

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
PPGSN

Dissertação

**AVALIAÇÃO INFLAMATÓRIA E
PARASITOLÓGICA DA
TERAPIA COM
TERACURMINA EM
CAMUNDONGOS
INFECTADOS PELA CEPA
COLOMBIANA DO
TRYPANOSOMA CRUZI**

Vitória Louise Teixeira e Silva

Ouro Preto
2022



UFOP

VITÓRIA LOUISE TEIXEIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO INFLAMATÓRIA E PARASITOLÓGICA DA TERAPIA COM TERACURMINA
EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA COLOMBIANA DO *TRYPANOSOMA*
*CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

Orientador: Prof. André Talvani
Co-orientador: Prof. Kelerson Mauro de Castro Pinto

Ouro Preto – MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Vitoria Louise Teixeira e.
Avaliação inflamatória e parasitológica da terapia com teracurmina em camundongos infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*. [manuscrito] / Vitoria Louise Teixeira e Silva. - 2022.
51 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. André Talvani.

Coorientador: Prof. Dr. Kelerson Mauro de Castro Pinto.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Chagas, Doença de. 2. Curcumina. 3. Inflamação. 4. Parasitologia - Avaliação. 5. Protozoário. 6. *Trypanosoma cruzi*. I. Pinto, Kelerson Mauro de Castro. II. Talvani, André. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Flavia Reis - CRB6-2431



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE E NUTRICAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitória Louise Teixeira e Silva

Avaliação inflamatória e parasitológica da terapia com teracurmina em camundongos infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 29 de abril de 2022.

Membros da banca

Dr. André Talvani Pedrosa da Silva - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Kelerson Mauro de Castro Pinto - Coorientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Melina Oliveira de Souza - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Aline Luciano Horta - (Albert Einstein College of Medicine)

André Talvani Pedrosa da Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 24 de outubro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Talvani Pedrosa da Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/11/2022, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0420164** e o código CRC **1250EA8B**.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir concluir mais essa etapa desafiadora com muita saúde e determinação;

Ao professor André Talvani pela orientação, incentivo e por acreditar que eu sou capaz. A sua paciência e cuidado fazem toda diferença. Você é um exemplo para mim e para todos em sua volta, pode ter certeza disso!

Ao professor Kelerson pela co-orientação, amizade e confiança, a caminhada foi muito mais leve pois eu sabia que poderia contar com você em qualquer circunstância. Desde a graduação minha admiração por você é imensa!! Obrigada por me ensinar tanto!!

Meu mais profundo agradecimento ao “Washingtão” e à Tati Menezes, que estiveram presentes desde o início do projeto e não mediram esforços para me ajudar. Por todo suporte durante a fase de experimentação animal, de domingo a domingo (sem vocês nada disso seria possível), durante as análises e escrita desse trabalho. Eu não tenho palavras para agradecer, serei eternamente grata a vocês. Vocês são sensacionais, contem sempre comigo!

A todos os colegas do LABIIN que também fizeram parte desse processo, em especial Guilherme, Luiza e Bianca;

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição, pelo ensino de alta qualidade;

Aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq e em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio para a realização do presente trabalho.

Finalmente, à minha família. Meu pai Luís, minha mãe Cida e meu irmão Luís Felipe. Vocês me viram partir de casa, rumo à Ouro Preto, há 8 anos atrás. Desde então, sempre escuto aquela velha e boa pergunta: “Vi, quando vem para casa?”. Se hoje eu venho dar o passo final para obter meu título de mestra em saúde e nutrição, é graças a vocês. Vocês são a minha base! Obrigada por TUDO!

RESUMO

A teracurmina é uma formulação de nanopartículas derivada da curcumina. Por apresentar propriedades anti-inflamatórias, este composto bioativo é proposto como mitigador de quadros patológicos pós-inflamação exacerbada. O *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, induz intensa resposta inflamatória em mamíferos, ocasionando disfunções em células e tecidos de distintos órgãos como coração, cólon e sistema nervoso central. Neste estudo, avaliamos os efeitos da teracurmina sobre a resposta inflamatória e parasitológica em 32 camundongos *Swiss* machos infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Os animais foram tratados com 30 mg/kg de teracurmina, via gavagem, por 30 dias, sendo os dados de parasitemia coletados diariamente. No 30º dia pós-infecção os camundongos foram eutanasiados e coletou-se o coração, baço, fígado, tecido adiposo epididimal e gastrocnêmio para análise histológica, além de 1ml de sangue para dosagens de TNF, IL-6, IL-10, IL-15, CCL2 e CK. Os animais infectados e submetidos à terapia com teracurmina apresentaram redução na parasitemia e nas concentrações da IL-15 (tecidos cardíaco e esquelético) e da CCL2 (tecido cardíaco). Houve aumento da massa esplênica com a infecção, mas não houve alterações na massa do coração e do fígado após infecção e/ou terapia com teracurmina nos 30 dias de investigação. Não foram observadas diferenças nas concentrações de CK, no perfil de infiltrado inflamatório e no índice de sobrevivência dos camundongos infectados sob terapia ou não com a teracurmina. Assim, conclui-se que a teracurmina atua controlando a replicação parasitária na circulação e regulando a produção de IL-15 e CCL2 teciduais.

Palavras-chave: teracurmina; *T. cruzi*; doença de Chagas; inflamação; IL-15; CCL2

ABSTRACT

Theracurmin is a nanoparticle formulation derived from curcumin. Due to its anti-inflammatory properties, this bioactive compound is proposed as a mitigator of pathological conditions after exacerbated inflammation. *Trypanosoma cruzi*, the protozoan that causes Chagas disease, induces an intense inflammatory response in mammals, causing dysfunctions in cells and tissues of different organs such as the heart, colon and central nervous system. In this study, we evaluated the effects of Theracurmin on the inflammatory and parasitological response in 32 male Swiss mice infected with the Colombian strain of *T. cruzi*. The animals were treated with 30 mg/kg of Theracurmin, by oral gavage, for 30 days, with parasitemia data collected daily. On the 30th day post-infection, the mice were euthanized and the heart, spleen, liver, epididymal adipose tissue and gastrocnemius were collected for histological analysis, in addition to 1ml of blood for TNF, IL-6, IL-10, IL-15, CCL2 and CK. Infected animals submitted to Theracurmin therapy showed a reduction in parasitemia and in IL-15 (heart and skeletal tissue) and CCL2 (heart tissue) concentrations. There was an increase in splenic mass with infection, but there were no changes in heart and liver mass after infection and/or Theracurmin therapy in the 30 days of investigation. No differences were observed in CK concentrations, in the inflammatory infiltrate profile and in the survival rate of infected mice with or without Theracurmin therapy. Thus, it is concluded that Theracurmin acts by controlling parasitic replication in the circulation and regulating the production of tissue IL-15 and CCL2.

Keywords: Theracurmin; *T. cruzi*; Chagas disease; inflammation; IL-15; CCL2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Curcuma longa</i>	18
Figura 2: Rizomas da cúrcuma.....	19
Figura 3: Fórmula química da curcumina	19
Figura 4: Ação da curcumina em diferentes contextos e alguns alvos moleculares envolvidos.	21
Figura 5: Linha do tempo do processo de experimentação animal	25
Figura 6: Delineamento experimental do estudo	26
Figura 7: Embalagem “ <i>Theracurmin</i> ” (<i>CurcuminRich</i> ®)	27
Figura 8: Curva de parasitemia seguida da área sob a curva e taxa de sobrevivência dos animais infectados.	30
Figura 9: Gráfico de variação da massa corporal.....	31
Figura 10: Concentração dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco entre os diferentes grupos experimentais.	33
Figura 11: Concentração dos marcadores inflamatórios no tecido esquelético entre os diferentes grupos experimentais.....	35
Figura 12: Concentração plasmática de CK (μ /l) entre os diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 13: Média de núcleos celulares entre os grupos experimentais.	37
Figura 14: Fotomicrografia de cortes histológicos dos tecidos musculares cardíaco e esquelético.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos relacionando a infecção por <i>T. cruzi</i> e a curcumina.	23
Tabela 2: Dados da massa relativa do coração, baço, tecido adiposo epididimal e fígado.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – Ácido bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ADP – Difosfato de adenosina
AMP – Adenosina monofosfato
AUC – Área sob a curva
BSA – Albumina sérica bovina
Bz – Benzonidazol
CCA – Centro de Ciência Animal
CCL2 – Ligante 2 da quimiocina CC
CCL3 – Ligante 3 da quimiocina CC
CCL5 – Ligante 5 da quimiocina CC
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CD – *Cluster of differentiation*
CX3CL1 – Ligante 1 da quimiocina C-X3-C
CK – Creatina quinase
CMC – Carboximetilcelulose sódico
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2 – Ciclooxigenase-2
DC – Doença de Chagas
DTU – *Discrete Typing Unit*
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
EP – Erro padrão
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ET-1 – Endotelina 1
FOXP3 – *Forkhead box P3*
GPI – Glicosilfosfadilinositol
HAT – Histona acetiltransferase
IL – Interleucina
LABIIN – Laboratório de Imunobiologia da Infamação
LADOC – Laboratório de Doença de Chagas
LDLr – Receptor de lipoproteína de baixa densidade
mRNA – RNA mensageiro

INF- γ – Interferon gama

NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NFATc1 – Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1

Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

NF- κ B – Factor nuclear *kappa* B

Nfx - Nifurtimox

NK – *Natural killer*

NLR – *NOD like receptor*

NLRP3 – *NOD like receptor family pyrin domain–containing 3*

NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain*

ON – Óxido nítrico

PBS – Tampão fosfato-salino

PGE2 – Prostaglandina E2

STAT3 – Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1 – *T helper 1*

TNF – Fator de necrose tumoral

T CD4+ – *Cluster of differentiation 4* (célula T)

T CD8+ – *Cluster of differentiation 8* (célula T)

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Doença de Chagas e Trypanosoma cruzi	15
2.2	Curcumina/teracurmina	18
2.3	T. cruzi e curcumina	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	Animais em condições experimentais	25
4.2	Infecção e parasitemia	26
4.3	Terapia com teracurmina	26
4.4	Avaliação dos marcadores inflamatórios teciduais	27
4.5	Análise da CK	28
4.6	Análise histológica e morfométrica	28
4.7	Análise estatística	29
5	RESULTADOS	29
5.1	Parasitemia	29
5.2	Variação de massa corporal	30
5.3	Massa relativa dos órgãos	31
5.4	Marcadores inflamatórios no tecido cardíaco (TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10)	32
5.5	Marcadores inflamatórios no tecido esquelético (TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10)	34
5.6	Quantificação de CK	36
5.7	Análise histológica	36
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a qual acomete atualmente cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2021). Estima-se esta seja responsável pela morte de aproximadamente 10.000 pessoas anualmente (JACKSON *et al.*, 2014; IMAI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019). No processo inicial da infecção, o *T. cruzi* é responsável por causar uma intensa resposta inflamatória no hospedeiro mamífero, decorrente de uma tentativa de defesa do sistema imune para eliminá-lo. Infelizmente, em virtude da adaptação evolutiva do *T. cruzi*, este mecanismo de defesa não é suficiente para erradicá-lo e o processo inflamatório local se torna crônico, evoluindo para lesões teciduais e para o estabelecimento de eventos fibróticos nos órgãos acometidos (PRATA, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

No Brasil, o Benzonidazol (Bz) é o fármaco utilizado para o tratamento da DC, porém, o mesmo apresenta limitações importantes que impactam em seu uso, como a elevada toxicidade e os efeitos adversos que, em muitos casos, favorecem a suspensão do tratamento pelos indivíduos (MORILLO *et al.*, 2015). Com isso, em busca de estratégias mais eficazes de eliminação do parasito e, ao mesmo tempo, com menor dano às células hospedeiras, diferentes grupos têm investigado novos fármacos, compostos sintéticos, componentes bioativos com potencial atividade antiparasitária para implementação no controle do *T. cruzi* e/ou para a modulação da resposta imune culminando em um melhor prognóstico clínico para a doença (de PAULA COSTA *et al.*, 2010; BUDNI *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2017; HORTA *et al.*, 2018).

Dentre estes novos alvos de investigação, destaca-se a curcumina, conhecida por suas propriedades biológicas mitigadoras de uma inflamação exacerbada e, por isso, descritas em quadros neurodegenerativos, cardiovasculares, metabólicos, gastrointestinais e, também, associados às infecções (PESCOSOLIDO *et al.*, 2013; ALAMDARI *et al.*, 2009, SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2016; KELANY *et al.*, 2017; LOPRESTI, 2017; ADACHI *et al.*, 2020). Contudo, sua baixa capacidade de absorção e parcial solubilidade em água limitam suas potenciais ações (ANAND *et al.*, 2007). Este fato oportunizou o desenvolvimento da THERACURMIN®

(*Theravalues, Tokyo, Japan*), uma formulação que aprimora e soluciona as principais limitações de solubilidade descritas, previamente, na aplicação terapêutica com a curcumina (SASAKI *et al.*, 2011).

