESTARI et al.; 2010).

A proteína gp 58/68 é uma glicoproteína que faz parte do receptor fibronectina/colágeno, importante na fixação do *T. cruzi* às células dos mamíferos. É encontrada na superfície das tripomastigotas ou liberada para o meio extracelular, e possui ação reguladora através da sua ligação ao fator B, evitando, a formação da C3 convertase da via alternativa. (FISCHER et al., 1988; OUAISSI et al., 1986; VELGE et al., 1988).

A Glicoproteína 160 (gp 160) também é uma proteína reguladora presente na membrana de tripomastigotas e também liberada espontaneamente em meio de cultura. Apresenta a capacidade de unir-se aos fragmentos C3b e C4b evitando a formação da C3 convertase da via alternativa e via clássica (NORRIS et al., 1994).

Descoberta nos anos 2000, a TcCRIT é encontrada na superfície de tripomastigotas e está relacionada a alta resistência dos parasitas à lise mediada pelo sistema complemento. É capaz de inibir a clivagem de C2 por MASP2 ou C1s, evitando a formação da C3 convertase pela via clássica e via das lectinas (INAL et al., 2005).

Uma última proteína envolvida na evasão do parasita, a TcCRT tem a capacidade de evitar a clivagem do C4 e, assim, inativar a cascata do complemento durante sua fase de ativação pela via das lectinas (FERREIRA, MOLINA et al., 2004).

O aparecimento e aumento de anticorpos específicos IgG1, IgG2a e IgG2b estão envolvidos na eliminação de formas sanguíneas do parasita e são observados no início da fase crônica (BRENER et al., 2000; KRETTLI et al.; 1982). Para sobreviver aos eventos da resposta imune, um dos mecanismos de modulação e evasão do *T. cruzi* se dá através da produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas, que podem contribuir para a resistência do hospedeiro contra a infecção ou causar danos teciduais decorrentes de reações inflamatórias exacerbadas (PÉREZ-ANTÓN et al., 2019).

Essas respostas são importantes para o controle tecidual e da parasitemia, mas não são capazes de eliminar a infecção parasitária, pois o sucesso da infecção depende principalmente da capacidade de resistir ao ataque oxidativo, principalmente dos macrófagos do hospedeiro, levando a doença crônica (GIRARD et al., 2018).

#### **1.4 Diferenças imunológicas entre linhagens de camundongos BALB/c e**

##### **C57BI/6**

Sabe-se que linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 podem apresentar respostas imunológicas diferentes, e isso pode influenciar o curso da infecção pelo parasita, incluindo a parasitemia e desfecho com intervenção farmacológica (FERREIRA et al., 2018).

No presente trabalho, foram utilizados nos experimentos realizados, duas cepas de camundongos, BALB/c e C57BI/6, que demonstram respostas imunológicas diferentes, o que pode influenciar principalmente a parasitemia e o desfecho de uma intervenção durante o curso da DC. Por esse motivo, é necessário entender como cada linhagem se comporta durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Camundongos BALB/c e C57BL/6, infectados com *T. cruzi* com a cepa Y – DTU II, em diferentes concentrações  $1 \times 10^2$  e  $5 \times 10^2$  por via intraperitoneal, apresentam o tempo para o pico da parasitemia semelhante, porém a injeção de maior concentração do parasita, promove um pico maior de parasitemia (PEDRA-REZENDE et al., 2021). Ainda, os camundongos C57BL/6 apresentam níveis de parasitemia menores comparados aos camundongos BALB/c, além de apresentarem taxa de sobrevivência superior aos BALB/c (PEDRA-REZENDE et al., 2021). De



forma ampla, os animais da linhagem C57BL/6 apresentam uma resistência e controle do *T. cruzi*, apresentando uma melhor evolução da infecção, com baixa carga parasitária nos tecidos, além de menor quantidade de células inflamatórias. Este perfil é parecido utilizando diferentes concentrações do parasita, apresentando evidências da suscetibilidade dos camundongos BALB/c ao *T. cruzi* (VESPA et al., 1994).

A alteração da cepa e até mesmo da concentração do inóculo para infecção pode alterar o tempo do pico da parasitemia, que é o caso da infecção com camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* cepa VL-10 na concentração de  $5 \times 10^4$ , com o pico da parasitemia ocorrendo no dia 27 após infecção. (MARIA et al., 2017). No estudo de SANTOS et al, 2015, foi realizada infecção com  $5 \times 10^3$  parasitas e a cepa Y de *T. cruzi*, por infecção intraperitoneal em camundongos C57BL/6 para avaliar diferentes abordagens de tratamento usando Benzonidazol e Suramin. Os animais infectados e não tratados apresentaram um pico de parasitemia no 6º dia, com uma taxa de mortalidade de 40% (SANTOS et al., 2015).

A carga parasitária de  $1 \times 10^3$  tripomastigotas da cepa Y foi utilizada por ALVES et al., 2019, para realizar uma infecção por *T. cruzi* em C57BL/6, e a parasitemia atingiu o pico no 9º dia (ALVES et al., 2019). Também parece que uma quantidade menor de *T. cruzi* influencia o curso do pico de parasitemia, como mostrado em camundongos C57BL/6 infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^2$  tripomastigotas da cepa colombiana, que tiveram o pico de parasitemia no 42º dia pós-infecção, e uma taxa de sobrevivência de 80%, considerando um acompanhamento de 90 dias pós-infecção (SILVERIO et al., 2012).

Em síntese, diferentes cepas e concentrações de *T. cruzi*, linhagem de camundongos e tipos de acompanhamento foram usados pelos pesquisadores nesse campo. Compilando os dados, os camundongos BALB/c e a cepa Y, além da via intraperitoneal de infecção, são os modelos animais mais comumente usados para a doença de Chagas. A carga parasitária e a cepa de *T. cruzi* irão definir o curso da parasitemia e a taxa de mortalidade.

### **1.5 *Cecropia pachystachya* Trécul**

*Cecropia pachystachya* (Figura 3) pertence à família Urticaceae e é popularmente conhecida como embaúba branca. No território brasileiro ocorrem cerca de 100 espécies do gênero *Cecropia*, sendo encontradas no Norte,

principalmente na Floresta Amazônica, parte do Centro-Oeste e nas regiões Sudeste e Sul (PACHECO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).



Figura 3 Folhas de embaúba branca – *Cecropia pachystachya* Trécul  
Foto: João Medeiros CC 2.0

As folhas são utilizadas na medicina tradicional com propriedades antitussígena, expectorante, antiasmática (YURQUINA et al., 2008), hipoglicemiante (ARAGÃO et al., 2010), anti-hipertensiva, diurética, anti-inflamatória, além de serem utilizadas no tratamento de infecções pulmonares (PACHECO et al., 2014).

Estudos fitoquímicos da planta identificaram a presença de diferentes compostos como flavonoides (ARAGÃO et al., 2010; COSTA et al., 2011), proantocianidinas (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001) e terpenoides como ácidos ursólico (HIKAWCZUK et al., 1998), pomólico, oleanólico e tormêntico,  $\beta$ sitosterol, sitosterona e  $\alpha$ -amirina (HIKAWCZUK et al., 1998; UCHÔA et al., 2010).

Os flavonoides possuem capacidade de modular a expressão gênica pró-inflamatória das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LPO), e também ativam o fator nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ) (BASTIANETTO et al., 2000). O NF- $\kappa$  $\beta$  é uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B (SEN et al., 1986), e pode ser ativado por diversos estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, fatores ativadores de linfócitos T e B, LPS bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (MCKAY et al., 1999). Além do mais, o fator nuclear NF- $\kappa$  $\beta$  também é

descrito como um dos mais importantes reguladores pró-inflamatórios de expressão gênica, sendo responsável por mediar a síntese de diversas citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6, e IL-8, bem como a COX-2. (TAK et al., 2001; LEE et al., 1998). No curso da inflamação, os flavonoides neutralizam a formação de espécies reativas de oxigênio e evitam a degradação do tecido conjuntivo. (KIM et al., 2004).

O ácido ursólico é um triterpeno pentacíclico de origem natural e possui várias propriedades medicinais importantes, como anti-inflamatório, analgésico (SILVA et al.; 2006), hepatoprotetor, antitumoral (LIU, 1995) e cardioprotetor (SENTHIL et al.; 2007). Diversos resultados demonstraram o potencial do ácido ursólico como tratamento para DC. Sua atividade tripanocida em tripomastigotas do parasita, foi descrita pela primeira vez em experimentos *in vitro*, por Cunha et al. em 2003 (CUNHA et al.; 2003). Esse mesmo grupo relatou, em 2006, uma redução de parasitas de 75,7% durante o pico parasitêmico em camundongos (CUNHA et al.; 2006).

Segundo estudos, a atividade anti-inflamatória do ácido ursólico é atribuída à inibição de diferentes eventos de resposta inflamatória, e seus principais alvos inflamatórios incluem transcritores e interleucinas pró e anti-inflamatórias (KASHYAP et al., 2016; ZERIN et al., 2016). Uma demonstração da atividade anti-inflamatória do ácido ursólico foi realizada em um estudo com extrato de folhas de goiaba. Os pesquisadores confirmaram que o ácido ursólico pode inibir a produção de óxido nítrico induzida por LPS em células RAW264.7 inibindo a expressão de iNOS (KIM et al., 2015). Em outro experimento utilizando camundongos Sprague-Dawley machos, foi detectada a expressão do gene inflamatório iNOS em um modelo de inflamação aguda induzida por LPS. O estudo sugeriu que o LPS induziu a expressão de iNOS, mas a administração concomitante de ácido ursólico suprimiu a expressão dessa enzima, mostrando que o ácido ursólico tem atividade anti-inflamatória benéfica e pode ser usado para prevenir e tratar a inflamação (ZHANG et al., 2017).

Segundo a revisão de DAGA et. al (2020), os extratos de *C. pachystachya* provavelmente afetam os mecanismos desencadeados pelos mediadores inflamatórios, por possuírem altos níveis de polifenóis que são antioxidantes e atuam tanto na eliminação de radicais livres, quanto na inibição enzimas da cascata pró-inflamatória.

É fundamental que sejam buscadas alternativas de tratamentos para Doença de Chagas, que sejam acessíveis e aplicáveis nas diferentes realidades brasileiras.

Como andamento de estudos relativos aos efeitos leishmanicidas da Embaúba e, considerando a possibilidade de resultados replicáveis por serem parasitas com semelhanças filogenéticas e morfológicas, pretendeu-se aqui demonstrar a atividade de extrato da planta sobre o *Trypanosoma cruzi*.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora do extrato obtido das folhas de Embaúba em camundongos infectados com o parasita *Trypanosoma cruzi*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Realizar a infecção intraperitoneal de camundongos C57BL/6 e BALB/c com a cepa Y de *T. cruzi*
- b) Avaliar a parasitemia e alterações celulares sanguíneas dos animais tratados ou não com o extrato de embaúba em grupos infectados e não infectados com *T. cruzi*.
- c) Examinar a atividade imunomoduladora do tratamento com extrato de embaúba em camundongos infectados com o parasita *T. cruzi*, por meio da dosagem de citocinas plasmáticas.
- d) Avaliar a atividade imunomoduladora do tratamento com extrato de embaúba em camundongos infectados com o parasita *T. cruzi*, por meio da dosagem de citocinas produzidas pelo baço *ex vivo*.
- e) Investigar a ação do extrato de *C. pachystachya* sobre macrófagos infectados pelo *T. cruzi in vitro*, analisando-se o número de formas amastigotas intracelulares, assim como a quantidade de óxido nítrico e citocinas no sobrenadante da cultura.
- f) Investigar a toxicidade *in vivo* do extrato supercrítico de *C. pachystachya* em animais não infectados, por meio da dosagem de metabólitos séricos, como uréia, AST, ALT e CK.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Aspectos éticos da pesquisa**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais com animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. A pesquisa foi aprovada pelo parecer: Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa No 05/23 – CEUA (Anexo I). A autorização para manutenção das cepas infecciosas de *T. cruzi* consta no Anexo II, parecer nº 29-19.

### **3.2 Extratos**

#### **3.2.1 Material vegetal**

As folhas sadias (somente folhas, sem os talos) de *Cecropia pachystachya* foram coletadas em pontos aleatórios de árvore na cidade de Quatro Pontes, Paraná (S 24°35'40,56" e O 53°57'46,60") SisGen número: A27B52F. Folhas com face superior áspera e a inferior com densa camada de pêlos esbranquiçados. As folhas possuíam de 9 a 13 segmentos, com incisões que às vezes atingiam o pecíolo. O material foi seco em estufa a 40°C por 3 dias e foi moído em moinho de facas. As espécies foram identificadas pelo Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e uma exsicata (nº 3000) foi depositada neste mesmo Herbário.

#### **3.2.2 Extrato e identificação do composto**

As folhas foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C por 72 h. Após secas, foram moídas em triturador de facas. As partículas resultantes foram extraídas com CO<sub>2</sub> (>99%) supercrítico (pressão de 20 Mpa e temperatura de 55 °C) utilizando n-hexano como solvente. A identificação química foi realizada em Cromatógrafo Gasoso-Espectrômetro de massas (GC-MS QP2010 SE (Shimadzu)). Esse processo foi realizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação no Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* Toledo e cedido para a realização deste trabalho.

Os extratos foram primeiramente diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para a realização dos ensaios. Então, foi preparada uma solução-mãe na concentração de 40 mg/ml do extrato testado.

### **3.3 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 com aproximadamente 2 meses de idade, machos/fêmeas, mantidos no biotério, em caixas plásticas, a temperatura de aproximadamente 23 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 h, com

acesso livre à água e ração comercial. Todos os procedimentos deste trabalho seguiram a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos. Todos os experimentos do presente trabalho foram autorizados pelo 05/23 – CEUA, e envolve a produção, manutenção ou utilização de animais (Anexo I).

