



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GERSON ZANUSSO JUNIOR

Quimioterapia experimental com benzonidazol e óleos essenciais em
camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* II e IV

Maringá
2017

GERSON ZANUSSO JUNIOR

Quimioterapia experimental com benzonidazol e óleos essenciais em
camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* II e IV

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo.

Maringá
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Zanusso Junior, Gerson

Z34q Quimioterapia experimental com benzonidazol e
 óleos essenciais em camundongos inoculados com
 Trypanosoma cruzi II e IV/ Gerson Zanusso Junior. --
 Maringá, 2017.
 100 f. : il. , tab., figs.

Orientador: Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

1. Quimioterapia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Óleos
essenciais. 4. Benzonidazol. 5. Doença de Chagas. I.
Toledo, Max Jean de Ornelas, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. III. Título.

CDD 22. ED.616.9363

JLM-001690

FOLHA DE APROVAÇÃO

GERSON ZANUSSO JUNIOR

Quimioterapia experimental com benzonidazol e óleos essenciais em camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* II e IV

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA (Defesa)

Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr^a. Maria Terezinha Bahia
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Mário dos Anjos Neto Filho
Centro Universitário Ingá (UNINGÁ)

Prof. Dr^a. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr^a. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá

Aprovado em: 31/05/2017

Local da defesa: sala 112-B, bloco T20, campus da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Daniele e aos meus filhos Davi e Tomaz.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, oportunidade e esperança.

À minha amada esposa, Daniele Urbano dos Santos Zanusso, pelo companheirismo, dedicação e compreensão.

Aos meus filhos, Davi e Tomaz, pelo amor e alegrias que me fortalecem.

Aos meus familiares pelo apoio prestado.

Ao Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo, pela oportunidade em participar de seu grupo de pesquisa, orientação, conhecimento transmitido e competência.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia: Silvana M. de Araújo, Mônica Lúcia Gomes, Áurea Regina T. Pupulin e Ana Lúcia Falavigna-Guilherme pelo conhecimento, convívio, e ajuda direta ou indireta para o desenvolvimento desta tese.

Aos profissionais do laboratório de Parasitologia: Ely, João, Betânia, Sandra e Silvana pela grande colaboração, disposição em ajudar e amizade.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Miyoko Massago, Ana Paula Teston, Ana Abreu, Ricardo e Elaine, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelo ótimo convívio nestes anos e amizade.

Aos membros da banca de qualificação Prof^a Silvana M. de Araújo e Prof. Mário dos Anjos Neto Filho, pelas sugestões, correções e conhecimento científico.

Ao grupo de docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela colaboração na minha formação profissional.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo excelente atendimento e atenção.

EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

Quimioterapia experimental com benzonidazol e óleos essenciais em camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* II e IV.

RESUMO

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, e considerada uma doença negligenciada e globalizada. A alta morbimortalidade apresentada pelos pacientes ocorre em decorrência da inexistência de uma terapêutica medicamentosa eficaz, representada por apenas dois medicamentos: benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX). Frente a isso, o uso de óleos essenciais em pesquisas, seja *in vitro* quanto *in vivo*, tem demonstrado eficácia contra o *Trypanosoma cruzi*, sugerindo válida estratégia para encontrar uma nova substância tripanocida. Neste contexto, esta tese teve como objetivo avaliar a eficácia do benzonidazol (BZ) e dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), de gengibre (*Zingiber officinale*) e de cravo (*Syzygium aromaticum*) em camundongos experimentalmente infectados por via oral com *T. cruzi* II e IV assim como, a influência do tempo de tratamento com a droga de referência na infecção murina por *T. cruzi* IV. O artigo 1 avaliou a eficácia dos óleos essenciais de *C. citratus*, de *Z. officinale* e de *S. aromaticum* em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Foram utilizados os testes de exame de sangue a fresco (ESF), hemocultura (HC), cPCR em sangue e qPCR em tecido cardíaco e, foi considerado curado o animal que apresentou resultado negativo em todos os testes. A cepa Y foi considerada resistente ao benzonidazol, apresentando índice de cura (IC) médio de 4,2%. O tratamento com óleo essencial (OE) de *C. citratus*, de *Z. officinale* e de *S. aromaticum* alterou 4/5, 2/5 e 5/5 dos parâmetros derivados da curva de parasitemia repectivamente, quando comparados ao grupo de animais não tratados. O IC obtido com o uso do OE de *C. citratus*, de *Z. officinale* foi numericamente maior mas sem diferença estatística ao grupo tratado com BZ. O tratamento na dose de 100 mg/kg com OE de *S. aromaticum* proporcionou diferença estatística no IC comparados aos tratados com a droga padrão. O artigo 2 avaliou a eficácia do OE de *S. aromaticum*, isoladamente e em associação com benzonidazol em camundongos experimentalmente infectados por via oral com cepa AM14 de *T. cruzi* provenientes de vetores. Foram considerados curados animais com resultado negativo nos testes de ESF, HC e qPCR em sangue e tecido, após ciclo de imunossupressão. A infecção causada por tripomastigotas metacíclicas de insetos leva a um quadro infeccioso ainda mais intenso do que aquele ocasionado por tripomastigotas metacíclicas de cultura. A cepa AM14 foi considerada resistente ao tratamento com BZ (25%