Os poucos trabalhos encontrados na literatura científica demonstraram que a curcumina parece atuar positivamente no controle da inflamação induzida pelo parasito. No entanto, a teracurmina apresenta uma melhor absorção e eficácia na administração oral em mamíferos (SUNAGAWA *et al.*, 2015; NAKAGAWA *et al.*, 2020). Este fato favorece novas hipóteses acerca dos efeitos da teracurmina diante da infecção pelo parasito causador da DC, possibilitando novas concepções sobre sua imunopatogênese e estratégias terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado unicelular *T. cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida, é o agente etiológico da DC. Descoberta pelo médico sanitário e cientista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909, atualmente é considerada endêmica na América do Sul e Central. Por se tratar de uma doença tropical negligenciada representa um sério problema para a saúde pública nessas localidades (ZINGALES *et al.*, 2011; WHO, 2021). Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* pode ser comumente encontrado em três formas evolutivas diferentes: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As formas epimastigotas e amastigotas são formas replicativas encontradas no trato digestório de vetores invertebrados (triatomíneos) e no interior das células de mamíferos infectados, respectivamente. Já a forma tripomastigota, que pode ser caracterizada como metacíclica (liberada nas fezes dos triatomíneos) ou sanguínea (presente no sangue de mamíferos) são consideradas formas de infecção deste parasito e possuem a capacidade de acometer uma ampla gama de tipos celulares do hospedeiro infectado (SALASSA & ROMANO; 2018).

O principal meio de transmissão deste agente etiológico ocorre pela via oral, quando a forma tripomastigota é ingerida por meio de um alimento contaminado (ex. açaí processado de forma artesanal, em regiões endêmicas), ou por via vetorial quando o triatomíneo, popularmente conhecido como “barbeiro”, excreta suas fezes infectadas em áreas de escoriação/fissuras em pele ou mucosa (DIAS, 2010; FILIGHEDDU *et al.*, 2017). Além disso, outras rotas de infecção também se fazem presentes e importantes, mesmo na atualidade, como a transfusão de sangue, a transmissão congênita, transplantes de órgãos sólidos e acidentes laboratoriais (DIAS, 2006; SANTANA *et al.*, 2019).

A DC pode ser caracterizada por duas fases clínicas: fase aguda e crônica. Em humanos, a fase aguda é marcada pela alta presença de parasitos na corrente sanguínea e em diversos tecidos, e pode permanecer pelo período de 2 a 4 meses (RASSI *et al.*, 2009; JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Os sintomas em sua maioria são leves e inespecíficos, porém, em casos de infecções vetoriais, observa-se sinais que

são conhecidos como sinais de porta de entrada, a exemplo do sinal de romanã (edema palpebral) (BERN *et al.*, 2011). Na fase crônica os níveis parasitêmicos tornam-se limitados, havendo um quadro assintomático para a maioria dos pacientes. Porém, com o avanço da doença e a predominância da resposta inflamatória crônica em decorrência do parasitismo tecidual, há variabilidade no curso clínico da doença destacando-se desde acometimentos no sistema cardiovascular e/ou gastrointestinal (indivíduos sintomáticos), até ausência de manifestações clínicas aos exames de rotina (indivíduos assintomáticos) (TALVANI & TEIXEIRA, 2011, NUNES *et al.*, 2013). Dos pacientes que avançam para a fase crônica, estima-se que 20 a 40% desenvolvam cardiopatia, que é tipicamente caracterizada por arritmias cardíacas, além de promover destruição de terminações nervosas e complicações no sistema de condução (NUNES *et al.*, 2017). Diante disso, a rápida eliminação do parasito é essencial para que a inflamação inicial não se torne crônica e as ações deletérias às células do hospedeiro não promovam destruição e disfunção em órgãos vitais conduzindo os indivíduos à morte (CARDILLO *et al.*, 2015).

O *T. cruzi* é um parasito constituído de distintas moléculas imunogênicas em sua superfície celular como é o caso das glicoproteínas - ex: glicosilfosfadilinositol (GPI) - envolvidas nos processos de invasão às células hospedeiras, evasão imune e endocitose (ANDREWS, 1994; SONGTHAMWAT *et al.*, 2007). Essas moléculas reforçam sua proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e promovem a sua adaptação em diferentes ambientes (VALENTE *et al.*, 2019; GIORGI E LEDERKREMER, 2020). Ademais, a presença dessas proteínas e de antígenos circulantes do parasito induzem uma intensa resposta inflamatória composta por células imune que atuarão ativamente na formação da primeira linha de defesa contra o parasito (CARDILLO, *et al.* 2015). Células fagocíticas são ativadas por padrão de reconhecimento de receptores do tipo *Toll* (TRL) e/ou do tipo NOD (inflamassomas NLRs/NOD1 e NLRP3) que se conectam às moléculas de GPI presentes na superfície do parasito (CARDOSO *et al.*, 2016, QUEIROGA *et al.*, 2021). Essa interação conduzirá, principalmente, à ativação de uma resposta imune do tipo Th1, onde mediadores como TNF, IL-6, IFN- γ , IL-12, CCL2, CCL3, CCL5 e subprodutos de espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (ON), modulam

o curso da infecção favorecendo a eliminação do parasito (TALVANI & TEIXEIRA, 2011). Da mesma forma, as células *natural killers* (NK) são consideradas fundamentais nesta fase inicial da infecção pela produção de INF- γ . Esta citocina ativará outras populações celulares como macrófagos/monócitos, neutrófilos, células T e B e promoverá a síntese de anticorpos, citocinas e outras moléculas que intensificarão a resposta inflamatória e controla a replicação parasitária (CARDILLO *et al.*, 2015). Este processo de ativação celular gera um intenso recrutamento de células pró- inflamatórias para os sítios de infecção e, estas ações podem gerar danos teciduais e perda funcional do órgão. Em decorrência desta resposta exacerbada e, a depender de outros fatores associados ao parasito e/ou ao hospedeiro mamífero, há mecanismos de sinalização e diferenciação celular para células com perfis regulatórios (ex. células expressando CD25+ e FoxP3+) e/ou células produzindo citocinas com perfil regulatório como a IL-10, TGF- β , a IL-22, dentre outras. Por isso este equilíbrio entre a resposta inflamatória e a resposta regulatória na infecção por *T. cruzi* determinam, em parte, a suscetibilidade à progressão e o prognóstico clínico da doença (POVEDA *et al.*, 2014; MARIANO *et al.*, 2008, ARAÚJO *et al.*, 2018).

Por apresentar ampla variabilidade em nível biológico e genético, as diferentes cepas do *T. cruzi* são, atualmente, classificadas de acordo com suas características epidemiológicas e de patogenicidade, denominadas *Discrete Typing Unit* (DTU). As DTUs são subdivididas em seis grupos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (ZINGALES *et al.*, 2009). Em relação à cepa Colombiana, utilizada neste estudo, ela se caracteriza como DTU TcI, e apresenta tropismo cardíaco, capacidade de gerar lesões histopatológicas com intenso processo inflamatório, pico de parasitemia próximo aos 28 dias e resistência aos medicamentos Bz e Nifurtimox (Nfx) (ANDRADE *et al.*, 1985; FILARDI E BRENER, 1987; ANDRADE AND MAGALHÃES, 1997).

O Bz e o Nfx são atualmente os fármacos utilizados para o tratamento etiológico da DC, sendo o Bz o único autorizado para tratamento no Brasil (DIAS & COURA, 1997). Apesar de atuar em formas circulantes e, com menor efetividade, em formas teciduais do parasito, o Bz possui elevada toxicidade e pode ocasionar reações adversas como dermatites, distúrbios gastrointestinais, alterações

hematogênicas favorecendo, assim, o abandono do tratamento (SALOMON, 2012). Portanto, faz-se necessário a busca de novas estratégias terapêuticas que apresentem melhor eficácia e segurança aos indivíduos durante o tratamento etiológico da DC.

2.2 Curcumina/teracurmina

Dentre os alvos investigados como potenciais agentes antiparasitários (KOIDE *et al.*, 2002), destaca-se a curcumina, conhecida como sendo uma das principais substâncias encontradas no rizoma (caule subterrâneo) da cúrcuma (*Curcuma longa*).

A cúrcuma (**FIG. 1**) é uma planta originária do sudeste asiático e faz parte da família do gengibre (*Zingiberaceae*) (KOTHA & LUTHRIA, 2020). Atualmente o seu cultivo pode ser encontrado em diversos locais do mundo, como a China, Indonésia, Peru, Brasil e Índia, sendo essa última a maior produtora e exportadora da raiz deste vegetal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; KOTHA & LUTHRIA, 2020).

Figura 1: *Curcuma longa*



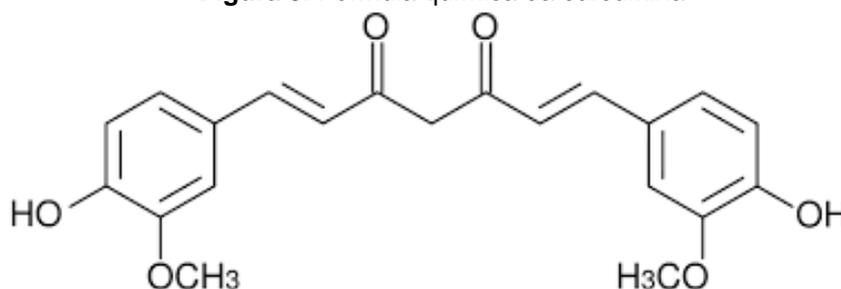
Fonte: Site Flickr, fotografia de Ahmad Fuad Morad

Figura 2: Rizomas da cúrcuma



Fonte: Google imagens

Figura 3: Fórmula química da curcumina



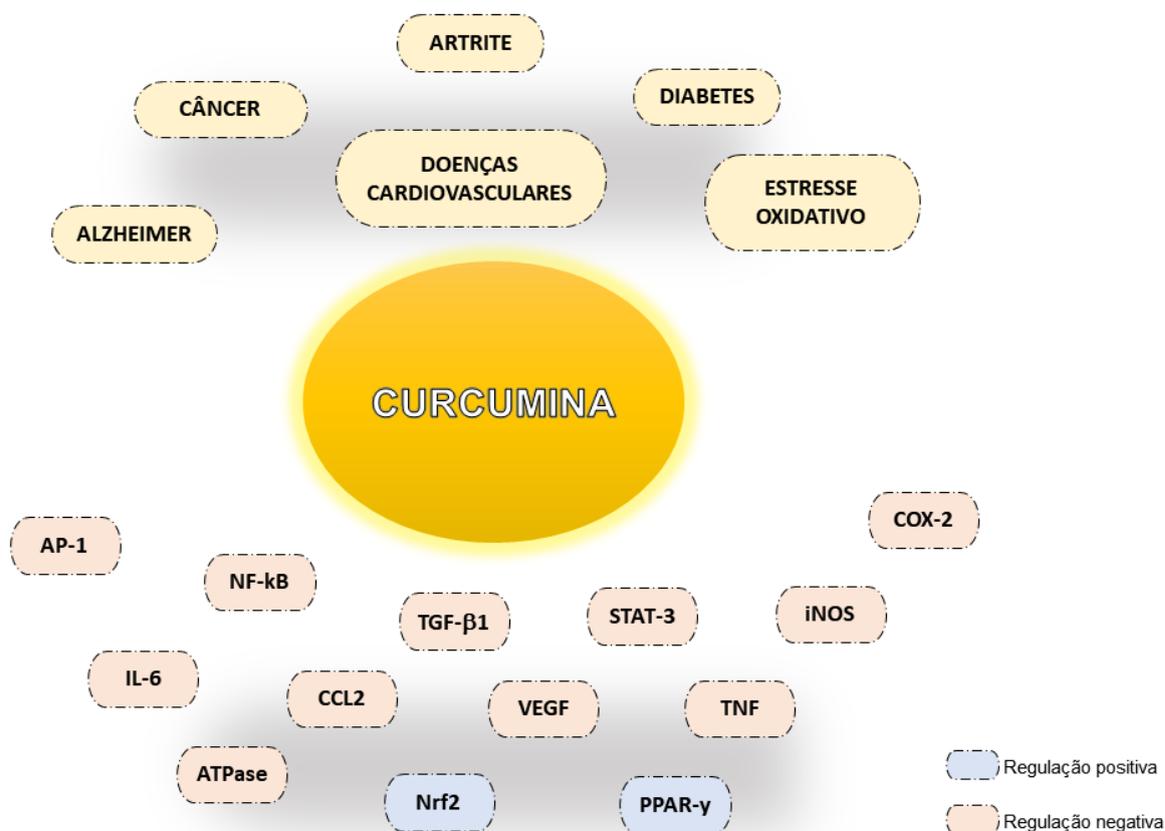
Fonte: Google imagens

Para fins de utilização como aditivo alimentar, o rizoma do vegetal pode ser desidratado e moído, gerando um pó de coloração amarelada (**FIG. 2**) com composição bastante variada, onde destaca-se os seguintes curcuminóides: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). A curcumina é um polifenol hidrofóbico que se apresenta como o constituinte ativo da cúrcuma e representa cerca de 77% da classe dos curcuminóides (LESTARI & INDRAYANTO, 2014). Originalmente, o isolamento da curcumina foi realizado por Vogel em 1842, e teve sua estrutura definida por Milobedzka e Lampe em 1910 (**FIG. 3**) (AGGARWAL *et al.*, 2004). A presença de

subunidades estruturais como as carbonilas e as hidroxilas fenólicas atribuem à curcumina ações biológicas importantes, tais como a ação antioxidante, devido à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio que reagem com espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente anulará possíveis danos celulares (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Devido à sua forte coloração, a curcumina é comumente utilizada como um agente corante, além de estar envolvida no preparo de molhos e *curries*. Sua aplicação está tradicionalmente atrelada à medicina indiana, sendo utilizada para tratamento de várias doenças, principalmente aquelas que estão relacionadas a processos inflamatórios (YEUNG *et al.*, 2019).