### **3.4 Cultivo e manutenção de células L929**

Células L929 foram mantidas a -80 °C em solução de congelamento contendo 10% de DMSO e 90% de soro fetal bovino (SFB). Para os ensaios, as células são descongeladas em banho-maria a 37 °C e transferidas para frasco de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Em seguida, armazenadas em estufa e incubadas à temperatura de 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Então, foram avaliadas diariamente através do auxílio de microscópio invertido modelo Nikon – Eclipse TS100 e o meio RPMI foi trocado rotineiramente a cada 2 dias.

Após atingir confluência de 80%, as células foram removidas do frasco utilizando raspador de células, e em seguida, transferidas para um tubo estéril cônico e centrifugadas a 1500 rpm por 05 min, a temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio RPMI a 10% de SFB para realização de subcultivos.

### **3.5 Parasitas: manutenção das formas tripomastigotas**

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram mantidas através de repiques semanais em camundongos da linhagem BALB/c por meio de inoculação intraperitoneal do protozoário (protocolo nº 29-19 - Anexo II). A ponta da cauda de animais infectados há aproximadamente 1 (uma) semana, foi cortada para obtenção de uma gota do sangue e colocada entre lâmina e lamínula para verificação da positividade da infecção. Confirmando-se a presença do parasita, foi então realizada uma punção cardíaca no animal sob anestesia e o sangue coletado foi inoculado intraperitonealmente em animais saudáveis. Após a retirada do sangue, o animal, ainda sedado, recebe uma nova dose do anestésico para a eutanásia, sendo assim eutanasiado pelo excesso de anestésico.

Formas tripomastigotas sanguíneas, cepa Y, foram obtidas por punção cardíaca em camundongos BALB/c infectados. O sangue recuperado foi utilizado para infectar culturas de células L929, por 12 h. Após o tempo de infecção, o sangue

foi retirado e então, realizadas sucessivas lavagens com solução salina tamponada (PBS) estéril a 37 °C, para retirada dos parasitas não internalizados e, em seguida, adicionado aos frascos, meio RPMI para manutenção celular.

A saída das formas tripomastigotas, entre 5 a 7 dias após a infecção foi acompanhada em microscópio invertido modelo Nikon – Eclipse TS100. O sobrenadante contendo os parasitas, é centrifugado a 2987 g por 30 min, a 8 °C e o *pellet* utilizado para a contagem dos parasitas na câmara de Neubauer. As concentrações foram ajustadas de acordo com os diferentes ensaios.

### **3.6 Obtenção de macrófagos peritoneais**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos através da exposição do peritônio de camundongos eutanasiados com excesso de anestésico (xilazina 40 mg/kg / quetamina 400 mg/kg), por via intradérmica, com assepsia da região abdominal seguida de infusão de 10 mL de solução salina tamponada (PBS) estéril a 4°C na cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c. Em seguida, realiza-se a massagem na região peritoneal para obtenção dos macrófagos. O PBS é retirado com a própria agulha e seringa de inoculação e a suspensão resultante transferida para um tubo estéril cônico, e centrifugado a 1500 rotações por minuto (rpm) por 05 minutos.

As células obtidas após centrifugação foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. O número de células foi determinado pela contagem em Câmara de Neubauer e ajustadas na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. Posteriormente estas células foram plaqueadas, em placas de 96 e incubadas por 2 horas a 37°C sob 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para aderência.

### **3.7 Avaliação do extrato em células estimuladas por LPS**

Para esta análise utilizou-se o método descrito por GREEN et al., (1982) com modificações. Os macrófagos peritoneais de BALB/c, coletados de acordo com o item 3.6, foram plaqueados a  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços, deixando-se aderir a 37 °C sob 5% CO<sub>2</sub> por 2 h.

O meio de cultura foi retirado e foi adicionado aos poços 200µL das diferentes concentrações do extrato contendo LPS a 0,1 µg/mL e somente meio de cultura como controle negativo. Deixou-se o tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Passado o tempo de tratamento, 100 µL do sobrenadante foram utilizados para reagir com 100 µL do reagente de Griess e aguardou-se 10 minutos para a

estabilização da formação do produto (composto azo), sendo então realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm.

### **3.8 Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida sobre formas amastigotas em macrófagos peritoneais murinos**

Para avaliar o efeito do extrato sobre as formas amastigotas da cepa Y, foi seguido o protocolo de MEIRA et al., 2016. Macrófagos peritoneais obtidos de acordo com o item 3.6 foram plaqueados em lamínulas redondas de 13 mm em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço e cultivadas em placas de 24 poços por 4 h.

As formas tripomastigotas do *T. cruzi*, obtidas de acordo com o item 3.6 foram adicionadas às células já aderidas, em uma razão de 10:1 (*T. cruzi*:Macrófagos) e, após 12 h, os parasitas que não internalizaram foram retirados por lavagens sucessivas com PBS, permanecendo assim, apenas as células contendo a forma amastigota (forma internalizada). Foram então adicionados aos poços 400µL das diferentes concentrações do extrato, somente meio RPMI como controle negativo, DMSO (0,6%) como controle branco, e como controle positivo, foi utilizado o medicamento de referência (BZN) na concentração de 50 µg/mL. As células permaneceram em tratamento a 37 °C sob 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h, após isso, o sobrenadante foi retirado, as lamínulas foram lavadas com PBS morno, e então foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A avaliação dos tratamentos foi determinada por contagem direta do número total de amastigotas intracelulares em 100 células, em duplicata, contando-se ao menos 200 macrófagos, utilizando um microscópio óptico em aumento de 400 vezes.

O cálculo da avaliação do tratamento foi feito determinando-se a média de parasitas no interior dos macrófagos. As diferentes porcentagens de inibição de amastigotas proporcionadas pelos tratamentos foram utilizadas para determinar a concentração inibitória dos extratos para 50% das formas amastigotas (CI<sub>50</sub>). O CI<sub>50</sub> foi calculado através do programa GraphPad Prism 8.0, utilizando-se um modelo logarítmico de regressão não-linear.

### **3.9 Avaliação da toxicidade do extrato em animais não-infectados**

Neste experimento, foram utilizados 10 camundongos da linhagem BALB/c, divididos em 2 grupos de 5 camundongos cada, ambos não infectados, sendo um grupo controle que recebeu solução aquosa com DMSO na mesma concentração do



extrato (100mg/kg/dia) e outro grupo em tratamento com extrato de *Cecropia* na concentração de 100mg/kg/dia administrados por gavagem, do dia 1 ao dia 10. Após esse dia, os camundongos não receberam nenhuma gavagem por 4 dias. No dia 14, todos foram eutanasiados.

Então, foram realizados a avaliação dos seguintes parâmetros: AST e ALT como marcadores hepáticos; Ureia como marcador renal; CK total como marcador de lesão muscular, a qual majoritariamente provém do músculo esquelético e uma pequena quantidade é obtida do tecido cardíaco; além de número de leucócitos (células/mm<sup>3</sup>) e eritrócitos sanguíneos (células/mm<sup>3</sup>); e NO de macrófagos peritoneais.

### **3.10 Avaliação da atividade do extrato na infecção experimental aguda de *T. cruzi* em camundongos (BALB/c e C57Bl/6)**

Para cada linhagem de animais, foi realizado um experimento, e para cada um, foram utilizados 20 camundongos, separados em 4 grupos com 5 camundongos cada, todos infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* derivados do sangue (cepa Y, 1.000 parasitas/animal em camundongos C57Bl/6 e 500 parasitas/animal em camundongos BALB/c intraperitonealmente), sendo: grupo infectado e não-tratado (Controle), grupo infectado e tratado com BZN (BZN), grupo infectado e tratado com extrato (CPE), grupo infectado e tratado com extrato e BZN (CPE/BZN).

Na figura 4, está esquematizado o protocolo de infecção e tratamento dos animais, todas as etapas foram realizadas tanto para linhagem BALB/c, quanto para C57Bl/6. Todos os grupos receberam os tratamentos ou veículos por gavagem. Os animais não-tratados receberam somente o veículo nos mesmos moldes do tratamento com o extrato. Os camundongos tratados com o extrato receberam diariamente uma dose de 100mg/kg/dia do extrato de Embaúba oralmente, durante 10 dias, a partir do quarto dia de infecção. Os animais tratados com BZN receberam a dose de 100mg/kg/dia de comprimido, via oral, durante 10 dias, a partir do quarto dia da infecção. A parasitemia sanguínea foi avaliada em condições padronizadas por observação microscópica direta em aumento de 400x de 50 campos usando 5 µL de sangue heparinizado obtido da veia da cauda. Esses procedimentos foram realizados em dias alternados a partir do terceiro dia após a infecção por *T. cruzi*.

No dia 20 da infecção, os animais foram eutanasiados, e foram coletados: o sangue total por punção cardíaca com agulhas e seringas contendo heparina; sangue total e diluído em líquido de Turk para hemólise para obtenção e

contagem total de leucócitos, contados manualmente através do microscópio; o baço, que após a sua remoção, foi macerado de forma estéril em meio de cultura RPMI e as células obtidas deste maceramento foram plaqueadas na quantidade de  $5 \times 10^6$  células totais em placas de 24 poços -após 48h de incubação, o sobrenadante foi retirado e então foi realizada a dosagem de NO e citocinas (DAGA et al., 2023). Esse experimento foi repetido para camundongos BALB/c e C57Bl/6.

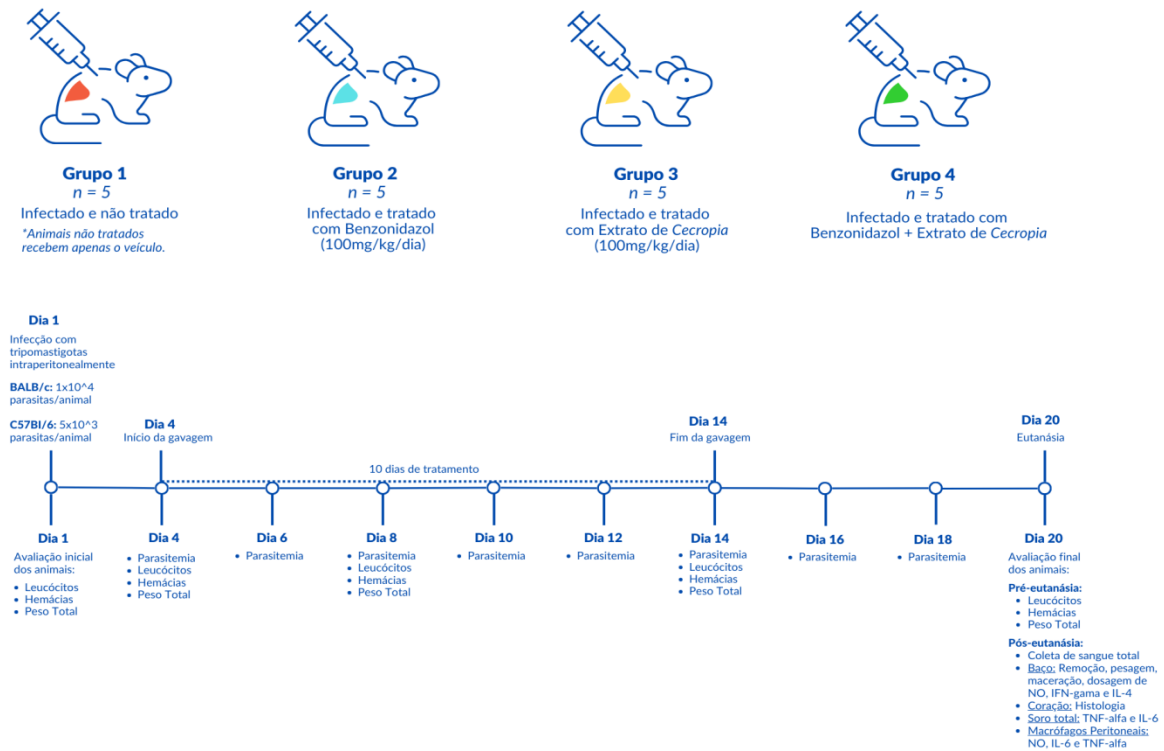


Figura 4 Linha do tempo dos experimentos realizados para avaliação da atividade do extrato na infecção experimental aguda de *T. cruzi* em camundongos (BALB/c e C57Bl/6).

### 3.11 Dosagem da produção de óxido nítrico (NO)

Os macrófagos peritoneais coletados de acordo com o item 3.7 foram plaqueados a  $2 \times 10^5$  células por poço em placa de 96 poços, deixando-se aderir a  $37^\circ\text{C}$  sob 5%  $\text{CO}_2$  por 2 horas. Então, o RPMI foi retirado e foram adicionados aos poços as diferentes concentrações do extrato. Para a produção de NO foi utilizado como controle positivo o lipopolissacarídeo (LPS) a  $0,1 \mu\text{g/mL}$  e DMSO (0,6%) como controle branco.

As células foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  sob 5% de  $\text{CO}_2$  por 48 horas. O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), onde  $100 \mu\text{L}$  do sobrenadante foi utilizado para reagir com  $100 \mu\text{L}$  do reagente de Griess (solução 1:1 de naftiletlenodiamino 0,1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-

aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)) e após 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo) foi então realizada a leitura em leitor de microplaca (BIOTEK modelo EPOCH) a 550 nm. Os dados expressos em micro molar ( $\mu\text{M}$ ), através de curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio RPMI, variando de 5 a 100  $\mu\text{M}$ .

Foi realizada a dosagem de NO proveniente do sobrenadante do experimento com amastigotas (item 3.8), e do sobrenadante obtido com as células esplênicas.