de cura). O tratamento com OE de *S. aromaticum* proporcionou um IC de 12,5% já, a associação entre este óleo essencial e benzonidazol demonstrou resultado no IC (37,5%) numericamente superior do que o tratamento com a droga de referência. O artigo 3 avaliou o efeito do tempo de tratamento na eficácia do BZ em camundongos inoculados por via oral e intraperitoneal com uma cepa de *T. cruzi* IV. Camundongos inoculados foram tratados com BZ durante 20, 40 ou 60 dias consecutivos. Os índices de cura obtidos com os tempos de 20, 40 e 60 dias de tratamento foram, respectivamente, de 20,0% (1/5), 75,0% (3/4) e 100,0% (4/4) para os animais IP, e de 20,0% (1/5), 0,0% (0/5) e 100,0% (5/5) para os animais VO, sugerindo que a eficácia do BZ é tempo dependente na infecção experimental por *T. cruzi* IV.

Palavras-chave: quimioterapia, *Trypanosoma cruzi*, óleos essenciais, benzonidazol, doença de Chagas.

Experimental chemotherapy with benznidazole and essential oils in mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* II and IV

SUMMARY

Chagas disease (DC), or American trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered a neglected and globalized disease. The high morbi-mortality presented by the patients occurs due to the inexistence of an effective drug therapy, represented by only two drugs: benznidazole (BZ) and nifurtimox (NFX). Therefore, the use of essential oils in the research, both *in vitro* and *in vivo*, has demonstrated efficacy against *T. cruzi*, suggesting a valid strategy to find a new trypanocidal substance. In this context, this thesis aimed to evaluate the efficacy of benznidazole (BZ) and essential oils of lemon grass (*Cymbopogon citratus*), ginger (*Zingiber officinale*) and clove (*Syzygium aromaticum*) in mice experimentally infected by oral route with *T. cruzi* II and IV and the influence of treatment time with the reference drug on murine infection by *T. cruzi* IV. The article 1 evaluated the efficacy of essential oils of *C. citratus*, *Z. officinale* and *S. aromaticum* in mice infected with *T. cruzi* Y strain. Fresh blood examination (FBE), hemoculture (HC), cPCR in blood and qPCR in cardiac tissue were used, and the animal that presented negative results in all tests was considered cured. The Y strain was considered resistant to benznidazole, with a mean cure rate (CI) of 4.2%. The essential oil (OE) treatment of *C. citratus*, *Z. officinale* and *S. aromaticum* altered 4/5, 2/5 and 5/5 of the parameters derived from the parasitemia curve, respectively, when compared to the group of non-treated animals. The IC obtained with the OE of *C. citratus* and *Z. officinale* was numerically higher but without statistical difference to the group treated with BZ. Treatment with 100 mg / kg dose of *S. aromaticum* OE provided statistical difference in IC compared to those treated with the standard drug. Article 2 evaluated the efficacy of *S. aromaticum* OE alone and in combination with benznidazole in experimentally infected mice with *T. cruzi* AM14 strain obtained from the vectors. Animals with negative results in the tests of FBE, HC and qPCR in blood and tissue were evaluated after immunosuppression. Infection caused by metacyclic trypomastigotes of insects leads to more intense infectious condition than that caused by metacyclic trypomastigotes of culture. AM14 strain was considered resistant to treatment with BZ (25% cure). OE treatment of *S. aromaticum* provided an IC of 12.5%, already the association between this essential oil and benznidazole showed a numerically higher IC result (37.5%) than the treatment with the reference drug. Article 3 evaluated the effect of treatment time on the efficacy of BZ in mice