A curcumina é foco de investigação em diferentes estudos envolvendo vias de sinalização intracelular, o que amplia ainda mais suas potenciais aplicações na área da saúde (**FIG. 4**) (AGGARWAL *et al.*, 2004; NOORAFSHAN & ASHKANI-ESFAHANI, 2013). Suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias estão relacionadas, por exemplo, às alterações em componentes de sinalização como o NF- κ B, a COX-2, a STAT3 e o Nrf2 (ADACHI *et al.*, 2020; KUNNUMAKKARA *et al.*, 2008; GHASEMI *et al.*, 2019). Além disso, ela também é descrita por sua capacidade de regular negativamente a expressão de alguns genes, a saber, da IL-1, da IL-6, da IL-8 e do TNF (PESCOSOLIDO *et al.*, 2013).

Figura 4: Ação da curcumina em diferentes contextos e alguns alvos moleculares envolvidos.



Fonte: adaptado de Aggarwal *et al.* (2004) e Noorafshan e Ashkani-esfahani (2013)

Apesar da curcumina ser considerada segura para o consumo via oral, com referência aos estudos e ensaios clínicos (QURESHI' *et al.*, 1992, KANAI *et al.*, 2012), a baixa solubilidade em água torna sua principal limitação devido a uma série de fatores biológicos em mamíferos como um metabolismo acelerado, sua baixa concentração sérica e sua rápida eliminação pelo corpo. Tudo isso implica em sua baixa biodisponibilidade, fato que comprometeria sua absorção pelo organismo (ANAND *et al.*, 2007). Após ingestão, a curcumina sofre metabolismo hepático antes mesmo de acessar a corrente sanguínea, sendo imediatamente metabolizada em suas formas conjugadas e reduzindo consideravelmente sua fração utilizável. Dessa forma, os níveis sanguíneos da forma livre da curcumina, ou seja, de sua forma farmacologicamente ativa, não são suficientemente altas para que seus efeitos se tornem clinicamente evidenciados (OZAWA *et al.*, 2017).

Sendo assim, Sasaki e colaboradores (2011) desenvolveram uma nova formulação da curcumina, à base de dispersão de nanopartículas coloidais,

nomeado THERACURMIN® (*Theravalues, Tokyo, Japan*). A formulação da teracurmina consiste em 10% p/p de curcumina, 2% de outros curcuminóides, como demetóxicurcumina e isdemetoxicurcumina, 46% de glicerina, 4% de *goma ghatti* e 38% de água. Segundo os autores, a teracurmina apresenta uma biodisponibilidade muito mais elevada quando comparada à curcumina em pó, além de ser solúvel em água. Dados do estudo apontaram que a administração via oral de teracurmina, em ratos, teve a sua biodisponibilidade elevada em mais de 40 vezes quando comparada à curcumina comercialmente utilizada, e 27 vezes maior quando administrada em humanos saudáveis.

O estudo em questão demonstrou que a teracurmina possui vias de ação que podem ser relacionadas às ações da curcumina comumente utilizada, o que traria uma boa perspectiva de potencialização de seus efeitos.

2.3 *T. cruzi* e curcumina

Na tentativa de elucidar os efeitos da teracurmina na imunopatogênese causada pelo *T. cruzi*, foram encontrados estudos com a curcumina que propiciaram elementos importantes para fundamentação do presente trabalho (**TAB.1**), uma vez que até o presente momento não foram publicados estudos que envolvessem a teracurmina e o referido protozoário.

Tabela 1: Trabalhos relacionando a infecção por *T. cruzi* e a curcumina.

Referência	Modelo experimental	Tempo de tratamento	Cepa/inóculo	Dosagem de curcumina	Tecido analisado	Mediadores inflamatórios	Principais resultados
(Nagajyothi <i>et al.</i> , 2012)	Camundongos CD-1	35 dias	Brasil (5×10^4)	100 mg/kg	Coração e fígado	TNF, IL-19, IL-22, COX-2, TLR-9	↓ Parasitemia; ↑ Sobrevida; ↓ Parasitismo do tecido cardíaco (↓ infiltração de macrófagos)
	“Human foreskin fibroblast” (HFF)	24 horas		15 μ M 25 μ M	- -	-	Redução da expressão de LDLr
(Hernández <i>et al.</i> , 2016)	Camundongos BALB/c	35 dias	RA (50)	Curcumina dissolvida em óleo de milho (25, 50 ou 100 mg/kg)	Coração	COX-2, mPGES-1 e ET-1	↑ Sobrevida; ↓ Recrutamento de leucócitos no tecido cardíaco
	Cardiomiócitos de camundongos BALB/c infectados e estimulados por ET-1	3 horas 24 horas	RA (célula/parasito: 1:5)	13,5 μ M 27 μ M	- -	α -tubulina (citoplasmática), COX-2	Bloqueio da atividade transcricional de NFATc1 dependente de Ca ²⁺ , COX-2 e mPGES-1
(Novaes <i>et al.</i> , 2016)	Camundongos Swiss	20 dias	Y (2×10^3)	100 mg/kg + 50 ou 100mg/kg de Bz	Coração e fígado	IFN, IL-4 e MIP1- α	↓ Parasitemia, ↓ Inflamação do miocárdio; ↑ Sobrevida; ↓ (IFN, IL-4 e MIP1- α); ↓ Toxicidade hepática induzida por Bz
(Sueth-Santiago <i>et al.</i> , 2016)	Epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	7 dias	Dm28c (10^5)		-	-	Efeito citotóxico contra as formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>
	Macrófagos de BALB/c	48 horas	Dm28c (10^5)	100 μ M	-	-	Sem atividade citotóxica contra o tipo celular
	Esplenócitos de BALB/c	48 horas	Dm28c (10^5)		-	-	Sem atividade citotóxica contra o tipo celular
(Hernández <i>et al.</i> , 2018)	Camundongos C57BL/6	14 dias	Tulahuen (10^3)	100 mg/kg	Coração e vasos cardíacos	ET-1, IL-6, e TNF	↓ Infiltração de células inflamatórias das artérias miocárdicas, ↓ mRNA de IL-6, TNF, ET-1
(Hernández <i>et al.</i> , 2021)	Camundongos C57BL/6	30 dias	Brasil (1×10^5)	200 mg/kg + 25 mg/kg de Bz	Coração e soro	IL-1 β , IL-6, TNF e CCL5	↓ Parasitismo do tecido cardíaco; ↓ Hipertrofia cardíaca; ↓ Fibrose; ↓ (IL-1 β , TNF, IL-6, CCL5)

Foram encontrados seis trabalhos: três realizaram estudos com modelo *in vivo* (NOVAES *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2021), dois realizaram experimentos com modelo *in vivo* e *in vitro* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ *et al.*, 2016), e um trabalho utilizou apenas o modelo *in vitro* como modelo experimental (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2016). Como indicado na TAB.1, a aplicação da curcumina gerou resultados significativos em detrimento da infecção pelo *T. cruzi*. Logo, ressaltamos que este composto se apresenta como um potencial agente tripanocida e requer maiores investigações visando, principalmente, a sua formulação mais biodisponível.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da terapia com teracurmina em camundongos infectados experimentalmente pela cepa Colombiana do *T. cruzi* sobre os aspectos parasitológicos e inflamatórios.

3.2 Objetivos específicos

Após o tratamento diário com teracurmina em camundongos infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, temos como objetivo específico:

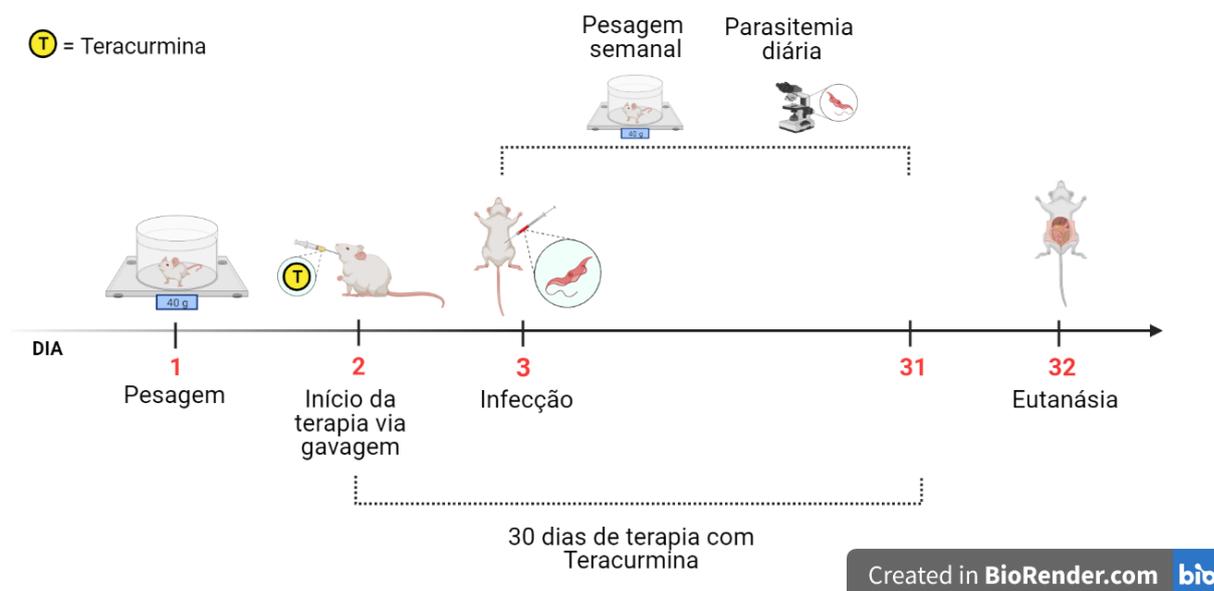
1. Avaliar se a terapia reduziu a quantidade de parasitos circulantes no sangue;
2. Avaliar se a terapia foi capaz de prolongar a vida dos camundongos no período experimental;
3. Avaliar se a concentração de TNF, IL-6, IL-10, IL-15, CCL2 nos tecidos musculares cardíaco e esquelético, bem como a concentração plasmática de CK foram alterados pós-terapia;
4. Quantificar o infiltrado inflamatório nos tecidos musculares cardíaco e esquelético.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais em condições experimentais

Foram utilizados 32 camundongos machos Swiss, com idade de 7 a 9 semanas e massa corporal aproximada de 20 a 40g. Estes animais foram alocados no biotério central da UFOP, em salas climatizadas em condições controladas de luminosidade (12h claro-escuro) e temperatura ($22,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e em gaiolas de polipropileno. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e receberam água e ração sem restrições ou limites. Todos os procedimentos propostos neste estudo encontram-se sinalizados abaixo, na figura 5, e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP sob o número de protocolo 4487110520 (anexo).