### **3.12 Detecção da secreção de citocinas IL- 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10**

Para este ensaio foi utilizado sobrenadante de células de macrófagos peritoneais infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* mantidos em tratamento com os extratos de Embaúba por 48 h e o soro proveniente de animais participantes do experimento *in vivo*, os quais foram quantificadas IL- 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 utilizando kit comercial. No sobrenadante das células do baço de animais infectados foram quantificadas as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4. A metodologia empregada foi através do ensaio imunoenzimático, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

### **3.13 Análise histológica dos corações dos camundongos C57BL/6**

Ao final do experimento com os camundongos C57BL/6, os mesmos tiveram os corações retirados para avaliação dos achados histológicos, sendo os órgãos fixados com solução de formaldeído (10% em PBS) durante 24 horas. Posteriormente, o material ficou em água corrente durante 48 horas e então foi estocado em álcool 70% até a inclusão em parafina.

O material foi processado em cortes histológicos seriados de 5 micrômetros. A lâmina com o material cortado, ainda em parafina, foi fixada em estufa a 80 °C durante 24 horas. Após isso, a lâmina foi desparafinada, hidratada e corada pelas técnicas de coloração Hematoxilina – Eosina e Tricrômico de Masson (ANEXO II). Foram realizados ao menos seis cortes de cada órgão.

Foram analisados o infiltrado celular na coloração de H&E e a quantidade de colágeno na coloração de Masson, utilizando-se o Programa ImagePro-Plus/ImagePro-Plus 6.0. Para essas análises foram fotografadas (Fotomicroscópio Olympus BX53) pelo menos cinco cortes histológicos de cada coração. Para o infiltrado, uma área padrão foi determinada em cada foto e contados os núcleos de todas as células presentes nesta área. Para a determinação do colágeno, foi usada

a função Segmentation, a qual separa a intensidade de cada faixa de cor presente na figura.

### 3.14 Análise estatística

Os dados foram submetidos à estatística analítica para comparação das médias, através do teste de ANOVA, com pós-teste de *Tukey*. Para tanto, foi adotado o nível de confiança de 95%, com valor de  $\alpha$  fixado em 0,05, adotando-se como significativo um  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 8.0 e Microsoft Excel, ambos para a plataforma Windows 10 da Microsoft, para a análise estatística.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividades *in vitro* do extrato supercrítico de *C. pachystachya*

A possível capacidade anti-inflamatória do extrato de *C. pachystachya* foi testada *in vitro* utilizando-se macrófagos murinos estimulados por LPS. Na figura 5a é possível observar que o extrato de embaúba foi capaz de inibir a produção de NO na concentração de 300 ug/mL. Ainda, a produção de NO quando as células foram tratadas com DMSO 0,6%, não foi diferente do controle de estímulo(LPS), indicando que o solvente não interferiu na ação mostrada pelo extrato.

O óxido nítrico (NO) é gerado pela ação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e é um potente mediador pró-inflamatório. O NO, ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o seu produto de reação ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) podem ser gerados em excesso durante a resposta do hospedeiro ao patógeno. O processo inflamatório é designado, em parte, à liberação de espécies reativas de oxigênio por macrófagos ativos e leucócitos (FANG et al., 2007; WALLACE et al., 2002; ZHANG et al., 2017).

As folhas de embaúba são compostas por uma alta quantidade de flavonoides, e no extrato de HOSCHEID et al., 2020 foram identificados vários compostos como esqualeno, ácido ursólico, ácido pomólico,  $\beta$ -sitosterol, vitamina E,  $\alpha$ -amirina, catequina, isovitexina e isoorientina. Sendo 30,35% de ácido ursólico, 15,76% de esqualeno, 12,76% de ácido pomólico, 5,84% de vitamina E, 4,49% de catequina, 2,16% de  $\alpha$ -amirina, 0,29% de isovitexina e 0,25% de isoorientina.

Vários estudos demonstram a ação anti-inflamatória do ácido ursólico presente no extrato da *Cecropia*. Em 2000, RYU et al., evidenciaram que o ácido ursólico é capaz de inibir a produção de NO em células RAW264.7. Corroborando

com esse achado, um estudo de KIM et al., 2015, demonstrou a capacidade do ácido ursólico em inibir a produção de NO em células RAW264.7 estimuladas por LPS. Assim, nossos achados da figura 5a vão ao encontro dos demonstrados na literatura, provando o efeito anti-inflamatório do ácido ursólico presente na embaúba.

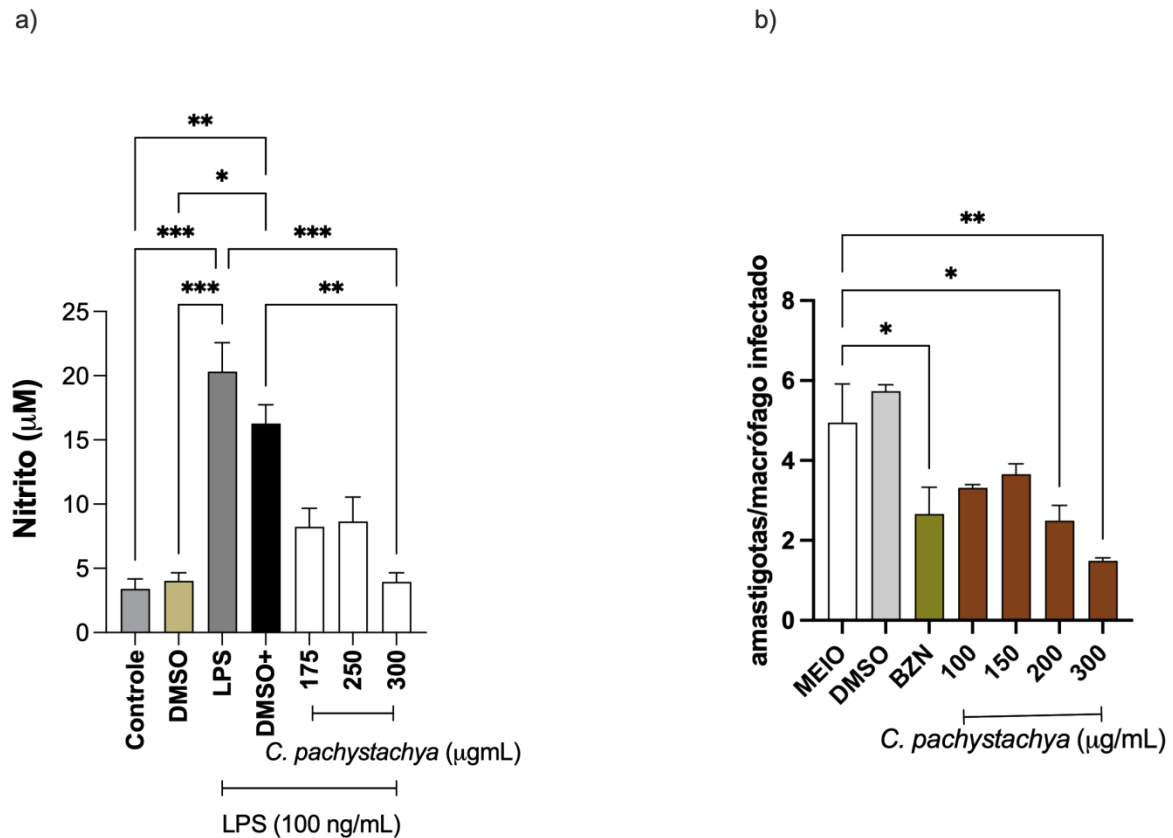


Figura 5 a) Produção de NO por macrófagos murinos submetidos ao tratamento com extrato supercrítico de *Cecropia pachystachya* e LPS simultaneamente. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  – diferente de LPS; #  $p < 0,01$  – diferente de DMSO. b) Efeitos do extrato supercrítico das folhas de *C. pachystachya* sobre formas amastigotas de *T. cruzi*. Os valores apresentados são a média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de dois experimentos independentes em duplicata. \* Significativamente diferente do controle, \*  $p < 0,05$ .

A capacidade anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* do extrato das folhas de *C. pachystachya* foi testada contra as formas amastigotas do parasita, novamente utilizando-se de macrófagos murinos. Assim, na figura 5b é possível observar que a quantidade de parasitas intracelulares por célula nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g/mL}$  foi significativamente menor que as quantidades nos controles MEIO e DMSO, de maneira similar ao demonstrado pelo controle positivo, o medicamento benznidazol, o qual foi utilizado na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Com a inibição causada pelo extrato frente às formas amastigotas do *T. cruzi* na maior concentração testada foi de 69,8%, superior ao obtido pelo benznidazol, de 49,1%. Com as várias concentrações testadas, foi possível calcular o  $\text{IC}_{50}$  do extrato

de *C. pachystachya* frente às formas amastigotas do parasita, resultando no valor de 137,2 ug/mL. Anteriormente no nosso laboratório, foi calculada a citotoxicidade do extrato frente à macrófagos murinos *in vitro*, obtendo-se uma CC<sub>50</sub> de >400 ug/mL, com o qual é possível calcular o valor do índice de seletividade do extrato (IS= CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>), chegando-se ao valor de >2,92, isto é, o extrato é três vezes mais seletivo para o parasita do que para as células mamíferas.

O ácido ursólico é também um dos principais componentes de plantas da espécie *Miconia*, que foi alvo dos estudos de CUNHA et al., 2003, que demonstrou apresentar um efeito tripanocida. Em seu experimento posterior, CUNHA et al., 2006 avaliaram o tempo de sobrevivência dos animais, e o uso de ácido ursólico em camundongos Swiss infectados pela cepa Y foi capaz de reduzir os parasitas no pico parasitêmico em 75,7%.

Posteriormente, FERREIRA et al., 2010 examinaram a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* (camundongos Swiss albino) de dois compostos, que continham ácido ursólico e ácido oleanólico contra a cepa boliviana de *T. cruzi*, e observaram que ambos foram capazes de controlar o pico de parasitemia, porém, *in vitro*, o composto com ácido ursólico provou ser um agente tripanocida mais ativo que o composto com ácido oleanólico, e *in vivo* reduziu o pico parasitêmico em 60%, comparado a 40% do composto com ácido oleanólico. Assim, nosso extrato em experimento *in vitro* com amastigotas, corrobora com esses achados da literatura.

#### **4.2 Avaliação da toxicidade *in vivo* do extrato supercrítico de *C. pachystachya***

Com o intuito de avaliar a toxicidade do extrato em animais não infectados, o mesmo foi administrado oralmente em animais sadios durante dez dias. O peso dos animais não variou durante o período (dado não apresentado), tanto do grupo tratado quanto do grupo controle. Assim também os marcadores hepáticos (AST e ALT), renal (ureia) não mostraram diferença entre os grupos tratados e controle, o que demonstra que a dose de *C. pachystachya* utilizada foi segura durante o período e corrobora com os dados da literatura. O marcador de lesão muscular também não apresentou diferença entre os grupos tratados e controle, indicando provável ausência de lesão (figura 6).

Quando observados os dados das contagens de hemácias, verificou-se uma diminuição do número de hemácias no oitavo dia de tratamento, sendo que esse número retoma o número inicial após a finalização do tratamento. Neste quesito, o

grupo tratado com o extrato mostrou diferença entre o número de hemácias no oitavo dia e no último dia avaliado (décimo quarto) (figura 6a). Já com relação aos leucócitos sanguíneos, é possível observar que em ambos os grupos houve redução do número dos leucócitos sanguíneos, no entanto, essa redução foi significativa no grupo tratado com o extrato, evidenciando uma ação anti-inflamatória do mesmo (figura 6b). Em relação ao gráfico 6d, da produção de nitrito, não houve diferenças significativas entre os grupos.