inoculated orally and intraperitoneally with a strain of *T. cruzi* IV. Inoculated mice were treated with BZ for 20, 40 or 60 consecutive days. The cure rates obtained with treatment times of 20, 40 and 60 days were, respectively, 20.0% (1/5), 75.0% (3/4) and 100.0% (4/4) For the IP animals, and 20.0% (1/5), 0.0% (0/5) and 100.0% (5/5) for VO animals, suggesting that the efficacy of BZ is time dependent on *T. cruzi* IV infection.

Keywords: chemotherapy, *Trypanosoma cruzi*, essential oils, benzonidazol, Chagas disease.

Tese elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (artigo I), disponível em:

<http://www.tjpr.org/ojm/pages.php?cmd=Guidelines>.

Acta tropica (artigo II), disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/acta-tropica/0001-706x/guide-for-authors>.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (artigo III), disponível em:

<http://aac.asm.org/site/misc/ifora.xhtml>.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	14
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO.....	14
1.2 VETORES.....	14
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	15
1.4 VIAS DE TRANSMISSÃO.....	16
1.5 VIRULÊNCIA DO <i>T. cruzi</i> NA INFECÇÃO ORAL.....	16
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	17
1.7 TRATAMENTO ETIOLÓGICO.....	18
1.8 JUSTIFICATIVA.....	19
1.9 OBJETIVOS.....	20
1.10 REFERÊNCIAS.....	20
2. CAPÍTULO II	29
2.1 <u>Artigo I</u> : Efficacy of different essential oils on mice experimentally infected by the oral route with <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2.2 <u>Artigo II</u> : Efficacy of essential oil of <i>Syzygium aromaticum</i> alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with <i>Trypanosoma cruzi</i> IV from outbreak of foodborne infection.....	50
2.3 <u>Artigo III</u> : <i>Trypanosoma cruzi</i> IV resistente ao benzonidazol: cura de camundongos infectados tem relação direta com o tempo do tratamento.....	75
3. CAPÍTULO III	99
3.1 CONCLUSÕES.....	99
3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	100

CAPÍTULO I

AGENTE ETIOLÓGICO

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado, agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, descoberta em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909).

Devido a sua grande variabilidade biológica e diversidade genética, as cepas de *T. cruzi* são classificadas em seis unidades de tipagem distintas (*Discrete Typing Units – DTU*), de *T. cruzi* I (TcI) a *T. cruzi* VI (TcVI) (ZINGALES et al., 2012), as quais podem diferir na distribuição geográfica e apresentar características biológicas distintas (BRENER, 1997), importantes na medicina como virulência, patogenicidade e resistência a droga (TOLEDO et al., 2002, 2003).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inclui passagem obrigatória por um hospedeiro vertebrado que pode pertencer a várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hemípteros, principalmente dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Durante seu ciclo heteroxênico, o parasito, apresenta diferentes estágios evolutivos durante seu ciclo biológico. Nos insetos vetores, há as formas esferomastigotas (ESF) ou de transição, epimastigotas (EP) ou formas proliferativas e a forma infectante denominada tripomastigota metacíclica (TM), que são eliminadas junto às fezes e urina do vetor. Durante ou após o repasto sanguíneo, os TM penetram no hospedeiro através da pele lesada ou mucosas, chegam ao interior das células onde ocorre a diferenciação em amastigotas (AMA), que por proliferação, formam ninhos. As amastigotas teciduais transformam-se em tripomastigotas antes da ruptura da célula parasitada. A liberação dos parasitos no meio extracelular permite a invasão de novas células do hospedeiro e as formas circulantes no sangue possibilitam a continuidade do ciclo ao serem ingeridas pelo vetor (BRENER & ANDRADE, 1979; TAMOWITZ et al., 1992; LANA & TAFURI, 2011).