Figura 5: Linha do tempo do processo de experimentação animal

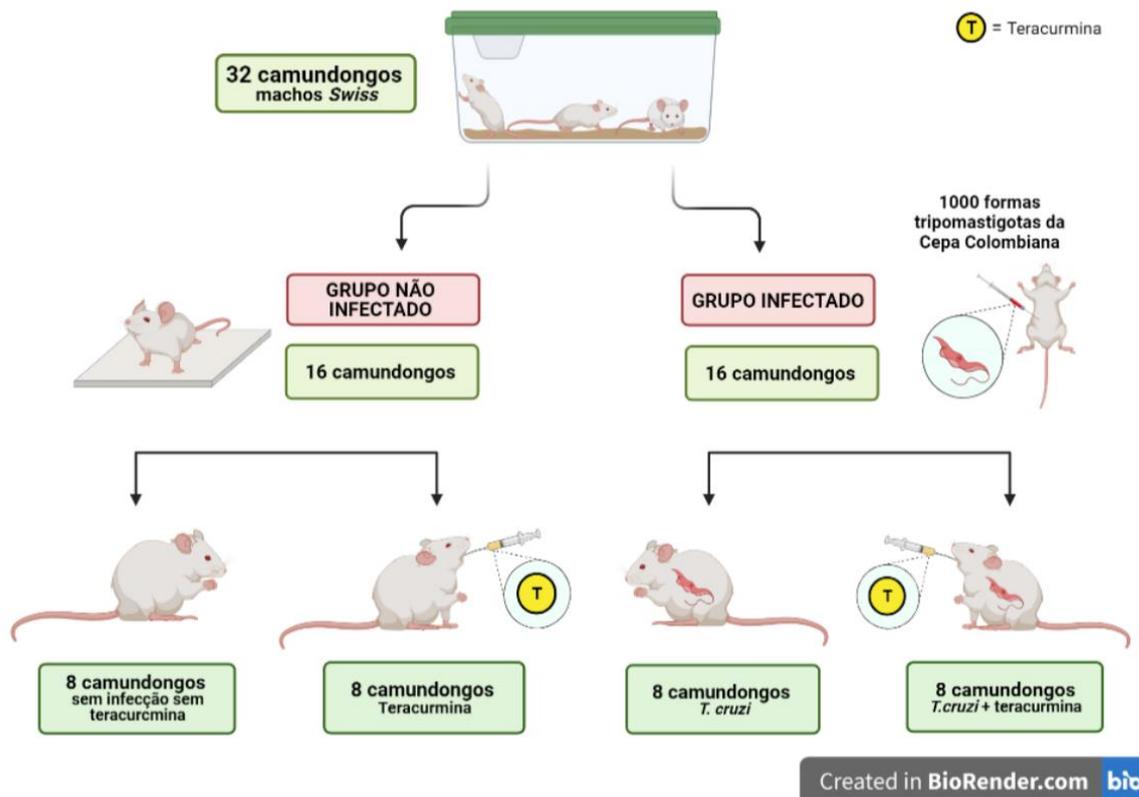


Fonte: Biorender.com

Os animais foram agrupados em: não infectados ($n = 16$) e infectados ($n = 16$). Em seguida, os animais foram novamente agrupados entre aqueles que receberam a teracurmina ($n = 8$) e os que não a receberam ($n = 8$), totalizando quatro grupos: (i) sem infecção sem teracurmina ($n = 8$); (ii) teracurmina ($n = 8$); (ii)

T. cruzi (n = 8) e (iv) *T. cruzi* + teracurmina (n = 8), conforme delineamento experimental proposto (FIG. 6).

Figura 6: Delineamento experimental do estudo



Fonte: Biorender.com

4.2 Infecção e parasitemia

Camundongos da linhagem *Swiss* foram inoculados, intraperitonealmente (HERNÁNDEZ *et al.*, 2021), com 1.000 formas tripomastigotas da cepa Colombiana. A mesma foi cedida pelo Laboratório de Doença de Chagas (LADOC) – Escola de Farmácia – UFOP.

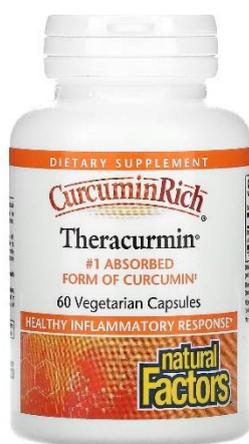
Para confirmação da infecção e/ou realização da parasitemia, foi utilizada a técnica de Brener (1962), a qual consiste na quantificação dos parasitos sanguíneos, em lâmina/lamínula, por microscopia óptica. A coleta foi realizada diariamente utilizando 5µl do sangue periférico obtido por punção da veia caudal dos animais.

4.3 Terapia com teracurmina

A partir do dia anterior à infecção, os animais foram submetidos a uma terapia diária, por gavagem, com 30 mg/kg (DAVIS *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2011) de

teracurmina (*CurcuminRich*[®], *Natural Factors*, Canadá) (**FIG. 7**) durante 30 dias. Cada cápsula do produto possuía 30mg de *Theracurmin*[®] (*Theravalues*, *Tokyo*, *Japan*), além de outros ingredientes. O preparo da solução individual consistiu na diluição da teracurmina em solução de água destilada + 0,5% de carboximetilcelulose sódico (CMC). Cada animal recebeu 300 µl (ANDERSEN *et al.*, 2004) dessa mistura, sendo que os grupos não tratados com teracurmina receberam apenas o veículo da solução no mesmo volume. Houve pesagem semanal de todos os animais para controle e readequação da dose de teracurmina.

Figura 7: Embalagem “*Theracurmin*” (*CurcuminRich*[®])



Fonte: Site oficial iHerb

4.4 Avaliação dos marcadores inflamatórios teciduais

Após eutanásia dos animais, as concentrações de TNF, IL-6, IL-10, IL-15 e CCL2 foram quantificadas no homogenato dos tecidos musculares cardíaco e estriado esquelético (30mg de cada amostra) pelo método de “ELISA” (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando kits da fabricante *Peprotech*, *NJ*, *EUA*, para detecção de marcadores inflamatórios. Para a sensibilização das microplacas de 96 poços foram adicionados 100µl/poço dos anticorpos monoclonais contra a proteína a ser dosada, diluídos em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a 22°C. Anticorpos não absorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-Tween. As placas foram bloqueadas com 300µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora. Em seguida as placas foram novamente lavadas. Após o bloqueio foram adicionados 25µl das amostras e 100µl/poço dos padrões para cada marcador. Após 2 horas de incubação, o processo de lavagem foi realizado novamente e foram adicionados 100µl/poço dos

anticorpos de detecção em PBS com 1% de albumina bovina e incubadas 2 horas a 22°C, seguindo-se da lavagem. Depois, foram adicionados 100µl/poço de conjugado avidina-HRP em diluição de 1:2000 em PBS com 1% de albumina bovina e posterior incubação a 22°C durante 30 min. As placas foram novamente lavadas e, para revelação, 100µl/poço de 2,2#-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS – *Sigma Aldrich, Missouri, USA*) foram adicionados, seguido de incubação a 22°C em ausência de luz. A densidade óptica foi determinada por um leitor de microplacas *Biotek ELx808* (California, USA). A quantificação dos mediadores inflamatórios presentes nas amostras foi determinada utilizando a densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas e analisadas pelo software *SOFTmax PRO 4.0*.

4.5 Análise da CK

Para determinar a atividade da CK no plasma de animais infectados, foi utilizado o método cinético UV, por meio do Kit Bioclin (CK-NAC). Para a execução da técnica foram necessárias duas soluções. A solução 1 contendo acetato de imidazol, glicose, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), hexoquinase, acetato de magnésio e N-acetilcisteína. A solução 2 contendo glicose-6-fosfato-desidrogenase, creatina fosfato, difosfato de adenosina (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e diadenosina pentafosfato. Para obter o reagente de trabalho, as duas soluções foram misturadas na proporção de 4 (solução 1) : 1 (solução 2). Essa mistura (750µl) e mais 15µl da amostra de plasma foram acondicionadas em tubos de 1,5 ml. Após homogeneização o conteúdo foi aquecido a 37° durante 2 minutos, sendo transferido para uma cubeta de quartzo e posicionada no leitor. As leituras foram realizadas, imediatamente após a inserção da cubeta, 1, 2 e 3 minutos após. O espectrofotômetro UV 1601 (*UV visible Spectrophotometer Shimadzu*) foi utilizado para as leituras em comprimento de onda de 340 nm.

4.6 Análise histológica e morfométrica

Durante a eutanásia, por meio de incisão, o coração e o gastrocnêmio foram removidos e lavados em PBS. Os tecidos foram imersos em formalina tamponada a 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) e, em seguida, embebidos

e emblocados em parafina. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo em seções de 5 µm de espessura utilizando navalha de aço. Cortes histológicos foram coletados em semi-séries, utilizando uma de cada 10 seções, às quais foram desparafinizadas (reidratadas) e coradas com hematoxilina e eosina. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em séries crescentes de álcool e xilol e montadas com lamínula e *Entellan*® (Merck, Alemanha).

Para a determinação do número de núcleos celulares presentes no fragmento, foram obtidas 10 imagens histológicas (campos aleatórios) no aumento de 20x com o uso do microscópio Leica DM 5000 B (*Leica Application Suite*, versão 2.4.0R1) e processado através do programa analisador de imagem *Leica Qwin V3* (SOUZA *et al.*, 2021).

4.7 Análise estatística

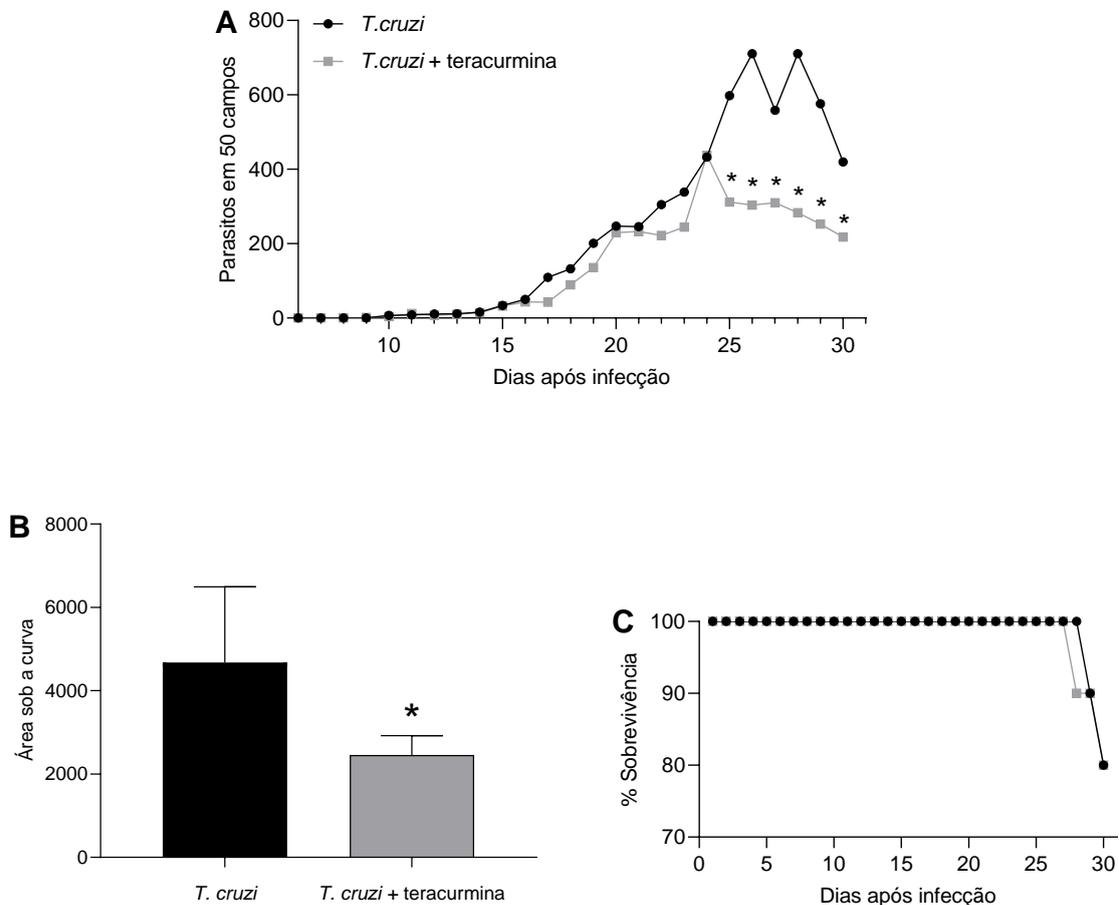
O software *GraphPad Prism 8.0.1* foi utilizado para todas as análises. Para averiguar a distribuição dos dados foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para dados paramétricos e análise de variância utilizou-se o teste *one-way ANOVA* seguido do teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Para avaliar duas amostras independentes foi utilizado o teste t não pareado, para dados paramétricos, ou teste de *Mann-Whitney*, para dados não paramétricos. Os dados estão apresentados sobre a forma de média e erro padrão (EP). O nível de significância adotado para as análises foi de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Parasitemia

O uso diário de teracurmina em animais infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* reduziu o número de parasitos sanguíneos entre 25 e 30 dias após a infecção quando comparados ao grupo apenas infectado (**FIG. 8 A**). Avaliamos, ainda, estes parâmetros na perspectiva da área sob a curva, indicando uma diferença significativa entre estes grupos (**FIG. 8 B**). Na curva de sobrevivência os resultados indicaram um comportamento semelhante entre as curvas até os 30 dias pós-infecção, observando 80% de sobrevivência para ambos os grupos (**FIG. 8 C**).