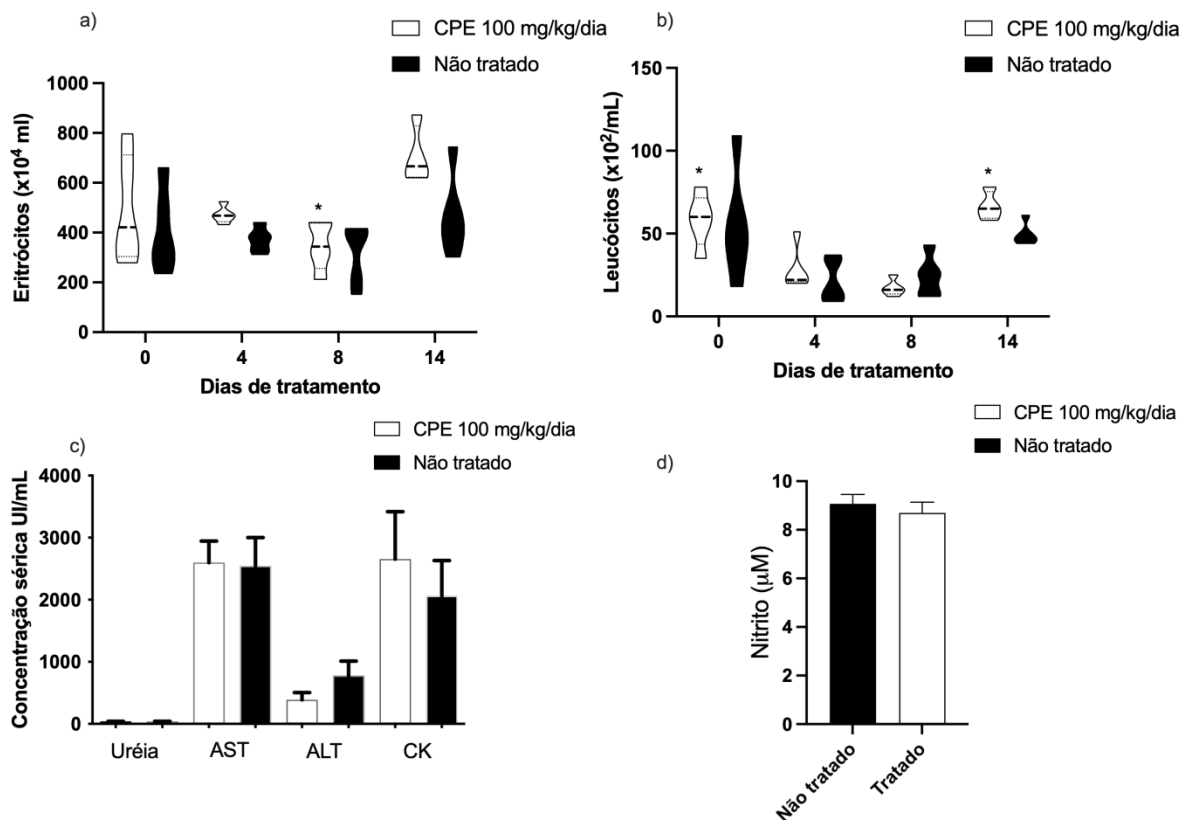


Figura 6 Eritrócitos sanguíneos (a), leucócitos sanguíneos (b), metabólitos séricos (Uréia, AST, ALT e CK), e (d) NO de macrófagos peritoneais de camundongos não infectados e tratados com extrato (brancos) e não infectados e não tratados (pretos) com extrato supercrítico de folhas de *C. pachystachya*. O tratamento dos camundongos consistiu em receberem o extrato das folhas de *C. pachystachya* (100 mg/kg) por dez dias. O grupo não tratado recebeu solução aquosa com DMSO na mesma concentração do extrato. O dia 0 (zero) é um dia antes do início do tratamento. Os dados representam cinco animais por grupo  $\pm$  SEM. Após 10 dias de tratamento, os camundongos de ambos os grupos não receberam gavagem por 4 dias. Os dados do 14º dia foram coletados quatro dias após o término dos 10 dias de tratamento. Os metabólitos séricos e a dosagem de NO foram obtidos no 14º dia, após a eutanásia dos animais. (a)\*Significativamente diferente do mesmo grupo no 14º dia, \* $p < 0,05$ . (b)\*Significativamente diferente do mesmo grupo no 8º dia, \* $p < 0,05$ .

No estudo de FERREIRA et al., 2010, os autores avaliaram também os parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar machos, tratados com o composto de ácido ursólico, e demonstraram que não houve alterações nesses parâmetros, confirmando

a ideia de que esses triterpenos são seguros e não apresentam toxicidade aos animais, assim como os dados de nosso estudo.

#### 4.3 Avaliação da ação do extrato supercrítico de *C. pachystachya* sobre a Doença de Chagas experimental aguda em animais suscetíveis BALB/c

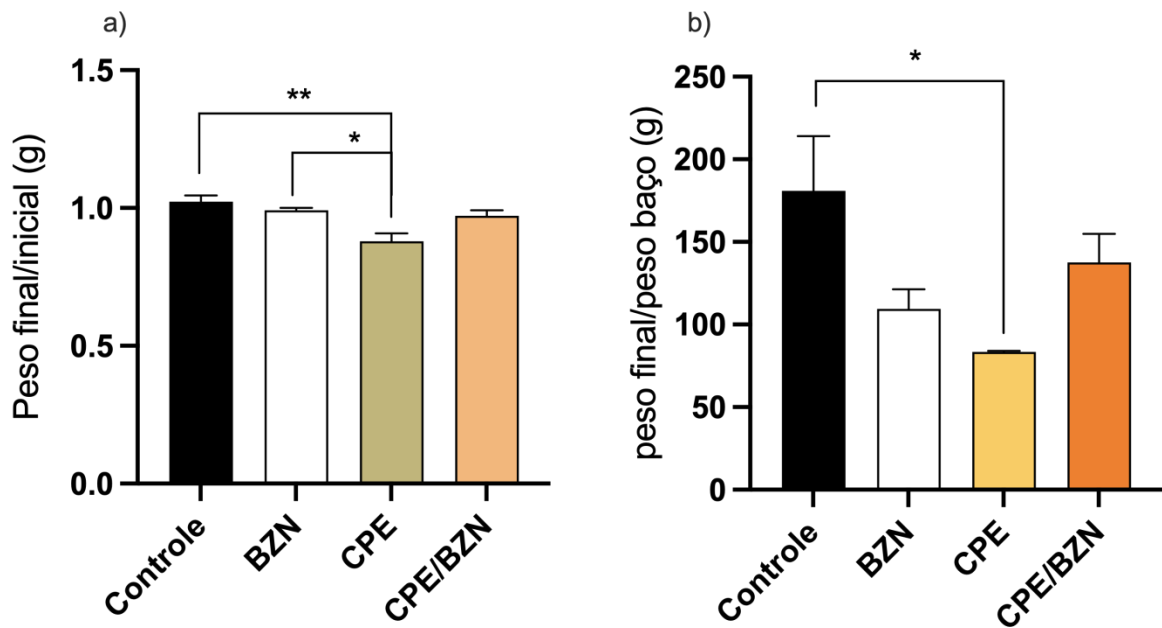


Figura 7 (a) Relação peso corporal final/inicial de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . (b) Relação peso corporal final/peso do baço final de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Com a finalidade de avaliar se houve variação de peso (7a) durante o período da infecção em cada grupo, notou-se que o grupo infectado e tratado com o extrato teve a maior variação dentre todos, sendo o que mais perdeu peso.

Ao analisar a variação do tamanho do baço entre os grupos, percebe-se que a maior variação durante o curso da infecção, ocorre no grupo tratado apenas com o extrato da *Cecropia*, mostrando que possivelmente devido ao efeito anti-inflamatório do extrato, este impediu um aumento significativo do baço. Já os grupos tratados com BZN (com e sem o extrato) mostraram uma diminuição do baço (sem diferença significativa) devido ao controle da infecção pelo medicamento.

A esplenomegalia é um achado comum na DC, e ocorre devido a um conjunto de fatores que englobam a migração de células inatas para o baço, auxiliando na produção de citocinas inflamatórias e apresentação de antígenos, o que gera



ativação de células imunes adaptativas, como consequente expansão clonal de linfócitos B e T (DE MEIS et al., 2009; GAO et al., 2001). Autópsia de pacientes com a DC crônica revelou aumento de tamanho e peso do baço, associado a extensas áreas de folículos linfóides (PEREIRA et al., 2002).

Nesse experimento, buscamos entender como o extrato da embaúba se comporta *in vivo*, em linhagens BALB/c suscetíveis, infectados com o *T. cruzi*, com diferentes tipos de tratamentos (controle, tratados com benzonidazol, tratados apenas com o extrato e tratados com o benzonidazol e extrato juntamente) para que posteriormente pudéssemos comparar com linhagens de animais resistentes.

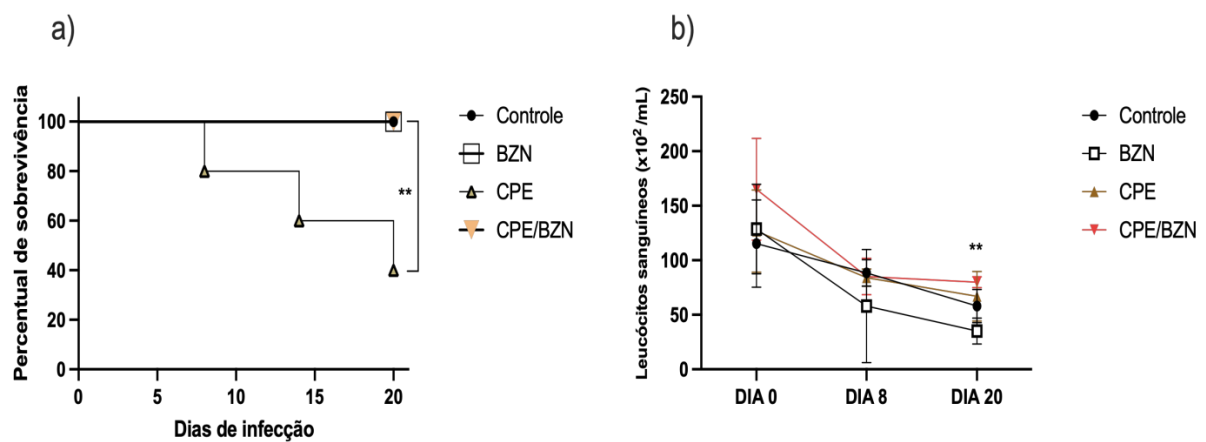


Figura 8 a) Percentual de sobrevivência de animais BALB/c infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN) após 20 dias de acompanhamento. \*\*p<0,01. b) Leucócitos sanguíneos de animais BALB/c infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \*\*p<0,01 – significativamente diferente entre o dia 20 e 0 para controle, BZN e CPE/BZN.

Com o propósito de avaliar se durante a vigência da infecção, houve diferença na sobrevivência entre os grupos, analisamos a figura 8a notando que o grupo 3 (tratado com o extrato de *Cecropia*), a partir do dia 7, apresentou 20% de morte, e ao final a porcentagem de sobrevivência foi de apenas de 40%. Já nos outros grupos (controle, BZN e BZN/CPE), todos os animais sobreviveram até o final do experimento. O gráfico de sobrevivência dos animais tratados com o extrato, mas sem estarem infectados, não acarretou nenhuma morte (dado não mostrado). Em nosso experimento, não verificamos os mesmos achados da literatura, possivelmente explicado pela quantidade utilizada de formas tripomastigotas na infecção e da linhagem de camundongos BALB/c. Na literatura, estudo de CUNHA et al., 2006 *in vivo* demonstrou que camundongos Swiss albinos infectados e tratados com um composto contendo ácido ursólico, tiveram seu tempo de sobrevivência

aumentado em relação aos não tratados. FERREIRA et al., 2010 também teve os mesmos achados, *in vivo*, com camundongos BALB/c albinos infectados e tratados com composto de ácido ursólico.

Em relação aos leucócitos sanguíneos (Figura 8b), o único grupo que não diminuiu significativamente a quantidade de leucócitos, foi o grupo tratado apenas com o CPE. Já os outros grupos, todos tiveram redução significativa de leucócitos ao longo dos dias.

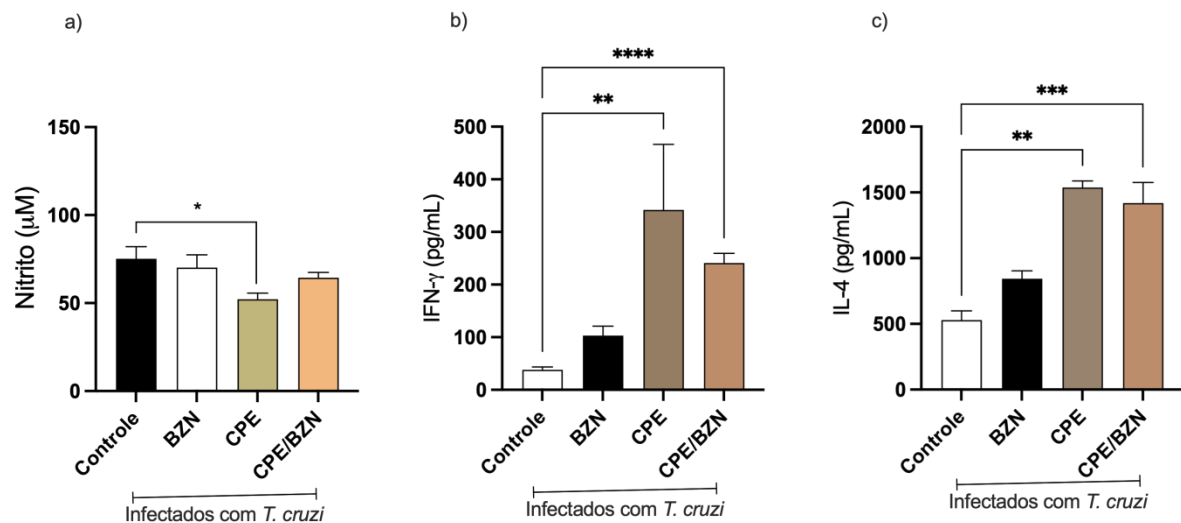


Figura 9 Dosagem NO (a), IFN-gama (b) e IL-4 (c) do sobrenadante de células esplênicas totais retiradas de animais BALB/cinfectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em relação à produção de óxido nítrico pelos esplenócitos retirados dos animais infectados e tratados, é possível constatar na figura 9a uma diferença significativa entre o grupo controle (sem tratamento) e o grupo tratado apenas com a *C. pachystachya*, sendo que este grupo produziu menos nitrito. Isso pode ser devido ao efeito imunomodulador que o extrato exerce sobre o baço, o que interfere na resposta imune ao combate ao parasita e fez com que nesse grupo a taxa de sobrevivência fosse menor.

Já ao analisarmos a produção de citocinas pelas células esplênicas totais, podemos inferir em relação a figura 9b, no grupo 2, que o benzonidazol tem como efeito reduzir a carga parasitária no paciente, então é esperado que, à medida que o medicamento seja eficaz na redução do parasita, haja uma diminuição da estimulação do sistema imunológico na produção de IFN-gama, e essa citocina reduza ao longo do tratamento.

Diferente de nossos resultados na dosagem de IFN- $\gamma$ , trabalhos anteriores demonstram que o tratamento com triterpenoides suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , que é associada a resistência do hospedeiro na fase aguda (NATARAJU et al. 2009, MARTÍN et al. 2010). Outro estudo de AHMAD et al., 2006, os autores relatam a capacidade imunomodulatória do ácido ursólico sobre a exacerbada resposta Th1, e demonstram diminuição significativa de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  proporcional ao aumento das doses de ácido ursólico administradas por via oral. Quando analisamos linhagens de camundongos BALB/c, não obtivemos esses mesmos resultados.