VETORES

Os triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), popularmente conhecidos como barbeiros, são os vetores de *T. cruzi*. Estes insetos são subdivididas em 18 gêneros (JURBERG et al., 2014), destes, três apresentam importância epidemiológica: *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* (NOIREAU et al., 2005).

O gênero *Rhodnius* compreende 16 espécies (GALVÃO et al., 2003), estão associados as palmeiras da América Central e norte da América do Sul (GAUNT & MILES, 2000), o

Panstrongylus apresenta 14 espécies associadas às tocas de animais terrestres em toda a América (MARCILLA et al., 2002; GORLA & NOIREAU, 2010), e o *Triatoma* compreende 80 espécies, a maioria encontrada em habitats rochosos, porém muitas são arborícolas (GAUNT & MILES, 2000).

Das 148 espécies de triatomíneos presentes na natureza, aproximadamente 100 são consideradas vetores potenciais de *T. cruzi*, porém cinco dessas têm maior importância na epidemiologia da DC: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (GALVÃO et al., 2003; COSTA et al., 2006; COSTA & FELIX, 2007; JURBERG et al., 2009; ROSA et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013).

Os barbeiros podem apresentar ciclo doméstico ou silvestre (DIAS, 2009; GALVÃO, 2014), sendo que aqueles com habitat próximo ao homem têm maior importância epidemiológica devido a característica de hematofagia dos triatomíneos (LAVOIEPIERRE et al., 1959).

EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, atinge 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2016), ocasionando 56.000 novos casos e 12.000 mortes por ano (WHO, 2015). Na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica, destaca-se a prevalência na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%). Brasil e México apresentam prevalência de cerca de 1,0%, o que corresponde a quase a metade da população infectada nesta região geográfica (RASSI et al., 2010). Ainda, a DC apresentou aumento de sua prevalência em regiões não endêmicas, como Estados Unidos, com cerca de 300 mil pessoas infectadas, e Europa, com estimativa média de cerca de 90 mil casos da doença. Fato este que alterou as rotinas clínicas, incluindo a pesquisa laboratorial para detecção de pacientes infectados por *T. cruzi* nos bancos de sangue e para doação de órgãos (BERN et al., 2011; ANGHEBEN, et al., 2011).

A infecção no homem apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de parasitos na corrente sanguínea (PRATA, 1994) e por apresentar manifestações clínicas variáveis, podendo ocorrer doença febril inespecífica, edema, adenopatia, hepatoesplenomegalia e os sinais de porta de entrada (chagoma de inoculação e sinal de Romana). No entanto, geralmente os pacientes nesta fase são assintomáticos (BRENER, 1980; RASSI et al., 2010). Na fase crônica, a doença evolui para a forma indeterminada, quando o paciente permanece longos períodos sem manifestações clínicas, o que ocorre na maioria dos casos. A forma sintomática na fase crônica compromete

principalmente o funcionamento do coração e trato gastrointestinal (esôfago e cólon), caracterizando três formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (LANA & TAFURI, 2011; MAGALHÃES-SANTOS et al., 2014). Nesta fase ocorre a redução dos parasitos sanguíneos (JONES et al., 1993; VAGO et al., 1996; LAGES-SILVA et al., 2001) sendo difícil a detecção da infecção por pesquisa direta do parasito.

VIAS DE TRANSMISSÃO

Mesmo o parasito tendo seu ciclo heteroxênico, a transmissão do *T. cruzi*, além da forma vetorial, pode ocorrer por transfusão sanguínea (DIAS & BRENER, 1984), transmissão congênita (CHAGAS, 1911; BITTENCOURT, 1984; AZOGUE et al., 1985), acidente de laboratório (BRENER, 1984), transplante de órgãos e por via oral (CHOCAIR et al., 1984; MARCONDES et al., 1991; DIAS, 2006). E, apesar dos vetores triatomíneos serem considerados os principais responsáveis pela transmissão de *T. cruzi* em países endêmicos, o desenvolvimento socioeconômico, políticas públicas e uso do controle químico contribuíram para uma queda desse modo de transmissão.