Figura 8: Curva de parasitemia seguida da área sob a curva e taxa de sobrevivência dos animais infectados.

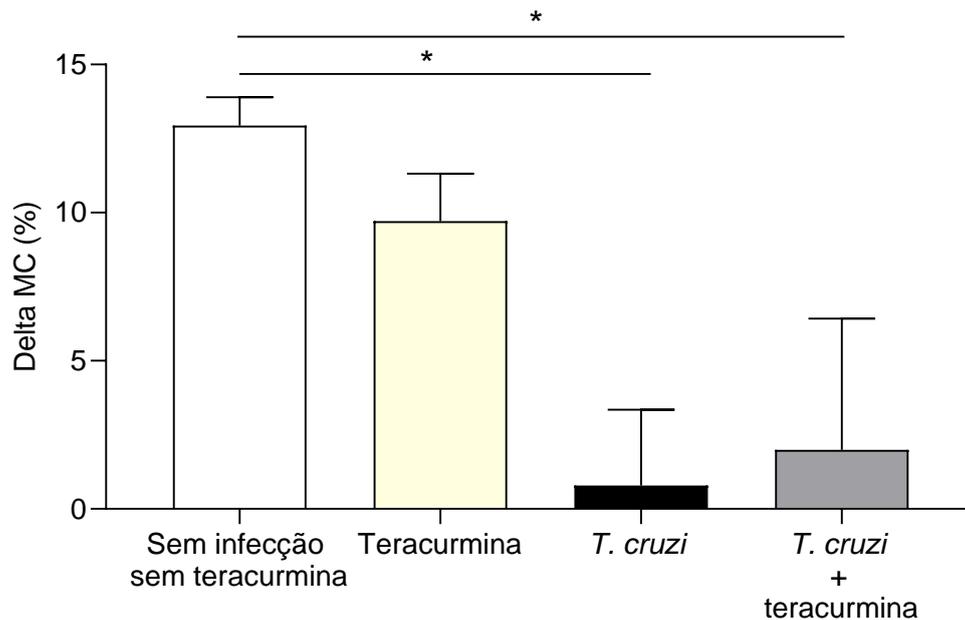


(A) O gráfico apresenta a contagem de parasitos em 50 campos de acordo com os dias após a infecção entre os animais ($n=8$) pertencentes aos grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina. Os dados foram considerados significativamente diferentes nos dias 25, 26, 27, 28, 29 e 30 $^*(p < 0,05)$, utilizando o teste de *Mann-Whitney* para comparação par a par. (B) O gráfico indica a área sob a curva dos grupos infectados em relação ao gráfico de parasitemia. Nota-se uma menor área no grupo submetido à terapia com teracurmina $^*(p = 0,0086)$ quando comparado ao grupo apenas infectado. Foi utilizado o teste t não pareado. (C) O gráfico indica a taxa de sobrevivência dos animais de acordo com os dias após a infecção entre os grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina, o qual indicou uma taxa de 80% no 30º dia em ambos. Dados expressos em média \pm EP.

5.2 Variação de massa corporal

A variação de massa corporal dos animais (massa corporal final – massa corporal inicial / massa corporal inicial \times 100) foi menor nos animais pertencentes aos grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina, quando comparados ao grupo sem infecção e sem teracurmina (**FIG. 9**).

Figura 9: Gráfico de variação da massa corporal



* = Os dados pertencentes aos animais (n=8) dos grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina foram significativamente diferentes, $p = 0,0187$ e $p = 0,0389$, respectivamente, quando comparados ao grupo sem infecção sem teracurmina. Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média \pm EP.

5.3 Massa relativa dos órgãos

Para avaliar se a terapia com teracurmina alterou padrões metabólicos sistêmicos ou focais (órgãos), a massa relativa (massa do órgão / massa corporal do animal) do coração, baço, tecido adiposo epididimal e fígado foram verificadas (**TAB. 2**). Observamos que os valores foram significativamente diferentes para o baço e para o tecido adiposo epididimal. Não foram observadas diferenças significativas na massa relativa do coração e fígado.

Tabela 2: Dados da massa relativa do coração, baço, tecido adiposo epididimal e fígado.

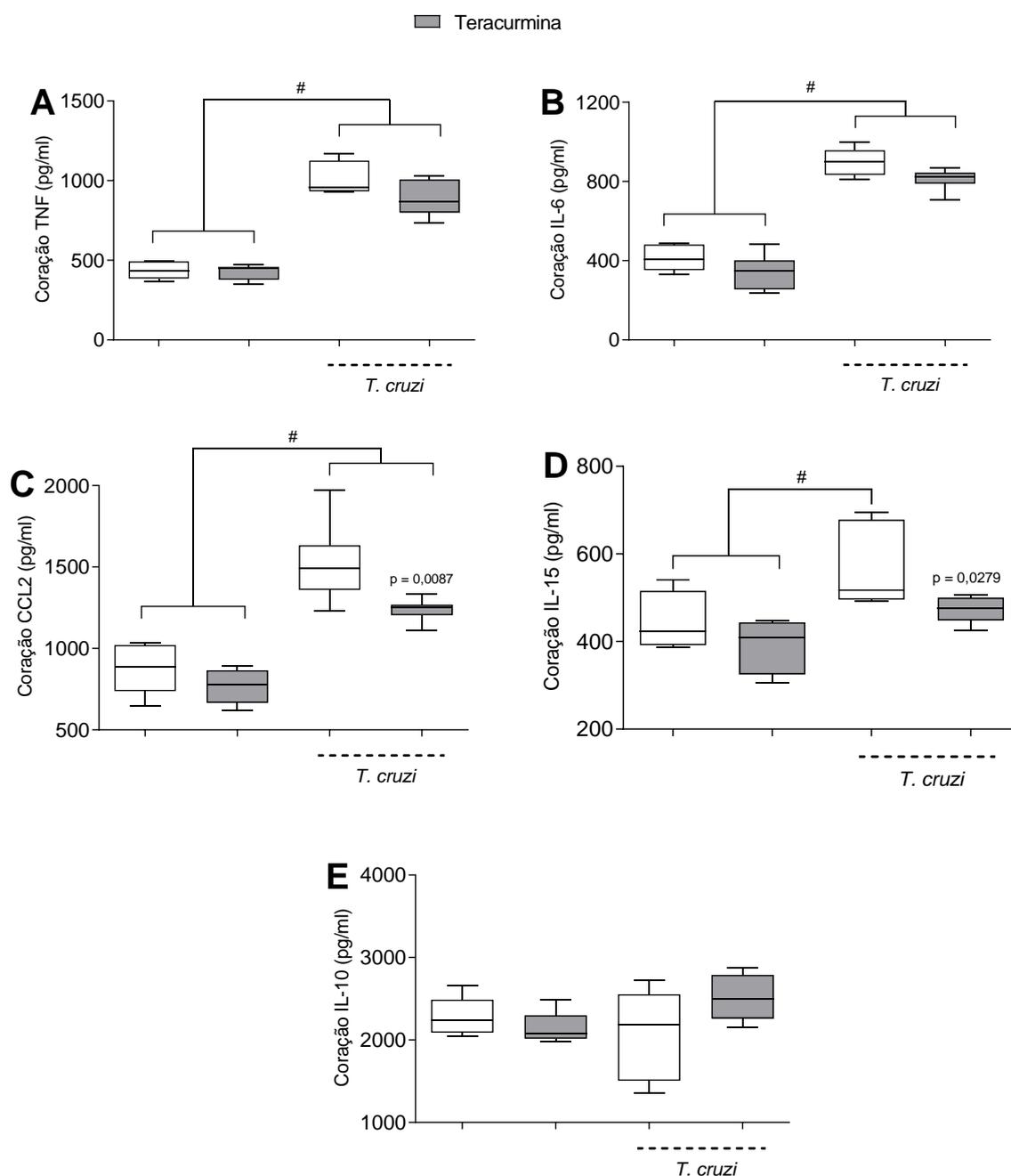
	Coração	Baço	Tec. Adip. Epididimal	Fígado
Sem infecção sem teracurmina	0,0075 ± 0,0003	0,0048 ± 0,0002	0,0108 ± 0,0012	0,0549 ± 0,0012
Teracurmina	0,0070 ± 0,0003	0,0042 ± 0,0002	0,0081 ± 0,0007	0,0542 ± 0,0016
<i>T. cruzi</i>	0,0064 ± 0,0004	0,0215 ± 0,0017 *	0,0077 ± 0,0023	0,0598 ± 0,0044
<i>T. cruzi</i> + teracurmina	0,0065 ± 0,0003	0,0188 ± 0,0016 *	0,0155 ± 0,0024 †	0,0643 ± 0,0035

* = Valores significativamente diferentes para o grupo sem infecção sem teracurmina e o grupo teracurmina ($p < 0,0001$); † = Valor significativamente diferente para o grupo *T. cruzi* e o grupo teracurmina ($p < 0,0001$). Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e o teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média ± EP. n=8

5.4 Marcadores inflamatórios no tecido cardíaco (TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10)

Foram avaliadas as concentrações de TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10 no tecido cardíaco dos camundongos, onde observamos menor concentração da CCL2 (**FIG. 10 C**) e da IL-15 (**FIG. 10 D**) para o grupo *T. cruzi* + teracurmina em comparação ao grupo *T. cruzi*. Em contrapartida, apesar de apresentarem elevação em decorrência da infecção pelo *T. cruzi*, a teracurmina não alterou os padrões de TNF (**FIG. 10 A**) e IL-6 (**FIG. 10 B**). Não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes grupos para a IL-10 (**FIG. 10 E**).

Figura 10: Concentração dos marcadores inflamatórios no tecido cardíaco entre os diferentes grupos experimentais.

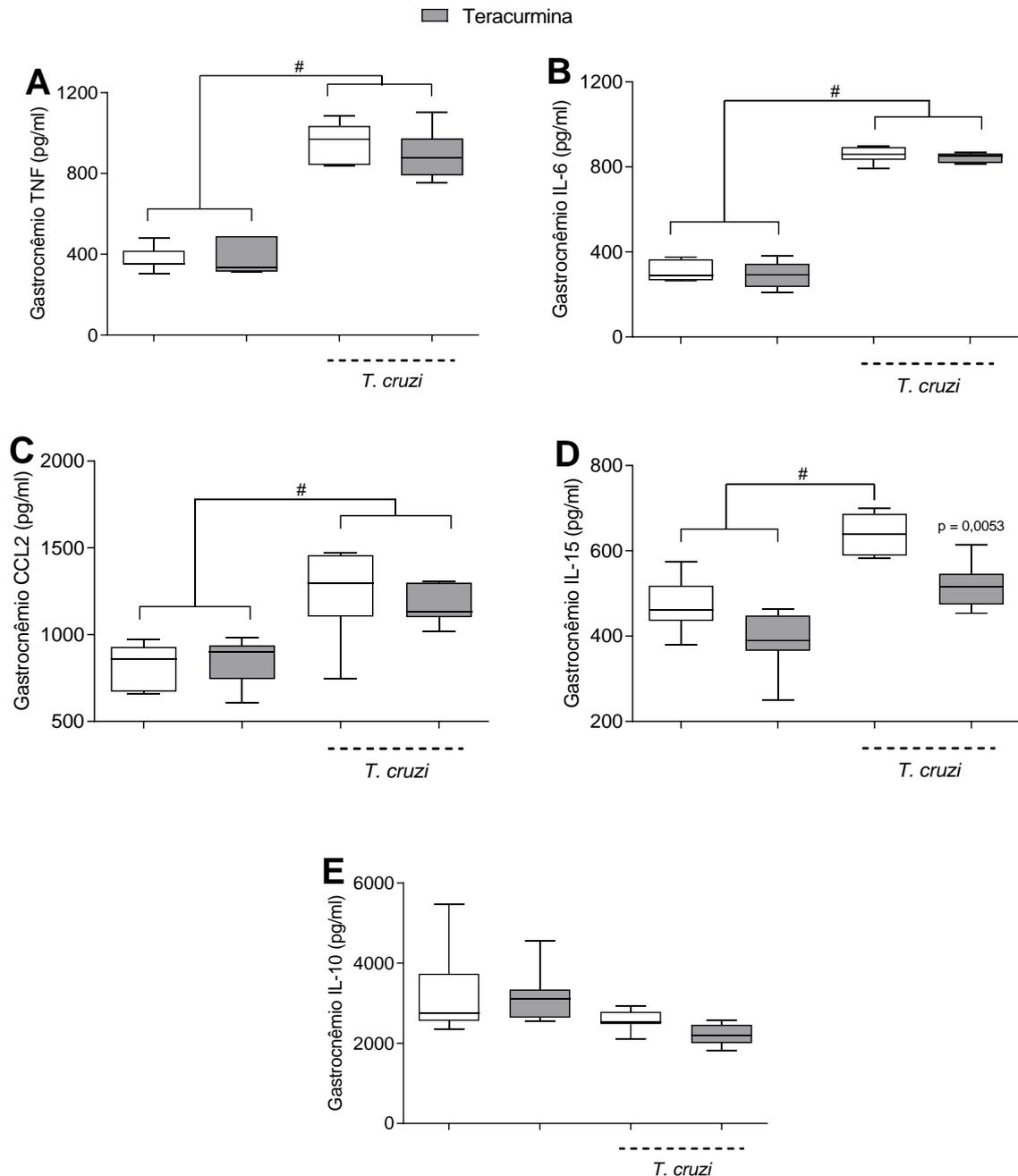


Foram observadas diferenças significativas na concentração de (C) CCL2 ($p = 0,0087$) e (D) IL-15 ($p = 0,0279$) quando comparados ao grupo *T. cruzi* ($n = 7$). #: $p < 0,05$. Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média \pm EP.