Na evolução para a fase crônica da DC, há predomínio da resposta Th2, onde linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzem IL-10 e IL-4, que irão modular a função inflamatória dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> envolvidos na resposta Th1, e também ativar linfócitos B para produção de anticorpos (JUNQUEIRA et al., 2010).

Possivelmente, devido ao aumento da concentração de IL-4 pelo extrato, conseqüentemente a produção de óxido nítrico também foi diminuída, e esse grupo apresentou um percentual de sobrevivência menor.

Ao observar a figura 9c, o grupo tratado com o extrato poderia resultar em uma resposta anti-inflamatória mais forte, que pode incluir o aumento de citocinas do tipo Th2, como IL-4. Esse efeito conseguiu ser mantido na associação com o benzonidazol, no grupo 4.

Já no caso do grupo 2, o tratamento com Benzonidazol, alterou indiretamente a concentração de IL-4 e outras citocinas avaliadas, provavelmente devido à sua ação antiparasitária.

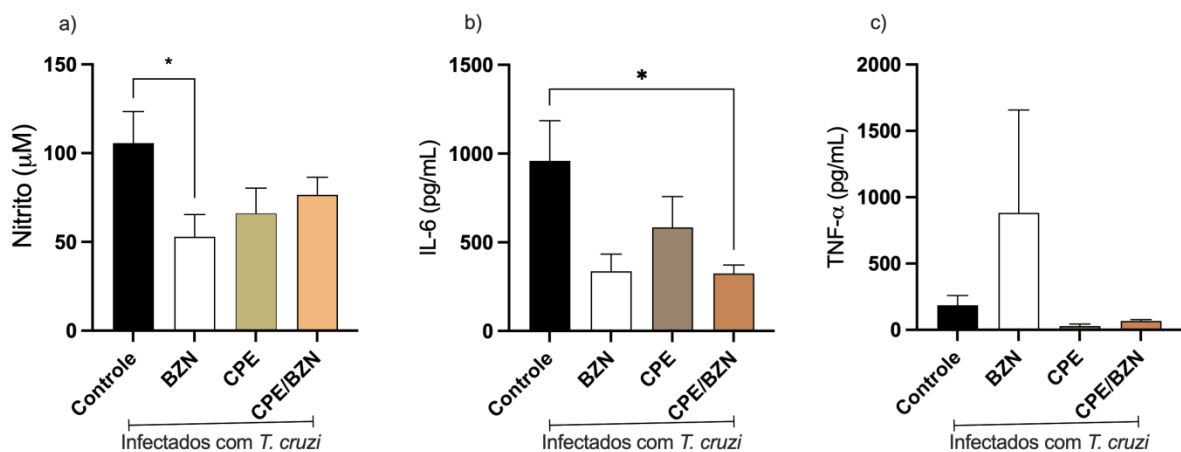


Figura 10 Dosagem de NO (a), IL-6 (b) e TNF-alfa (c) do sobrenadante de macrófagos peritoneais retirados de animais BALB/c infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Ao final dos 20 dias do experimento, após a eutanásia dos animais, houve a retirada dos macrófagos peritoneais de todos os grupos e dosagem de NO, IL-6 e TNF-alfa do sobrenadante do cultivo dessas células. A figura 10a mostra a dosagem de NO e indica que houve apenas diferenças estatísticas em relação ao grupo tratado com benzonidazol para o grupo controle, pois à medida que a infecção é controlada e a carga parasitária diminui, é esperado que a produção de óxido nítrico (NO) pelo sistema imunológico também diminua.

Em seu trabalho, PASCUTTI e colaboradores, 2004, relataram que o benzonidazol regulou negativamente a produção de citocinas e de óxido nítrico em macrófagos murinos, apresentando uma atividade imunomodulatória do medicamento.

Em relação ao gráfico 10b, a exposição à *Cecropia pachystachya* possivelmente modulou a resposta inflamatória, e influenciou na redução da produção de IL-6. Essa diminuição ocorreu também no grupo tratado com o extrato e com o benzonidazol. IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e é normalmente expressa após a infecção celular (ANDRADE et al., 1999). Como já relatado anteriormente, já foi atribuído ao ácido ursólico a capacidade em inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (HUANG et al., 2009).

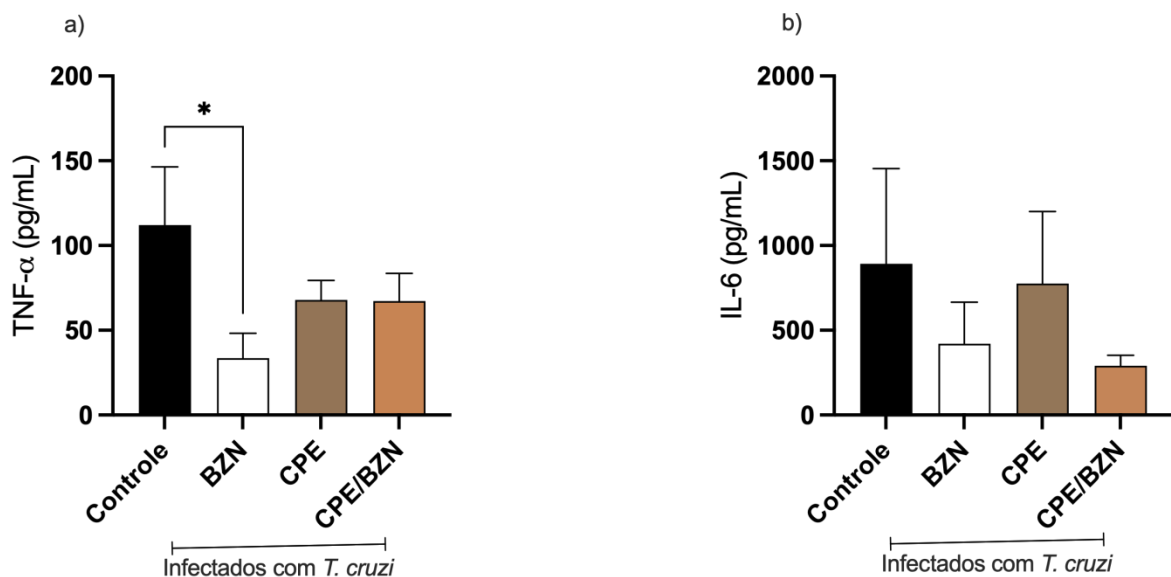


Figura 11 Concentrações de TNF-alfa (a) e IL-6 (b) do soro de animais BALB/c infectados com *T. cruzi* tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

A análise das concentrações séricas de TNF-alfa na figura 11a evidenciou diferença estatística do soro, coletado no último dia do experimento (dia 20), dos animais BALB/c, no grupo tratado com benznidazol, possivelmente estando diminuído devido ação do benznidazol em diminuir a carga parasitária, fazendo com que citocinas pró-inflamatórias como a TNF-alfa diminuam neste grupo.

PASCUTTI et al., 2004 demonstraram o efeito imunomodulador do benznidazol, com capacidade de aumentar a sobrevivência e diminuir os níveis séricos de IL-6 e TNF- $\alpha$  em camundongos C57BL/6. Em nosso experimento com linhagem BALB/c observamos a dosagem de TNF- $\alpha$  diminuída no grupo tratado com benznidazol, mas esse mesmo dado não foi observado em relação a IL-6, que não apresentou diferenças significativas.

No entanto, as concentrações séricas da citocina IL-6 na figura 11b não apresentou diferenças significativas, porém, sua dosagem nos macrófagos peritoneais (figura 10b) e no soro (figura 11b) se relacionam como marcadores inflamatórios sistêmicos.

#### 4.4 Avaliação da ação do extrato supercrítico de *C. pachystachya* sobre a Doença de Chagas experimental aguda em animais resistentes C57Bl/6

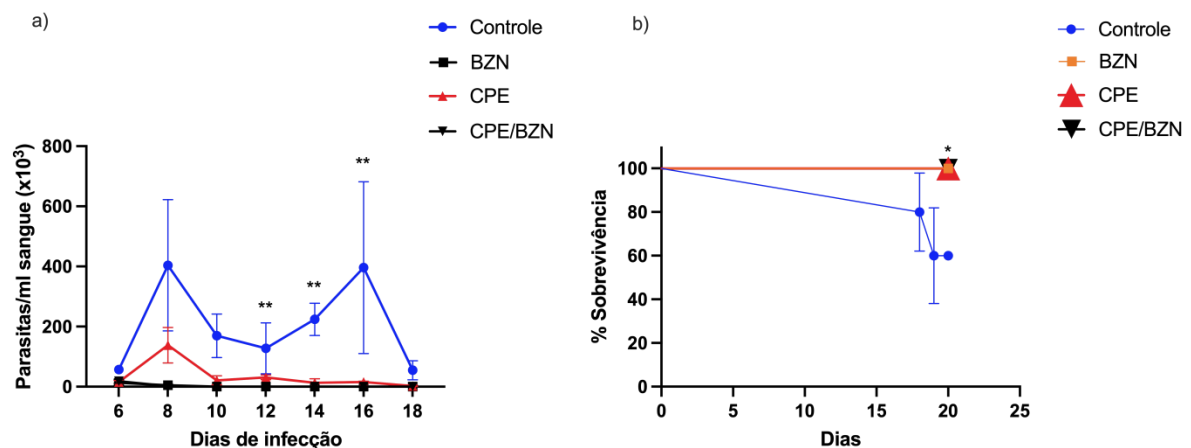


Figura 12 a) Tripomastigotas sanguíneos contados entre o sexto e o décimo oitavo dia de infecção de animais C57Bl/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). b) Percentual de sobrevivência de animais infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN) após 20 dias de acompanhamento. \* $p < 0,05$ .

Em experimentos anteriores em nosso laboratório, que analisaram a parasitemia, publicados por DAGA et al. (2023), com camundongos BALB/c, os resultados demonstraram que os animais infectados e tratados com o extrato de *Cecropia* apresentaram maior nível de parasitas durante todo o período de contagem e, no 10º dia da infecção, com diferença significativa para o grupo não-tratado. Pensando nisso, esse experimento foi realizado com o intuito de verificar como o extrato de *Cecropia* se comporta *in vivo* em animais de linhagem resistentes (C57Bl/6) infectados com o parasita *T. cruzi*. Pode-se notar na figura do gráfico de sobrevivência 12a, que o extrato sozinho foi capaz de diminuir a parasitemia nesses animais, ao contrário dos experimentos realizados anteriormente nos animais suscetíveis (BALB/c).

Já quando analisamos a sobrevivência desses grupos, na figura 12b, apenas o grupo controle, que não foi tratado, teve morte dos animais, tendo este uma taxa de sobrevivência de 60%. O grupo tratado com o extrato apresentou a mesma sobrevivência que o tratado com o benzonidazol. Quando comparado ao gráfico de sobrevivência dos camundongos do tipo BALB/c tratados com CPE, os quais tiveram 40% de sobrevivência, observamos que os animais C57Bl/6 tratados com CPE apresentaram 100%, mostrando que o extrato propiciou um balanço imunológico mais adequado, conseguindo matar o parasita sem causar um processo imunopatológico, que é o causador das mortes dos animais C57BL/6 não-tratados.

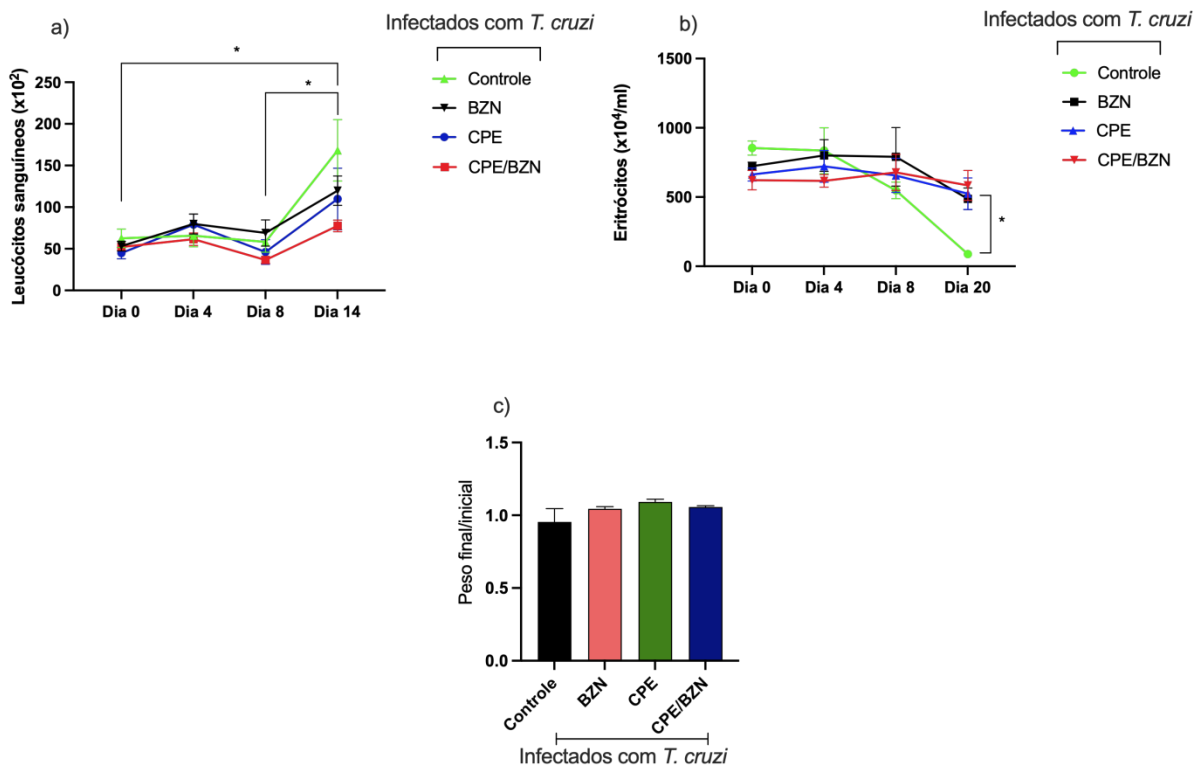


Figura 13 Leucócitos (a) e hemácias (b) sanguíneos de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). (c) índice da variação de peso final/inicial de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). 13a: \* $p < 0,05$  – significativamente diferente entre o dia 14 e 0 para controle, BZN e CPE e significativamente diferente entre o dia 8 e 0 para controle e CPE. 13b: \* $p < 0,05$  -significativamente diferente no vigésimo dia entre controle e BZN e controle e CPE/BZN.

Com a finalidade de entender como se comportam os parâmetros sanguíneos desses animais resistentes, foram feitas análises de leucócitos e hemácias, também uma análise da variação do peso de cada grupo. A figura 13a dos leucócitos demonstra uma leucocitose muito maior do grupo controle (não tratado), gerando um pico no dia 14, podendo inferir que devido à resistência maior dessa linhagem de camundongos, seu mecanismo de defesa é exacerbado e promove uma inflamação exagerada, levando a um processo de aumento dos leucócitos.

No ano de 2000 MARCONDES et al. observaram em uma infecção experimental aguda, uma influência sistêmica na infecção do *T. cruzi*, relatando hipoplasia da medula óssea com alterações como anemia. Contudo, os mecanismos responsáveis por estas alterações hematológicas ainda não são bem elucidados. Além de corroborar com este estudo, MALVEZI et al. 2004, demonstraram inclusive que em camundongos resistentes, a anemia seria mais grave, com uma redução também de hemoglobina e hematócrito. Ao analisarmos a figura 13b, em relação a quantidade de hemácias, houve redução significativa no grupo sem tratamento, provando a anemia que a Doença de Chagas provoca nesse grupo não tratado. Em estudos de transmissão vertical com ratos Wistar, ocorreram alterações hematológicas durante a fase aguda da DC. Dentre essas alterações destacam-se anemia, leucocitose pronunciada, linfopenia, neutrofilia, trombocitopenia e hipoglicemia (MORENO et al., 2007), assim como em nossos achados hematológicos.

Na figura 13c, não houve diferença significativa na variação de peso entre os grupos durante os 20 dias de experimento, mesmo após o décimo quarto dia quando o tratamento já havia sido finalizado.

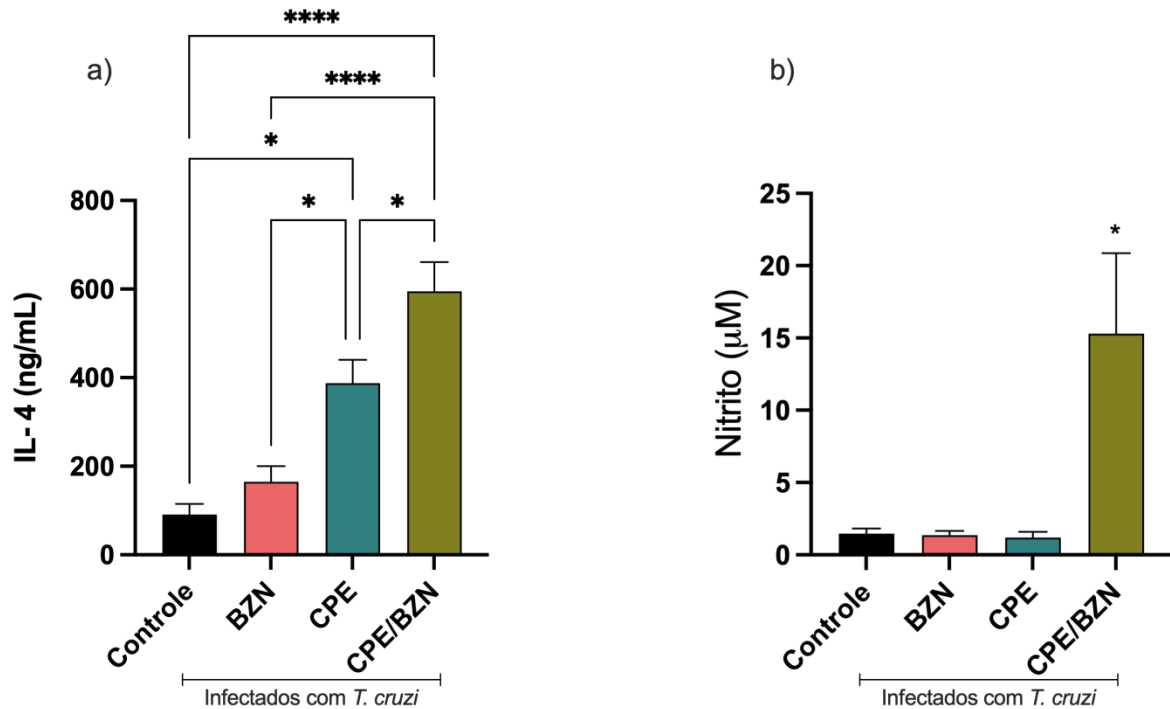


Figura 14 Dosagem de IL-4 (a) e NO (b) do sobrenadante de células esplênicas totais retiradas de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \*p<0,05 e \*\*\*\*p<0,0001.

É sabido que a IL-4 tem capacidade de regular a inflamação e está envolvida na resposta a infecções parasitárias causadas por helmintos, assim como nas alergias mediadas por IgE. A citocina IL-4 teve sua produção semelhante quando comparamos os animais suscetíveis aos resistentes. Na análise da figura 14a, tem-se um aumento significativo dessa citocina nos grupos 3 e 4, que possuem o extrato no tratamento, confirmando o efeito anti-inflamatório da embaúba.

BRYAN et al., 2010 demonstraram que animais BALB/c infectados pela cepa Y de *T. cruzi* foram susceptíveis à infecção, pois apresentaram grande ativação policlonal de linfócitos B e baixa resposta imune humoral específica antes de duas semanas de infecção. Todavia, animais C57Bl/6 desenvolveram resposta imune humoral específica após duas semanas de infecção, com baixa ativação policlonal, decorrendo em resistência à infecção por *T. cruzi* (BRYAN et al., 2010). Além disso, a resistência à infecção por *T. cruzi* tem sido associada à produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-12, as quais ativam a produção de NO pelos macrófagos a fim de eliminar o parasita (ALIBERTI et al., 1996; TALVANI et al., 2000).

Em contrapartida, citocinas como IL-4 e TGF- $\beta$  estão associadas à susceptibilidade ao parasita (RODRIGUES et al., 2000; HIYAMA et al., 2001). Em



infecção por *Leishmania major*, animais BALB/c apresentaram perfil Th2 de citocinas, com liberação de citocinas IL-4 e IL-10, em contrapartida, animais C57BL/6 apresentaram liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-12, resultando em um bom prognóstico (HEINZEL et al., 1989). A figura 14a demonstra baixa dosagem de IL-4 nesses animais resistentes, no grupo não tratado, corroborando com a literatura, já que IL-4 está associada à susceptibilidade ao parasita.

Em relação à produção de óxido nítrico pelas células esplênicas totais retirados dos animais infectados e tratados, percebe-se que apenas o grupo tratado com extrato associado ao BZN, produziu mais nitrito, no entanto a avaliação deste resultado é limitada pela ausência da dosagem de IFN- $\gamma$  deste perfil celular.

Ao analisarmos a produção de nitrito na figura 14a, o grupo tratado com BZN teve a menor produção, enquanto o grupo da associação do BZN com o extrato teve a maior, nesse caso, possivelmente o extrato da embaúba interferiu no aumento da produção de NO.

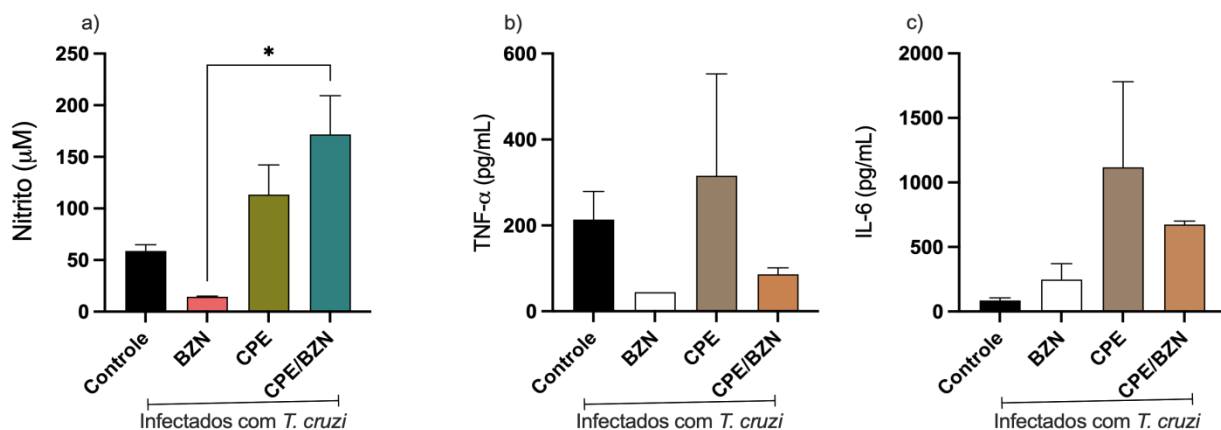


Figura 15 Dosagem de NO (a), TNF-alfa (b) e IL-6 (c) do sobrenadante de macrófagos peritoneais retirados de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Ao avaliar as concentrações da citocina pró-inflamatória IL-6 dosada na figura 15c, pode-se inferir que o extrato de *C. pachystachya* não foi capaz diminuir sua produção em relação ao grupo controle (não-tratado), que apresentou a menor concentração de IL-6. HUANG e colaboradores 2009 atribuíram ao ácido ursólico presente no *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) a capacidade de inibir a liberação

de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$  por células mononucleares de sangue periférico. Ainda, segundo GONZALEZ-CHAVES et al., 2017, o ácido ursólico presente em *Salviacon nivens* possui efeito anti-inflamatório atribuído a capacidade de reduzir os níveis de IL-6, TNF e IL-1 $\beta$  e aumentar a produção de IL-10 em macrófagos murinos estimulados com LPS, em estudo *in vitro*. Nosso experimento com BALB/c vai ao encontro desses achados, já em relação aos camundongos C57Bl/6, a *Cecropia* não foi capaz de diminuir a concentração de IL-6.

SILVA et al., 1996 demonstraram que o tratamento de camundongos C57Bl/6 com inibidores de iNOS resulta em uma maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*. A infecção por *T. cruzi* em camundongos C57Bl/6 deficientes de iNOS demonstrou que esses animais poderiam compensar a ausência de produção de NO através do aumento qualitativo e quantitativo de outras citocinas importantes no controle imune da infecção, como TNF- $\alpha$  e IL-1. Esse dado mostra que a produção de NO é importante, mas não é essencial para o controle da infecção (CUMMINGS et al., 2004).

#### **4.5 Análise histológica do coração**

A análise do tecido cardíaco dos animais infectados foi capaz de mostrar uma maior quantidade de infiltrado celular no grupo não-tratado, seguido do grupo tratado com somente CPE, com BZN/CPE e com a menor quantidade aqueles tratados somente com BZN. No entanto, a análise estatística mostra que houve diferença entre o grupo tratado com BZN e àqueles tratados com CPE ou não tratados, enquanto não houve diferença para o grupo BZN/CPE (Figura 16). O grupo BZN/CPE também conseguiu diferença estatística para o grupo não tratado. Esses números refletem a parasitemia observada nos diferentes grupos (Figura 12a), com uma maior invasão do tecido cardíaco dos grupos com maior número de parasitas

sanguíneos.

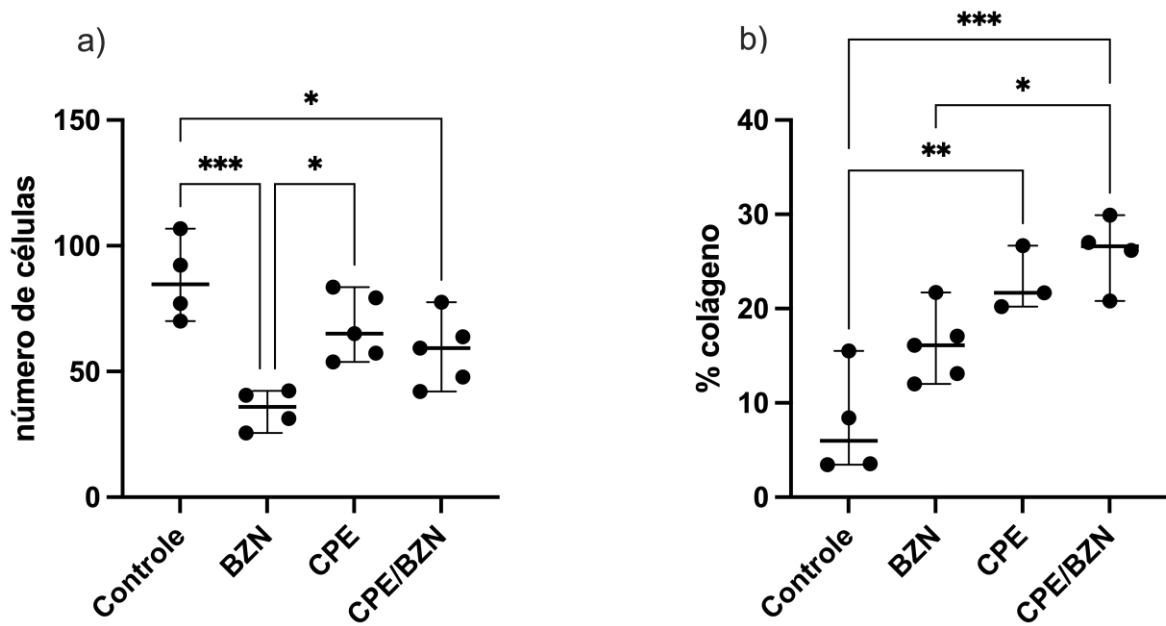


Figura 16 a) Número de células no tecido cardíaco de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). b) Quantidade de colágeno no tecido cardíaco de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

A figura 16 traz imagens representativas das diferentes quantidades de células contadas nos tecidos cardíacos dos grupos. Uma análise qualitativa também mostra que existe um edema maior no grupo não-tratado em relação aos demais, demonstradas pelas áreas sem coloração no interior do tecido.