5.5 Marcadores inflamatórios no tecido esquelético (TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10)

No gastrocnêmio as concentrações de TNF, IL-6, CCL2, IL-15 e IL-10 também foram avaliadas. Observamos redução significativa na IL-15 quando a terapia com teracurmina foi administrada em animais infectados por *T. cruzi* (**FIG. 11 D**). Não houveram alterações significativas para o TNF (**FIG. 11 A**), IL-6 (**FIG. 11 B**) e CCL2 (**FIG. 11 C**), além de sua elevação associada à infecção pelo parasito. Não foi encontrada, também, diferença entre os grupos avaliados para a IL-10 (**FIG. 11 E**).

Figura 11: Concentração dos marcadores inflamatórios no tecido esquelético entre os diferentes grupos experimentais.

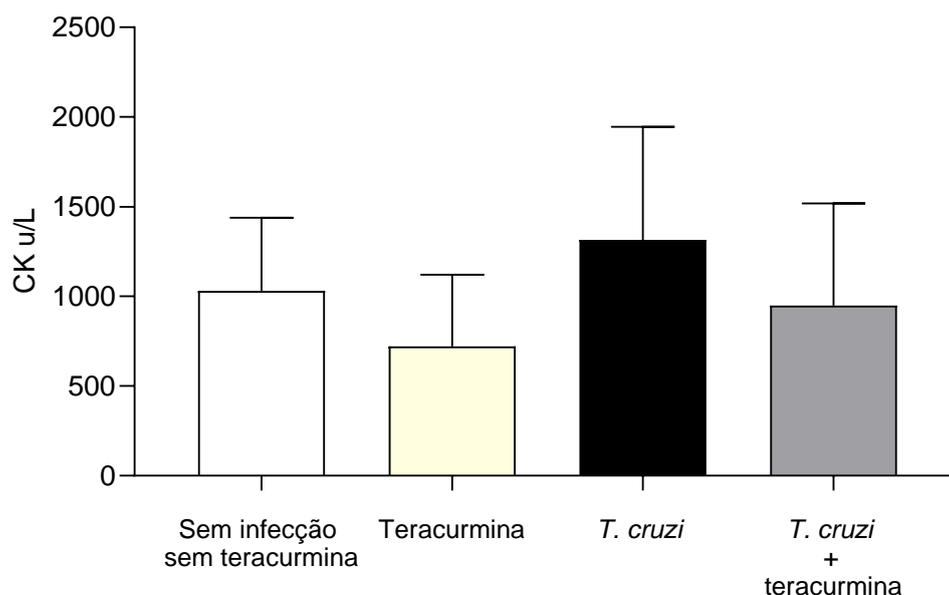


Foram observadas diferenças na concentração (D) IL-15 ($p = 0,0053$) nos animais do grupo *T. cruzi* + teracurmina quando comparados ao grupo *T. cruzi* ($n = 7$). #: $p < 0,05$. Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média \pm EP.

5.6 Quantificação de CK

A CK não apresentou alteração frente à infecção ou mesmo o regime terapêutico com teracurmina utilizando este protocolo com 30 dias de infecção em camundongos da linhagem Swiss.

Figura 12: Concentração plasmática de CK (μl) entre os diferentes grupos experimentais

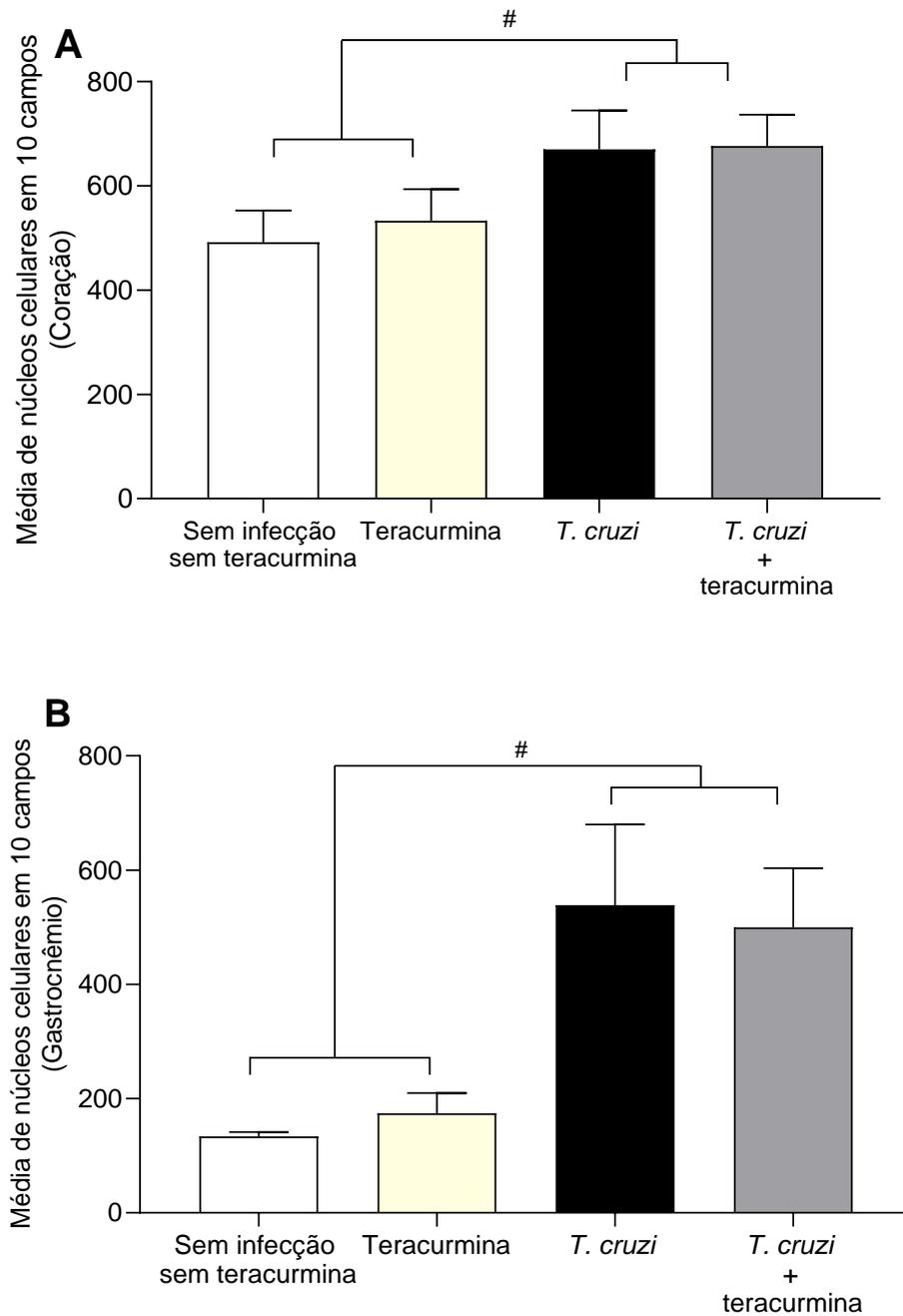


Não foram observadas diferenças entre os animais ($n=8$) pertencentes aos diferentes grupos experimentais para a análise de concentração plasmática da CK. Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média \pm EP.

5.7 Análise histológica

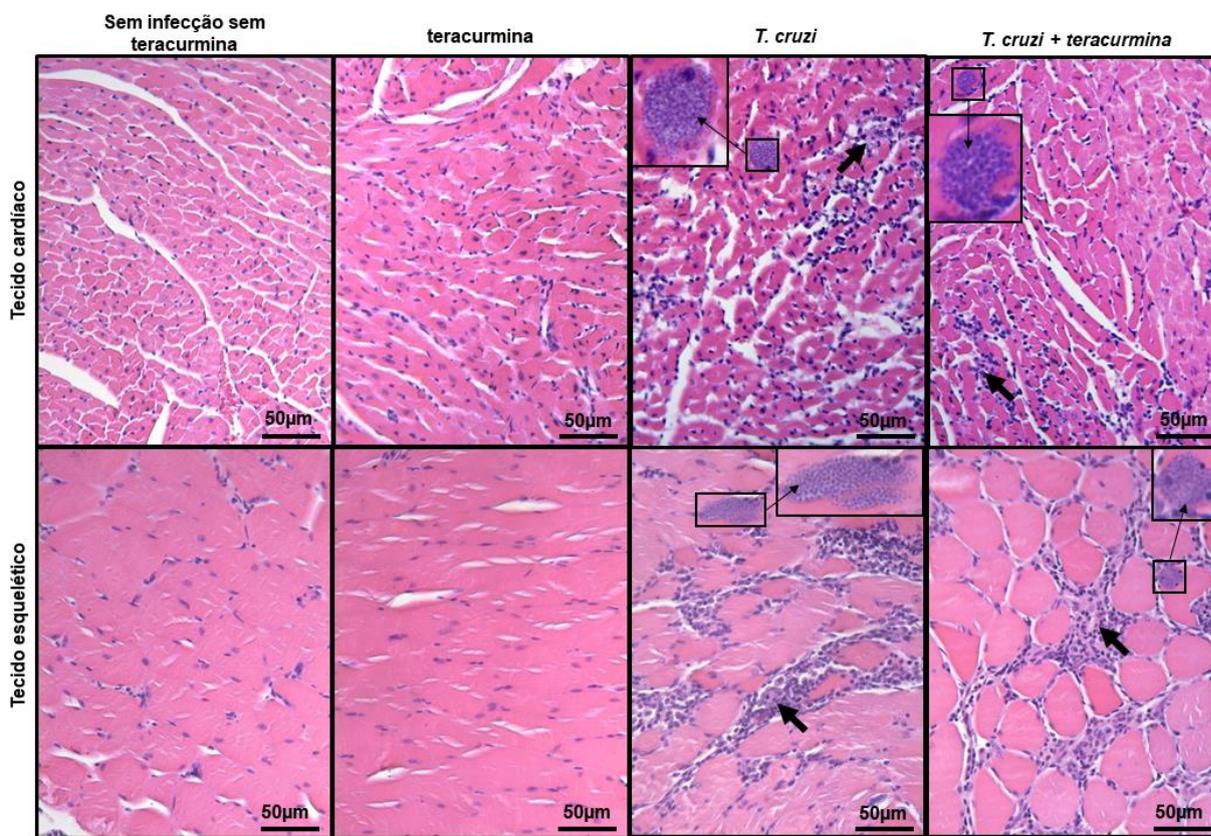
Ao avaliar os aspectos histológicos cardíacos e esqueléticos dos animais, observamos que a terapia com curcumina não gerou inflamação tecidual em animais sem infecção por *T. cruzi* e, também, não foi capaz de reduzir o padrão inflamatório gerado nos animais infectados pelo parasito (**FIG. 13 A e B**). Ressalta-se que nos grupos infectados foram observados ninhos de amastigotas, além de um intenso infiltrado inflamatório. Os grupos sem infecção apresentaram normalidade em sua composição celular em ambos os tecidos (**FIG. 14**).

Figura 13: Média de núcleos celulares entre os grupos experimentais.



Foram observadas diferenças significativas para contagem de núcleos celulares em animais (n=8) pertencentes aos grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina em relação aos animais sem infecção e sem teracurmina e com teracurmina (#: $p < 0,05$) tanto em (A) quanto em (B). Para análise de variância entre os grupos utilizou-se o teste *one-way* ANOVA e teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Dados expressos em média \pm EP.