Com relação à quantidade de colágeno, o grupo não-tratado demonstrou menor quantidade que todos os demais grupos, com diferença significativa para os grupos tratados com CPE (sozinho ou com BZN). Essa maior quantidade pode ser reflexo da atividade anti-inflamatória do extrato, já mencionada anteriormente. A figura 17 traz imagens dos tecidos cardíacos corados com Tricrômico de Masson dos animais C57BL/6 infectados e tratados.

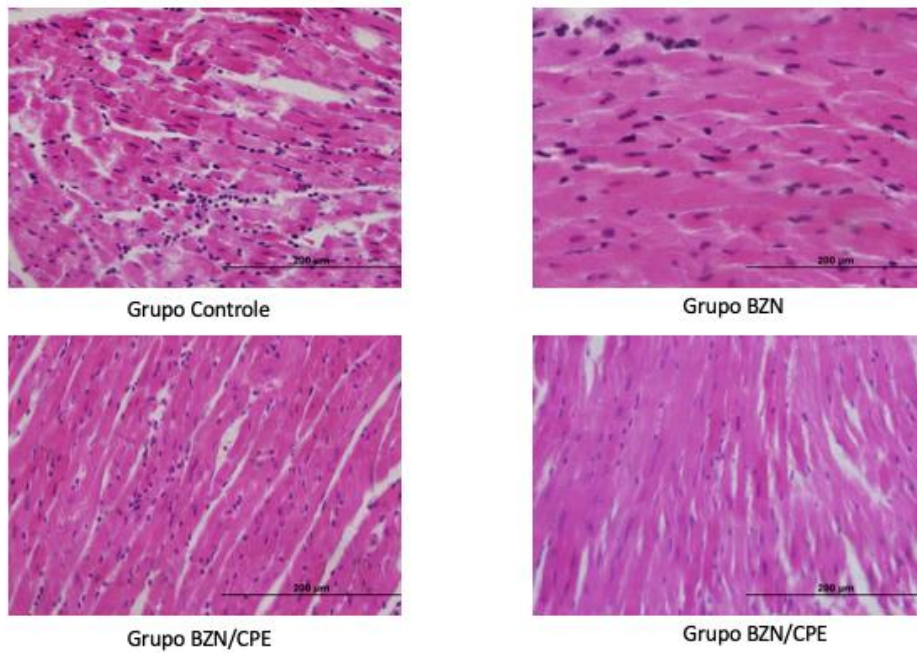


Figura 17 Tecidos cardíacos corados por H&E de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). As imagens são representativas de cada grupo. Aumento de 400x.

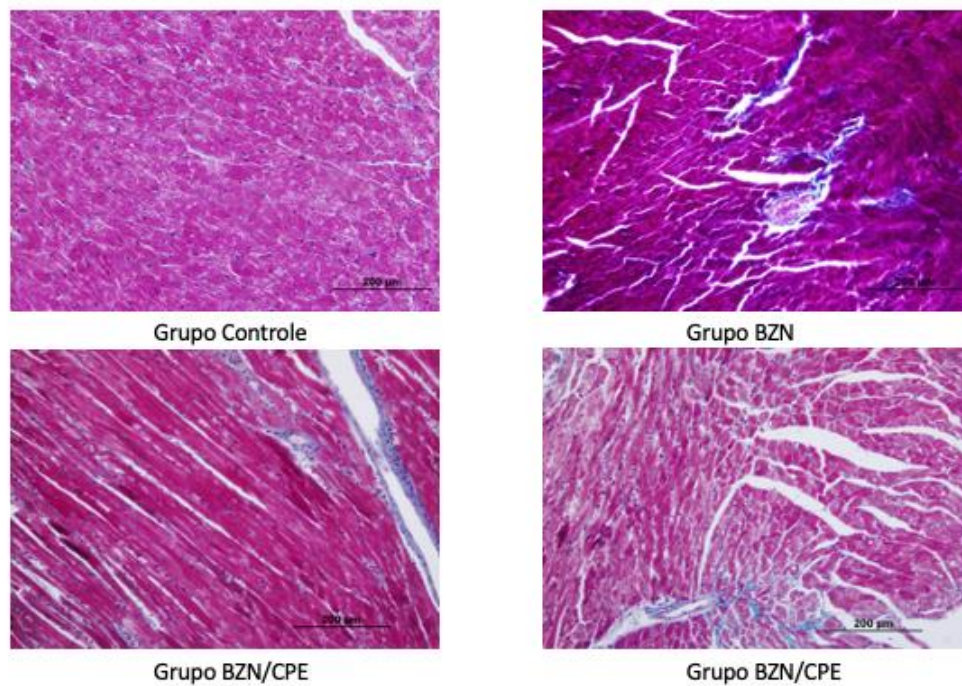


Figura 18 Tecidos cardíacos corados por Tricrômico de Masson de animais C57BL/6 infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato supercrítico de *C. pachystachya* (CPE), Benznidazol (BZN) ou ambos (CPE/BZN). As imagens são representativas de cada grupo. Aumento de 200x.

## 5 CONCLUSÕES

O experimento *in vitro* confirmou a ação anti-inflamatória do ácido ursólico presente no extrato da *Cecropia*, devido a capacidade do extrato de embaúba em inibir a produção de NO na concentração de 300 ug/mL.

Já nos experimentos *in vivo* em animais resistentes C57Bl/6, o extrato sozinho foi capaz de diminuir a parasitemia nesses animais. Em relação a sobrevivência, o extrato foi capaz de proporcionar um balanço imunológico mais adequado nos camundongos C57Bl/6, conseguindo matar o parasita sem causar um processo imunopatológico, possivelmente devido a presença do ácido ursólico em sua composição.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired immunity infection. **Exp Parasitol** 84: 231-44. 1996.
- ACEVEDO, G. R., GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. **Frontiers in Immunology**, Laussane, v. 9, n. 1929, Aug. 2018.
- AHMAD, S. F. et al. Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacol Res.** 2006 Mar;53(3):233-40.
- ALBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun** 64: 1961-7. 1996.
- ALVES, R. L. et al. Physical training improves exercise tolerance, cardiac function and promotes changes in neurotrophins levels in chagasic mice. **Life Sciences**, v. 232, n. April, p. 116629, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116629>>.
- AMATO, V. N. O.; PASTERNAK, J. Centenário da Doença de Chagas. *Ver Saude Publica.* 43(2):381-2. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102009000200022> PMid:19287879>.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999.
- ARAGÃO, D. M. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010.
- BALIZA, M. D.; TOZETTO, S.; OLIVEIRA, F. S.; SOTOLANI, B. L. Impactos genéticos entre gerações das Doenças de Chagas: A sustentabilidade das populações rurais. **REVISE – Revista Integrativa em Inovações Tecnológicas nas Ciências da Saúde**, 3(00), 35 – 37. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.46635/revise.v3i00.1669>>.
- BASTIANETTO, S.; ZHENG, W. H.; QUIRION, R. The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**. n. 74, v. 6, p. 228-77, 2000.
- BRENER Z, et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. (2000) 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 431p. 2000.
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS. Specific humoral immunity versus polyclonal b cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis.** 4, 7, 733-739, 2010.

- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benzimidazole. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 44(1):29-37. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000100006> PMid:11896410>.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G.; SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, 64(1): 128-34, 1996.
- CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, :e9721, Mar. 2010.
- COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.
- CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun**. 72(7):4081-9, 2004.
- CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* Trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Med**. 69:470 – 72. 2003.
- CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; et al. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Fitoter Res**.20:474 – 78. 2006.
- DAGA, M. A.; et al. Ursolic acid-rich extract presents trypanocidal action in vitro but worsens mice under experimental acute Chagas disease. **Parasite Immunol**. e13005. 2023.
- DAGA, M. A.; AYALA, T. S.; MENOLLI, R. A. A review of the anti-inflammatory and antimicrobial activities of the components of the *Cecropia* genus. **Asian J PharmClin Res**. 13(8): 13-20, 2020.
- DA SILVA, A. P. DA, ANDRADE JÚNIOR, F. P. DE, & DANTAS, B. B. Doença de Chagas: Perfil de morbidade hospitalar na Região do Nordeste Brasileiro. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, 17 (3), 08 – 17. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.17695/revcsnevol17n3p8-17>>.
- DE MEIS, J. et al. Differential regional immune response in Chagas Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**. July, 2009. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000417>>.
- DE SOUZA, A. P.; et al. Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. **Parasitol Res**, 92(6): 496-501, 2004.
- DIAS, J. C. P.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; RODRIGUES COURA, J.; et al. II Consenso Brasileiro em Doença

de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25 (21), 1 – 10. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>>.

FANG, L.; et al. Design and synthesis of furoxan-based nitric oxide-releasing glucocorticoid derivatives with potent anti-inflammatory activity and improved safety. **Bioorg Med Chem Lett**. Feb 15;17(4):1062-6. 2007.

FERREIRA, V.; MOLINA, M. C.; VALCK, C.; ROJAS, Á.; AGUILAR, L.; RAMÍ REZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. **Molecular Immunology**, 40(17), 1279–1291. 2004 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.11.018>.

FERREIRA, D. D. F.; et al. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, vol. 106, no. 4, pp. 985–989, 2010.

FERREIRA, R. T. B.; BRANQUINHO, M. R.; CARDARELLI-LEITE, P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: Um desafio para a Vigilância Sanitária. *Vigilância Sanitária em Debate*, 2 (4), 358/160. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3395/vd.v2i4.358>>.

FERREIRA, B. L.; FERREIRA, É. R.; DE BRITO, M. V.; SALU, B. R.; OLIVA, M. L. V.; MORTARA, R. A.; ORIKAZA, C. M. BALB/c and C57BL/6 Mice cytokine responses to *Trypanosoma cruzi* infection are independent of parasite strain infectivity. **Front Microbiol**. 2018 Mar 26;9:553. doi: 10.3389/fmicb.2018.00553.

FISCHER, E.; OUAISSI, M. A.; VELGE, P.; CORNETTE, J.; KAZATCHKINE, M. D. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology**, 65(2), 299–303. 1988. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2973433>.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. **Eur J Immunol**. 2001 May;31(5):1503-12.

GIRARD, C. M.; et al. Evaluation of the immune response against *Trypanosoma cruzi* cytosolic trypanothione peroxidase in human natural infection. **Immunology**. 155: 367- 378, 2018.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas disease. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 296, p. 89–123, 2005.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M. et al. Anti-inflammatory activity of standardized dichloromethane extract of *Salvia connivens* on macrophages stimulated by LPS. **Pharm Biol**. 2017 Dec;55(1):1467-1472. Doi: 10.1080/13880209.2017.1305423.

HEINZEL, F. P.; et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**. 1989 Jan 1;169(1):59-72.



HIKAWCZUK, V. J. et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales des la Asociacion Quimica Argentina**, v. 86, n. 3, p. 167–170, 1998.

HÖLSCHER, C.; KÖHLER, G.; MÜLLER, U.; MOSSMAN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun** 66:1208-15. 1998.

hoscheid, j. et al. extraction of *cecropia pachystachya* leaves by supercritical carbon dioxide: kinetics, phytochemical characterization, antibacterial and antioxidant activities. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 4, p. 570, 19 out. 2020.

HOTEZ, P. J.,; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: An overview and a report card. **Microbes and Infection**, 16(8), 601–606. 2014. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.006>.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Res Parasitol**. Abril de 2001;87(4):269-74. Doi: 10.1007/pl00008577.

HUANG, Y. et al. Effects of cranberry extracts and ursolic acid derivatives on P-fimbriated *Escherichia coli*, COX-2 activity, pro-inflammatory cytokine release and the NF-kappabeta transcriptional response in vitro. **Pharm Biol**. 2009;47(1):18-25. Doi: 10.1080/13880200802397996.

INAL, J. M.; HUI, K.-M.; MIOT, S.; LANGE, S.; RAMIREZ, M. I.; SCHNEIDER, B.; KRUEGER, G.; SCHIFFERLI, J.-A. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: a novel human complement inhibitory receptor. **The Journal of Immunology**, 174(1), 356– 366. 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.356>.

JOKIRANTA, T. S.; JOKIPII, L.; MERI, S. Complement resistance of parasites. **Scandinavian Journal of Immunology**, 42(1), 9–20. 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1995.tb03620.x>.

JUNQUEIRA C., et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**. Sep 15;12:e29 - 2010.

KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sci.**, 146, 201-213. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017>>.

KIM, H. P. et al. Critical review anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229 - 245, 2004.

KIM, M. H.; KIM, J. N.; HAN, S.N.; KIM, H. K. Ursolic acid isolated from guava leaves inhibits inflammatory mediators and reactive oxygen species in LPS-stimulated macrophages. **Immunot**, 37(3), 228-235. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2015.1021355>>.

KLAUNIG, J. E. et al. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86–99, 2011.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 128, p. 2009, 1982.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 47–52, 2001.

LAMBRIS, J.; HOLERS, V. Therapeutic Interventions in the Complement System (J. D. Lambris & V. M. Holers. (eds.); **Humana Pre**). 2000. <https://doi.org/https://doi.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-1-59259-017-9>.

LEE, S. C. et al. Bioflavonoids commonly and potently induce tyrosine dephosphorylation/inactivation of oncogenic proline-directed protein kinase FA in human prostate carcinoma cells. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 2, p. 1117-1121, 1998.

LIDANI, K. C. F. et al. The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 8, p. 607, Apr. 2017.

LIU J. Pharmacology of the oleanolic and ursolic acids. **J. Ethnopharmacol.** 49:57 – 68. 1995.

MALVEZI, A. P. et al. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Volume 41, Edição 1, maio de 2004, páginas 69–77. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.01.005>>.

MARCONDES, M. C. G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes and infection** 2: 347- 352. 2000.

MARIA, D.; PINHEIRO, L.; AZEVEDO, C. S. major article influence of environmental enrichment on the behavior and physiology of mice infected by *Trypanosoma cruzi*. v. 50, n. 3, p. 341–349, 2017.

MARTÍN, R.; CARVALHO-TAVARES, J.; HERNÁNDEZ, M.; ARNÉS, M.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; NIETO, M. L. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: a potential therapeutic role. **Biochem. Pharmacol.** 79, 198– 208. 2010.

MARTINS-MELO, F. R.; CARNEIRO, M.; RAMOS, Jr A. N.; HEUKELBACH, J.; RIBEIRO, A. L. P.; WERNECK, G. L. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl Trop Dis.** 12(6):1-24. 2018. Disponível em: <[10.1371/journal.pntd.0006559](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006559)>.

MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kb and steroid receptor-signaling pathways. **Endocrine Reviews**, Volume 20, Edição 4, 1º de agosto de 1999, páginas 435–459, <https://doi.org/10.1210/edrv.20.4.0375>.

MEIRA, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LANFREDI-RANGEL, A.; GUIMARÃES, E. T.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Antiparasitice valuation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 108–115, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Doenças negligenciadas: “prioridade das prioridades”. 2008. Acesso em: 10 de novembro de 2023. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_doencas\\_negligenciadas.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_doencas_negligenciadas.pdf).

MORENO, E. A.; ARAUJO, M. A.; ALARCÓN, M. E.; LUGO, A.; MORENO, S. C.; BORGES, R. Hematological and blood glucose alterations in Wistar rats with acute chagasic infection during gestation. **Invest Clin.** (2007);48(2):187–98.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. J. R.; ROSAS, F., et al. Randomized Trial of benznidazole for chronic Chagas cardiomyopathy. **N Engl J Med.** 373(14):1295-306. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1507574> PMID:26323937>.

NATARAJU, A.; SAINI, D.; RAMACHANDRAN, S.; BENSHOFF, N.; LIU, W.; CHAPMAN, W.; MOHANAKUMAR, T. Oleanolic acid, a plant triterpenoid, significantly improves survival and function of islet allograft. **Transplantation** 88, 987–994. 2009.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, 62(1), 236 LP – 243. 1994. <http://iai.asm.org/content/62/1/236.abstract>.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA, A. S. JR.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Rev Patol Trop.** 37(3):209-28. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v37i3.5063>>.

OPAS/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization). OPAS divulga novo guia para diagnóstico e tratamento da doença de Chagas. 2019. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5844:opas-divulga-novo-guia-para-diagnostico-e-tratamento-da-doenca-de-chagas&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5844:opas-divulga-novo-guia-para-diagnostico-e-tratamento-da-doenca-de-chagas&Itemid=812)>. Acesso em: 08 de agosto de 2023.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 19(3), 201–211. 1986. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90002-2).

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: a species with expressive *in vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant effects. **Bio Med Research International**. ID 301294, 2014.

PASCUTTI, A. F. et al. Benznidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice. **Life Sci**. 2004 Dec 24;76(6):685-97.

PEDRA-REZENDE, Y.; et al. physical exercise promotes a reduction in cardiac fibrosis in the chronic indeterminate form of experimental Chagas Disease. *Front Immunol*. 2021 Nov 4;12:712034. Doi: 10.3389/fimmu.2021.712034.

PEREIRA, S. A. DE L. et al. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**. 2002 Apr;66(4):401-3. Doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.401.

PÉREZ-ANTÓN, E. et al. Immunological exhaustion and functional profile of CD8+ T lymphocytes as cellular biomarkers of therapeutic efficacy in chronic Chagas patients. 2019. **Acta Tropica, Basel**, v. 202, p. 105242.

PONTES, V. M.; SOUZA, A. S. JR; CRUZ, F. M.; COELHO, H. L.; DIAS, A. T.; COELHO. I. C.; et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benznidazol, no Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Trop**. 43(2):182-7. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000200015> PMid:20464150>.

RIMOLDI, M. T.; SHER, A.; HEINY, S.; LITUCHY, A.; HAMMER, C. H.; JOINER, K. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 85(1), 193–197. 1988. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.193>.

RODRIGUES, M. M.; RIBEIRÃO, M.; BOSCARDIN, S. B. CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Immunol Lett**. 2000 Jul 3;73(1):43-50. Doi: 10.1016/s0165-2478(00)00205-4.

ROMA, E. H. et al. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasites & vectors**, v. 9, p. 193, 2016.

RYU, S. Y.; et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. **Planta Med**. 2000 May;66(4):358-60. Doi: 10.1055/s-2000-8531.

SANTOS, E. C. et al. Concomitant benznidazole and suramin chemotherapy in mice infected with a virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5999–6006, 2015.

SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 34, 1995.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**. 1986 Aug 29;46(5):705-16. PMID: 3091258. Doi: [10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6).

SENTHIL, S.; CHANDRAMOHAN, G.; PUGALENDI, K. V. Isômeros (oleanólico e ácidos ursólicos) diferem em seu efeito protetor contra Isquemia miocárdica induzida por isoproterenol em ratos. **Inter J Cardiol**. 119:131 – 33. 2007.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T., PÁDUA, M. A. The role of IL12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res** 31: 111-5. 1998.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med** 174: 539-45. 1991.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, 63(12): 4862-7, 1995.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, 175(1): 169-74, 1992.

SILVA, G. G.; AVIZ, G. B.; DE, & MONTEIRO, R. C. Perfil epidemiológico da Doença de Chagas aguda no Pará entre 2010 e 2017. **Pará Research Medical Journal**, 4, e29. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.4322/prmj.2019.029>>.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

SIMIONI, P. U. et al. Métodos de prevenção e tratamento para a Doença de Chagas. **Ciência & Inovação**, 4(1):61-67. 2019.

SOUZA, D. O. et al. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**; 19(1):121-132, 2014.

SOUZA NETO, J. P.; MARIANO, M. S. R.; AOYAMA, E. A. Principais alterações cardiovasculares decorrentes da Doença de Chagas com ênfase à cardiopatia chagásica. **RevBIS**. 2(2):27-34. 2020.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest.**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**. 2000 Jul;2(8):851-66. Doi: [10.1016/s1286-4579\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00388-9).

TAMBOURGI, D. V.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D.; JOINER, K. A.; SHER, A.; HEATH, S.; HALL, B. F.; OGDEN, G. B. A partial cDNA clone of trypomastigote decayaccelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, 61(9), 3656 LP – 3663. 1993. <http://iai.asm.org/content/61/9/3656.abstract>.

TARLETON, R. L. Chagas Disease: A solvable problem, Ignored. **Trends in Molecular Medicine**, 22(10), 2016.

UCHÔA, V. T. et al. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82–91, 2010.

VANLERBERGHE, V.; VERDONCK, K. La inequidad em salud: El caso del dengue. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v.30, n.4, 2013.

VELGE, P.; OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. **Parasitology**, 97(2), 255–268. 1988. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0031182000058467>.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177–5182, 1994.

WALLACE, J. L.; IGNARRO, L. J.; FIORUCCI, S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. **Nat Rev Drug Discov**. 2002, May;1(5):375-82. Doi: 10.1038/nrd794.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leucotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol** 134: 1989-93. 1985.

WHO (World Health Organization). Integrating neglected tropical diseases into global health and development - 4th WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization; 2017.

WHO (World Health Organization). Plano and neglected tropical diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/28-01-2021-who-issues-new-10-year-plan-to-end-suffering-from-neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 08 julho 2023.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) Acesso em: 02 de setembro de 2023.

YURQUINA, R. S. et al. Morpho an atomical studies and antineumococcal and antioxidant activities of leaves from *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K. Koch. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 1, p. 5-9, 2008.

ZHANG, C.; WANG, C.; LI, W.; WU, R.; GUO, Y.; CHENG, D.; YANG, Y.; ANDROULAKIS, I. P.; KONG, A. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the triterpenoid ursolic acid in regulating the antioxidant, anti-inflammatory, and epigenetic gene responses in rat leukocytes. **Mol. Pharm.** 14(11), 3709-3717. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00469>>.

ZERIN, T.; LEE, M.; JANG, W. S.; NAM, K. W.; SONG, H. Y. Antiinflammatory potential of ursolic acid in *Mycobacterium tuberculosis*-sensitized and concanavalin A-stimulated cells. **Mol. Med. Rep.**, 13(3), 2736-2744. 2016.

## 7 ANEXOS

## Anexo I



**Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa**  
**Nº 05/23 - CEUA**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi de extrato supercrítico de embaúba em modelo animal", registrada com o número "06-22", sob a responsabilidade de "Rafael Andrade Menelli", que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 06/11/2023.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2022 - 31/05/2023
Espécie/inhóspede/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	40
Peso/idade	25 gr/60 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da Unioeste.

Cascavel, 13 de setembro de 2023

**Prof. Dra. Sara Cristina Sagae**  
Coordenadora do CEUA - Portaria 1507/2023-GRE



## Anexo II



### Autorização

O Protocolo nº 29-19 intitulado "Manutenção de cepa infecciosa do protozoário *Trypanosoma cruzi* em camundongos suscetíveis", sob a responsabilidade de **Rafael Andrade Menolli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 08/07/2022. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2019 - 31/07/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico - Balb/ C
N. de animais	312
Peso/idade	Qualquer peso - qualquer idade
Sexo	Qualquer sexo
Origem	Biotério da Unioeste - Cascavel/PR

Cascavel, 13/07/2022.

**Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña**  
 Coordenadora do CEUA  
 Portaria nº 3126/2018-GRE

## ANEXO II

### Montagem (inclusão) de material em parafina (Paraplast®)

#### ➤ **Fixação:**

Colocar as peças (material) em formol 10% tamponado (tampão fosfato).

Fixar por 24 horas e lavar em água corrente por 48 horas.

Estocar em álcool 70% até o início da inclusão.

#### ➤ **Desidratação:**

Material estocado em álcool 70%.

30 minutos em álcool 80% → 2 vezes.

30 minutos em álcool 95% → 2 vezes.

30 minutos em álcool 100% → 2 vezes.

#### ➤ **Diafanização:**

Xilol + álcool 100% (1:1) → 30 minutos.

Xilol 100% (1 e 2) → 20 minutos.

Xilol PA → 20 minutos.

Infiltração:

Paraplast® + Xilol → 2 horas a partir do momento em que o Paraplast® derreter.

Paraplast® puro II → overnight stay (pernoite) +/- 14 horas.

Paraplast® puro III → 3 horas.

#### ➤ **Inclusão:**

Montar as caixinhas de papel no tamanho do material a ser incluso.

Pegar Paraplast® puro, encher a caixinha e orientar a peça.

Deixar endurecer a temperatura ambiente.

➤ **Coloração Hematoxilina – eosina.**

Desparafinar, hidratar.

Hematoxilina 10 minutos → lavar 5 minutos em água destilada.

Álcool Absoluto por 30 segundos.

Eosina 5 minutos → lavar para retirar o excesso.

Desidratar, diafanizar e montar.

➤ **Coloração Tricrômico de Masson.**

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução de Bouin 75 ml de solução saturada de ácido pícrico 25 ml formaldeído puro 5 ml ácido acético glacial

B) Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A - colocar 1 g de hematoxilina pó em 100 ml de álcool 95%.

Solução B- colocar 4 ml de solução aquosa de cloreto férrico a 29% em 95 ml de água destilada e 1 ml de ácido clorídrico concentrado.

Observação: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B.

C) Solução de Escarlata de Biebrich 90ml de solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1% 10ml de solução aquosa de fucsina ácida 1% 1 ml de ácido acético glacial.

D) Solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica 2,5 g de ácido fosfotúngstico 2,5 g de ácido fosfomolibdico 100 ml de água destilada

E) Solução de azul de anilina 2,5g de azul de anilina 2 ml de ácido acético glacial 100 ml de água destilada

F) Solução de água-ácido 100 ml de água destilada 1 ml de ácido acético glacial

Etapas da coloração do Tricômico de Masson

1ª Etapa: desparafinar e hidratar.

2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.

3ª Etapa: colocar em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente.

4ª Etapa: lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin e depois em água destilada.

5ª Etapa: corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos.

6ª Etapa: lavar em água corrente por 10 minutos e em água destilada.

7ª Etapa: corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos.

8ª Etapa: passar por água destilada.

9ª Etapa: diferenciar pela solução de ácido fosfotúngsticofosfomolibdico durante 10 a 15 minutos.

10ª Etapa: lavar em água destilada.

11ª Etapa: corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos.

12ª Etapa: lavar em água destilada.

13<sup>a</sup> Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos.

14<sup>a</sup> Etapa: lavar em água destilada.

15<sup>a</sup> Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.