Figura 14: Fotomicrografia de cortes histológicos dos tecidos musculares cardíaco e esquelético.



As figuras superiores indicam cortes histológicos do tecido cardíaco para os diferentes grupos, onde observa-se a presença de infiltrado inflamatório (seta) e ninhos de amastigotas (quadrado/retângulo) para os grupos *T. cruzi* e *T. cruzi* + teracurmina. Ainda para estes grupos, o comportamento foi semelhante no tecido esquelético, onde também foi observada a presença de infiltrado inflamatório e de ninhos de amastigotas. Não houve detecção de infiltrado inflamatório nos grupos sem infecção sem teracurmina e com teracurmina. Lâminas histológicas corada em hematoxilina e eosina (HE).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve como principais resultados o papel imunomodulador da teracurmina na infecção experimental aguda induzida por *T. cruzi*, sendo capaz de reduzir a parasitemia e a produção de IL-15 e de CCL2. Apesar disso, a teracurmina não reduziu o infiltrado inflamatório nos tecidos musculares infectados aos 30 dias de infecção.

A administração da teracurmina em camundongos correspondeu, em parte, às expectativas atribuídas aos alimentos com potenciais atividades preventivas às doenças e geradores de benefícios diretos/indiretos à saúde (ERKEN *et al.*, 2020; SUGIMOTO *et al.*, 2020). De forma geral, estes efeitos atribuídos à teracurmina encontram-se relacionados à sua composição bioativa, ou seja, à capacidade de

promover ações anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas e, estas, contribuírem para o tratamento ou o prognóstico de quadros inflamatórios (ADACHI *et al.*, 2020). Dentre os diferentes focos de aplicação da curcumina (AGGARWAL *et al.*, 2004; NOORAFSHAN e ASHKANI-ESFAHANI *et al.*, 2013), incluindo o contexto de doenças infecciosas e parasitárias (KOIDE *et al.*, 2002), a infecção pelo *T. cruzi* tornou-se um importante alvo de estudo para diante seus efeitos protetores, tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro* (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

Assumindo as distintas atividades farmacológicas designadas às dietas com compostos bioativos, a exemplo da curcumina/teracurmina, como atividade de regulação em linfócitos T, B, células dendríticas, células NK (ABDOLLAHI *et al.*, 2017), então seria plausível a inferência destas ações também no contexto imunoregulatório da inflamação induzida por *T. cruzi*. De forma sintética, a presença do parasito inicialmente promove a ativação de células macrofagocíticas e células NK e, conseqüentemente, inicia a produção de mediadores inflamatórios tais como o TNF, IFN- γ , IL-10, CX3CL1, CCL2, CCL3, CCL5, dentre outras. Estes mediadores ativarão outras células que favorecerão o recrutamento de novas populações fenotípicas para o sítio de infecção buscando eliminar o agente etiológico (TALVANI E TEIXEIRA, 2011). Neste contexto, respostas inflamatórias exacerbadas numa fase inicial da infecção seriam capazes de eliminar, em parte, o parasito, mas induziriam destruição de células infectadas e íntegras (adjacentes) nos tecidos de hospedeiros, o que culminaria nos eventos patológicos associados ao *T. cruzi*. A administração de teracurmina em fase aguda da infecção reduziu os níveis de parasitemia em animais infectados. Pelas ações imunomoduladoras designadas à curcumina/teracurmina, principalmente associada à supressão do fator de transcrição NK-kB (AGGARWAL, *et al.*, 2004), seria esperado menor produção de mediadores inflamatórios com perfil do tipo Th1 e, conseqüentemente, menor controle parasitário. Porém, nossos resultados foram, em parte, controversos e justificados pelo padrão animal utilizado como modelo de estudo (FADUS *et al.*, 2016). Na fase de crescimento logarítmico do parasito na circulação de camundongos da linhagem *Swiss*, a disponibilidade da teracurmina poderia ter inibido enzimas vitais para a sobrevivência e/ou replicação deste parasito. Mesmo reduzindo os parasitos circulantes, a administração de teracurmina (30mg/kg) não propiciaram maior sobrevivência aos animais. Por outro lado,

a administração diária de 100mg/kg de curcumina por 35 dias induziu sobrevida em 100% dos camundongos machos CD-1 infectados com a cepa Brasil (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Três aspectos merecem reflexão entre o presente estudo e os dados de Nagayothi e colaboradores: (i) o uso de curcumina e o uso da teracurmina, (ii) a dosagem 3 vezes maior administrada pelo grupo americano frente à dosagem proposta para os benefícios imunomoduladores da teracurmina (DAVIS *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2011) e, por fim, (iii) a variabilidade genética tanto dos camundongos quanto dos parasitos empregados em ambos os estudos. Em particular, sobre o contexto da variabilidade genética envolvendo hospedeiro mamífero e parasito (*T. cruzi*), nos últimos anos nosso grupo tem identificado comportamentos imunopatológicos distintos associados às diferentes cepas do *T. cruzi* (HORTA *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2021).

Da mesma forma, ao avaliar os níveis de concentração da CK plasmática, uma importante proteína inflamatória associada à infecção experimental por *T. cruzi*, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos neste estudo. Na mesma linha de análise do padrão genético parasito/hospedeiro, Penitente e colaboradores (2015) relataram que houve redução na concentração de CK após o tratamento com fármacos (Bz e enalapril) de camundongos C57BL/6 infectados com a cepa VL-10. A nossa hipótese era de que a terapia com teracurmina fosse capaz de interferir neste parâmetro. Porém, os padrões de resposta inflamatória e de resistência à infecção por *T. cruzi* são parcialmente distintos entre a linhagem *Swiss* e C57/BL6. Não se trata de qual é o melhor animal ou qual é a melhor população genética do parasito a ser empregada. Trata-se de ponderar criticamente que há modelos distintos de estudo e que os resultados obtidos precisam ser considerados e avaliados sempre à luz destas diferenças biológicas.

Por outro lado, a terapia com teracurmina reduziu a concentração da IL-15 e da CCL2, ambos mediadores inflamatórios diretamente envolvidos na resposta imune causada contra este parasito. A IL-15 é uma citocina imunoregulatória produzida, principalmente, por macrófagos, e participa da resposta contra patógenos intracelulares desempenhando papel fundamental no desenvolvimento, na homeostase e na função das células T (PATIDAR *et al.*, 2016). Durante a resposta inflamatória, ela atua no aumento da proliferação de células NK e TCD8+ de

memória, além de inibir a apoptose em vários tipos celulares (BUDAGIAN *et al.*, 2006). Na infecção por *T. cruzi*, a IL-15 parece estar envolvida no acometimento de lesões teciduais em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, devido ao seu papel de manutenção de células TCD8+ (FONSECA *et al.*, 2007). Já a CCL2, produzida por uma gama de células como linfócitos e fagócitos mononucleares, é uma quimiocina conhecida por atrair monócitos, linfócitos T e NK para o sítio da inflamação (CONTI & ROLLINS, 2003). A CCL2 é produzida abundantemente na presença do *T. cruzi* mediando o recrutamento leucocitário para os tecidos, e pode ser indicada como um marcador secundário de disfunção cardíaca em pacientes chagásicos (TALVANI *et al.*, 2004; TALVANI *et al.*, 2009). Neste contexto, a administração de teracurmina, mesmo não apresentando evidências protetivas aos tecidos cardíaco e esquelético no tempo de 30 pós-infecção (utilizando a linhagem *Swiss* de camundongos), parece ser benéfica ao quadro histopatológico pela redução destes marcadores inflamatórios, principalmente no tecido cardíaco. Inclusive, vale ressaltar que os efeitos desta redução da IL-15 e da CCL2 talvez fossem evidenciados nos tecidos musculares após os 30 dias estabelecidos para o presente estudo. Um estudo de Li e colaboradores (2008) relatou que a aplicação de 75mg/kg de curcumina em um modelo murino para hipertrofia cardíaca induziu proteção contra os efeitos deletérios derivados da hipertrofia cardíaca, inflamação e fibrose, por sua atuação em vias de sinalização dependentes da atividade da p300-HAT. Hernández e colaboradores (2021) relataram redução da intensidade do infiltrado inflamatório no miocárdio de camundongos C57/BL6 em fase crônica da infecção por *T. cruzi*, sob regime de tratamento com Bz + curcumina. Com isso, acreditamos que os efeitos protetores da teracurmina nos tecidos analisados neste estudo seriam evidenciados, de fato, em uma fase mais tardia da infecção, uma vez que a formação da resposta inflamatória ocorre nas primeiras horas e se intensifica nos dias consecutivos à entrada do parasito em mamíferos.

Dados os achados, ressaltamos que a teracurmina exhibe potencial para ser proposta como alvo de estudos voltados para o tratamento da infecção experimental por *T. cruzi*, considerando um tempo maior de infecção para observação de seus efeitos biológicos e, considerando também, o padrão genético dos parasitos e seus hospedeiros mamíferos.

7 CONCLUSÃO

A terapia com teracurmina reduziu a curva de parasitemia e as concentrações teciduais de IL-15 e CCL2 em camundongos *Swiss* infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, porém, sem reduzir a inflamação e o infiltrado inflamatório nos tecidos musculares cardíaco e esquelético (gastrocnêmio), possivelmente pelo período precoce da eutanásia dos animais - 30 dias pós infecção.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, E.; MOMTAZI, A. A.; JOHNSTON, T. P.; SAHEBKAR, A. Therapeutic effects of curcumin in inflammatory and immune-mediated diseases: A nature-made jack-of-all-trades? **J Cell Physiol**, 233, n. 2, p. 830-848, Feb 2018.
- ADACHI, S.; HAMOYA, T.; FUJII, G.; NARITA, T. *et al.* Theracurmin inhibits intestinal polyp development in Apc-mutant mice by inhibiting inflammation-related factors. **Cancer Sci**, 111, n. 4, p. 1367-1374, Apr 2020.
- AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; AGGARWAL, M. S.; SHISHODIA, S. Curcumin Derived from Turmeric (*Curcuma longa*): a Spice for All Seasons. **Modern Nutrition Science**. doi:10.1201/9780203506707.ch23
- ALAMDARI, N.; O'NEAL, P.; HASSELGREN, P. O. Curcumin and muscle wasting: a new role for an old drug? **Nutrition**, 25, n. 2, p. 125-129, Feb 2009.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, 4, n. 6, p. 807-818, 2007 Nov-Dec 2007.
- ANDERSEN M.L., D'ALMEIDA V., KO G.M., KAWAKAMI R., MARTINS P.J.F. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: **UNIFESP** – Universidade Federal de São Paulo; 2004. p. 45-70
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop**, 30, n. 1, p. 27-35, 1997 Jan-Feb 1997.
- ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop**. 39-46, 1985.
- ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res**, 27, n. 2, p. 471-475, Feb 1994.
- ARAUJO FURLAN, C. L.; TOSELLO BOARI, J.; RODRIGUEZ, C.; CANALE, F. P. *et al.* Limited Foxp3. **Front Immunol**, 9, p. 2555, 2018.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, 336, n. 15, p. 1066-1071, Apr 10 1997.
- BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, 373, n. 19, p. 1882, 11 2015.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Adv Parasitol**, 75, p. 19-47, 2011.

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

BUDAGIAN, V.; BULANOVA, E.; PAUS, R.; BULFONE-PAUS, S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. **Cytokine Growth Factor Rev**, 17, n. 4, p. 259-280, Aug 2006.

BUDNI, P.; PEDROSA, R. C.; GARLET, T. R.; DALMARCO, E. M. *et al.* Carvedilol attenuates oxidative stress in chronic chagasic cardiomyopathy. **Arq Bras Cardiol**, 98, n. 3, p. 218-224, Mar 2012.

CARDILLO, F.; DE PINHO, R. T.; ANTAS, P. R.; MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathog Dis**, 73, n. 9, p. ftv082, Dec 2015.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, 6, p. 659, 2015.

CARNEIRO, A. C. A.; COSTA, G. P.; FERREIRA, C. S.; RAMOS, I. P. R. *et al.* Combination therapy with benznidazole and doxycycline shows no additive effect to monotherapy with benznidazole in mice infected with the VL-10 strain of the *Trypanosoma cruzi*. **Int J Cardiol**, 299, p. 243-248, 01 15 2020.

CONTI, I.; ROLLINS, B. J. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. **Semin Cancer Biol**, 14, n. 3, p. 149-154, Jun 2004.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D.; ZIELINSKI, M. R. *et al.* Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 292, n. 6, p. R2168-2173, Jun 2007.

DE PAULA COSTA, G.; SILVA, R. R.; PEDROSA, M. C.; PINHO, V. *et al.* Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. **Parasite Immunol**, 32, n. 3, p. 202-208, Mar 2010.

DE SOUZA, D. M. S.; SILVA, M. C.; FARIAS, S. E. B.; MENEZES, A. P. J. *et al.* Diet Rich in Lard Promotes a Metabolic Environment Favorable to. **Front Cardiovasc Med**, 8, p. 667580, 2021.

DIAS, J.C.P., and COURA, J.R., org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora **FIOCRUZ**, 1997. 486 p. ISBN 85-85676-31-0.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 28(2):81-87, 2006.

DIAS, J. C. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104 Suppl 1, p. 41-45, Jul 2009.

ERKEN, N.; DOST GUNAY, F. S.; SOYSAL, P.; ISIK, A. T. The Effect of Theracurmin on Cognitive Function in an Older Patient with Chemobrain. **Clin Interv Aging**, 15, p. 691-693, 2020.

ESPER, L.; TALVANI, A.; PIMENTEL, P.; TEIXEIRA, M. M. *et al.* Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Infect Dis**, 28, n. 3, p. 246-252, Jun 2015.

FADUS, M. C.; LAU, C.; BIKHCHANDANI, J.; LYNCH, H. T. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **J Tradit Complement Med**, 7, n. 3, p. 339-346, Jul 2017.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 81, n. 5, p. 755-759, 1987.

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Med Clin (Barc)**, 148, n. 3, p. 125-131, Feb 09 2017.

FONSECA, S. G.; REIS, M. M.; COELHO, V.; NOGUEIRA, L. G. *et al.* Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Scand J Immunol**, 66, n. 2-3, p. 362-371, 2007 Aug-Sep 2007.

GIORGI, M. E.; LEDERKREMER, R. M. The Glycan Structure of. **Molecules**, 25, n. 17, Aug 27 2020.

HERNÁNDEZ, M.; WICZ, S.; CORRAL, R. S. Cardioprotective actions of curcumin on the pathogenic NFAT/COX-2/prostaglandin E. **Phytomedicine**, 23, n. 12, p. 1392-1400, Nov 15 2016.

HERNÁNDEZ, M.; WICZ, S.; PÉREZ CABALLERO, E.; SANTAMARÍA, M. H. *et al.* Dual chemotherapy with benznidazole at suboptimal dose plus curcumin nanoparticles mitigates *Trypanosoma cruzi*-elicited chronic cardiomyopathy. **Parasitol Int**, 81, p. 102248, Apr 2021.

HERNÁNDEZ, M.; WICZ, S.; SANTAMARÍA, M. H.; CORRAL, R. S. Curcumin exerts anti-inflammatory and vasoprotective effects through amelioration of NFAT-dependent endothelin-1 production in mice with acute Chagas cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 113, n. 9, p. e180171, Jul 16 2018.

HORTA, A. L.; FIGUEIREDO, V. P.; LEITE, A. L. J.; COSTA, G. P. *et al.* The β -blocker carvedilol and the benznidazole modulate the cardiac immune response in the acute infection induced by Colombian strain of the *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 113, n. 11, p. e180271, Oct 2018.

IMAI, K.; MAEDA, T.; SAYAMA, Y.; OSA, M. *et al.* Chronic Chagas disease with advanced cardiac complications in Japan: Case report and literature review. **Parasitol Int**, 64, n. 5, p. 240-242, Oct 2015.

JACKSON, Y.; VARCHER HERRERA, M.; GASCON, J. Economic crisis and increased immigrant mobility: new challenges in managing Chagas disease in Europe. **Bull World Health Organ**, 92, n. 10, p. 771-772, Oct 2014.

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

KANAI, M.; IMAIZUMI, A.; OTSUKA, Y.; SASAKI, H. *et al.* Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. **Cancer Chemother Pharmacol**, 69, n. 1, p. 65-70, Jan 2012.

KELANY, M. E.; HAKAMI, T. M.; OMAR, A. H. Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose-diet-fed rats: role of TNF- α , NF- κ B, and oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**, 95, n. 2, p. 140-150, Feb 2017.

KOIDE, T.; NOSE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y. *et al.* Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. **Biol Pharm Bull**, 25, n. 1, p. 131-133, Jan 2002.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules**, 24, n. 16, Aug 2019.

LEITE, A. L. J.; PAULA COSTA, G.; LOPES, L. R.; REIS MOTA, L. W. D. *et al.* The immunomodulatory effects of the Enalapril in combination with Benznidazole during acute and chronic phases of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, 174, p. 136-145, Oct 2017.

LESTARI, M. L.; INDRAYANTO, G. Curcumin. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol**, 39, p. 113-204, 2014.

LI, H. L.; LIU, C.; DE COUTO, G.; OUZOUNIAN, M. *et al.* Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy. **J Clin Invest**, 118, n. 3, p. 879-893, Mar 2008.

LOPRESTI, A. L. Curcumin for neuropsychiatric disorders: a review of in vitro, animal and human studies. **J Psychopharmacol**, 31, n. 3, p. 287-302, 03 2017.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. **Clin Cardiol**, 38, n. 9, p. 565-569, Sep 2015.

MARIANO, F. S.; GUTIERREZ, F. R.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M. *et al.* The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, 10, n. 7, p. 825-833, Jun 2008.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo)**, 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S. *et al.* Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, 373, n. 14, p. 1295-1306, 10 2015.

NAGAJYOTHI, F.; ZHAO, D.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Res**, 110, n. 6, p. 2491-2499, Jun 2012.

NAKAGAWA, Y.; MUKAI, S.; YAMADA, S.; MURATA, S. *et al.* The Efficacy and Safety of Highly-Bioavailable Curcumin for Treating Knee Osteoarthritis: A 6-Month Open-Labelled Prospective Study. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskeletal Disord**, 13, p. 1179544120948471, 2020.

NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A review of therapeutic effects of curcumin. **Curr Pharm Des**, 19, n. 11, p. 2032-2046, 2013.

NOVAES, R. D.; SARTINI, M. V.; RODRIGUES, J. P.; GONÇALVES, R. V. *et al.* Curcumin Enhances the Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Benznidazole-Based Chemotherapy in Acute Experimental Chagas Disease. **Antimicrob Agents Chemother**, 60, n. 6, p. 3355-3364, 06 2016.

NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, 62, n. 9, p. 767-776, Aug 27 2013.

NUNES, M. C.; GUIMARÃES JÚNIOR, M. H.; DIAMANTINO, A. C.; GELAPE, C. L. *et al.* Cardiac manifestations of parasitic diseases. **Heart**, 103, n. 9, p. 651-658, 05 2017.

OZAWA, H.; IMAIZUMI, A.; SUMI, Y.; HASHIMOTO, T. *et al.* Curcumin β -D-Glucuronide Plays an Important Role to Keep High Levels of Free-Form Curcumin in the Blood. **Biol Pharm Bull**, 40, n. 9, p. 1515-1524, 2017.

PATIDAR, M.; YADAV, N.; DALAI, S. K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev**, 31, p. 49-59, 10 2016.

PENITENTE, A. R.; LEITE, A. L.; DE PAULA COSTA, G.; SHRESTHA, D. *et al.* Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, 93, n. 5, p. 976-982, Nov 2015.

PESCOSOLIDO, N.; GIANNOTTI, R.; PLATEROTI, A. M.; PASCARELLA, A. *et al.* Curcumin: therapeutical potential in ophthalmology. **Planta Med**, 80, n. 4, p. 249-254, Mar 2014.

POVEDA, C.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N.; MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). **PLoS One**, 9, n. 3, p. e91154, 2014.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

QUEIROGA, T. B. D.; PEREIRA, N. S.; DA SILVA, D. D.; ANDRADE, C. M. *et al.* Virulence of. **Front Cell Infect Microbiol**, 11, p. 696719, 2021.

QURESHI, S.; SHAH, A. H.; AGEEL, A. M. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta Med**, 58, n. 2, p. 124-127, Apr 1992.

RASSI, A.; DIAS, J. C.; MARIN-NETO, J. A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, 95, n. 7, p. 524-534, Apr 2009.

RIBEIRO, A. L.; NUNES, M. P.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, M. O. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, 9, n. 10, p. 576-589, Oct 2012.

SALASSA, B. N.; ROMANO, P. S. Autophagy: A necessary process during the. **Virulence**, 10, n. 1, p. 460-469, 12 2019.

SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **J Pharm Sci**, 101, n. 3, p. 888-894, Mar 2012.

SANTANA, R. A. G.; GUERRA, M. G. V. B.; SOUSA, D. R.; COUCEIRO, K. *et al.* Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, 25, n. 1, p. 132-135, 01 2019.

SANTOS, E. G.; GONÇALVES, R. V.; SOUZA-SILVA, T. G.; MALDONADO, I. R. S. C. *et al.* Could pre-infection exercise training improve the efficacy of specific antiparasitic chemotherapy for Chagas disease? **Parasitology**, 146, n. 13, p. 1655-1664, 11 2019.

SASAKI, H.; SUNAGAWA, Y.; TAKAHASHI, K.; IMAIZUMI, A. *et al.* Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. **Biol Pharm Bull**, 34, n. 5, p. 660-665, 2011.

SCHEBELESKI-SOARES, C.; OCCHI-SOARES, R. C.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M.; DE OLIVEIRA DALÁLIO, M. M. *et al.* Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Appl Physiol Nutr Metab**, 34, n. 4, p. 659-665, Aug 2009.

SONGTHAMWAT, D.; KAJIHARA, K.; KIKUCHI, M.; UEMURA, H. *et al.* Structure and expression of three gp82 gene subfamilies of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, 56, n. 4, p. 273-280, Dec 2007.

SUETH-SANTIAGO, V.; MORAES, J. B.; SOBRAL ALVES, E. S.; VANNIER-SANTOS, M. A. *et al.* The Effectiveness of Natural Diarylheptanoids against *Trypanosoma cruzi*: Cytotoxicity, Ultrastructural Alterations and Molecular Modeling Studies. **PLoS One**, 11, n. 9, p. e0162926, 2016 2016.

SUGIMOTO, K.; IKEYA, K.; BAMBIA, S.; ANDOH, A. *et al.* Highly bioavailable curcumin derivative ameliorates Crohn's disease symptoms: A randomized, double-blind, multicenter study. **J Crohns Colitis**, May 2020.

SUNAGAWA, Y.; HIRANO, S.; KATANASAKA, Y.; MIYAZAKI, Y. *et al.* Colloidal submicron-particle curcumin exhibits high absorption efficiency—a double-blind, 3-way crossover study. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, 61, n. 1, p. 37-44, 2015.

TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; BARCELOS, L. A. S.; TEIXEIRA, M. M. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. **Parasitol Res**, 104, n. 5, p. 1141-1148, Apr 2009.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S.; GOMES, Y. M. *et al.* Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. **Clin Infect Dis**, 38, n. 7, p. 943-950, Apr 01 2004.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. **Adv Parasitol**, 76, p. 171-194, 2011. TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, 18, n. 6, p. 262-265, Jun 2002.

VALENTE, M.; CASTILLO-ACOSTA, V. M.; VIDAL, A. E.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. Overview of the role of kinetoplastid surface carbohydrates in infection and host cell invasion: prospects for therapeutic intervention. **Parasitology**, 146, n. 14, p. 1743-1754, 12 2019.

WHO. "Chagas disease (American trypanosomiasis)". Fact sheet N°340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. 2021

YEUNG, A. W. K.; HORBAŃCZUK, M.; TZVETKOV, N. T.; MOCAN, A. *et al.* Curcumin: Total-Scale Analysis of the Scientific Literature. **Molecules**, 24, n. 7, Apr 2019.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol**, 12, n. 2, p. 240-253, Mar 2012.

ANEXO



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da curcumina (Curcuma longa) sob a resposta inflamatória do músculo estriado cardíaco e esquelético em animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao treinamento físico aeróbico", protocolada sob o CEUA nº 4487110520 (00 000412), sob a responsabilidade de **André Talvani Pedrosa da Silva** e equipe; *Vitória Louise Teixeira e Silva*; *Kelerson Mauro de Castro Pinto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 10/07/2020.

We certify that the proposal "Effects of curcumin (long curcumin) on an inflammatory response of cardiac and skeletal muscle in animals infected with *Trypanosoma Cruzii* and use in aerobic physical training.", utilizing 120 Heterogenics mice (120 males), protocol number CEUA 4487110520 (00 000412), under the responsibility of **André Talvani Pedrosa da Silva** and team; *Vitória Louise Teixeira e Silva*; *Kelerson Mauro de Castro Pinto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/10/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2020](#) a [02/2021](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [7 a 9 semanas](#)

N: [120](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 40 g](#)

Local do experimento: O experimento será realizado nas instalações do CCA-UFOP em sala previamente equipada para realização dos tratamentos e análise de parasitemia. Eutanásia e necrópsia serão realizadas também no CCA-UFOP em sala específica para este fim.

Ouro Preto, 16 de julho de 2020

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