No Brasil, entre 2000-2013, 69% (1.082/1.574) dos novos casos de DC notificados foram adquiridos por via oral (BRASIL, 2013), sendo considerada atualmente a principal via de transmissão da DC através da ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi* presente nas dejeções dos vetores ou na carne crua ou mal cozida (DIAS, 2006). Surto de DC aguda devido à ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos ou suas dejeções, como por exemplo, poupa de açaí e caldo de cana-de-açúcar, foram relatados em diferentes regiões do país, incluindo os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Amapá, Amazonas e Bahia (BRASIL, 2005; DIAS et al., 2008; VALENTE et al., 2009).

Esta via de aquisição da doença tem ocorrido nas diferentes regiões da América do Sul (NOYA et al., 2010; BENITEZ et al., 2013; RÍOS et al., 2011; SOTO et al., 2014; NOBREGA et al., 2009; SOUZA-LIMA et al., 2013) e, destaca-se a região Amazônica brasileira com 78,5% dos novos casos de DC, entre os anos de 1988 e 2005, ocorridos pela ingestão de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (PINTO et al., 2008), principalmente por cepas das DTU TcI e TcIV (MARCILI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2012).

VIRULÊNCIA DO *T. cruzi* NA INFECÇÃO ORAL

Tanto os tripomastigotas metacíclicos, presente no trato digestivo do vetor (MARCILI et al., 2009) e/ou no meio de cultura acelular, quanto os tripomastigotas sanguíneos, presentes na corrente sanguínea dos mamíferos, incluindo os humanos, são capazes de invadir os

tecidos dos hospedeiros vertebrados pela via oral, no entanto, a sua infectividade pode depender das formas infectantes presentes no inóculo.

A infecção oral por tripomastigotas metacíclicos, independente da cepa, é modulada por três principais glicoproteínas de membrana estágio-específicas: gp30, gp82 e gp90. As duas primeiras promovem a penetração da mucosa gástrica por meio da mobilização de íons cálcio, enquanto que o gp90 inibe esta invasão (YOSHIDA, 2008). Já a virulência dos tripomastigotas sanguíneos pode aumentar com passagens sucessivas em hospedeiros vertebrados (DEANE et al., 1963). Além das moléculas de superfície presentes nos TM, outros fatores podem influenciar a severidade da infecção pelo *T. cruzi* adquirida por via oral como o volume e a forma infectante presente no inóculo e a DTU do parasito (Teston et al. 2017),

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A escolha dos testes para diagnóstico da DC deve ser baseada na sua fase clínica. O exame de sangue à fresco, gota espessa, esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e método de Strout são baseados na identificação do parasito no sangue do paciente, sendo testes de diagnóstico laboratorial recomendados para a identificação do *T. cruzi* em indivíduos que apresentam a fase aguda da DC (RASSI, 1992; GOMES, 1996; LUQUETTI & RASSI, 2000). Dentre estes testes, os exames diretos são mais sensíveis que as camadas delgadas coradas (LUQUETTI & RASSI, 2000).

Por outro lado, como a fase crônica da doença é caracterizada por baixos níveis de parasitemia, é recomendado o uso de sorologia convencional e métodos parasitológicos indiretos. A pesquisa indireta do parasito pode ser realizada por xenodiagnóstico e hemocultura, no entanto, apresentam baixa sensibilidade (20 a 50%). Para sorologia há disponível no mercado kits com as técnicas de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e enzimaímmunoensaio (ELISA), as quais são utilizadas para detecção de anticorpos (IgM e IgG) contra antígenos do *T. cruzi* (LUZ et al., 1994; BRITTO et al., 2001; FERREIRA & ÁVILA, 2001; GADELHA et al., 2003; ZALUNTAY et al., 2004; DUFFY et al., 2009).

O uso de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), é de grande valia para o diagnóstico, pois trata-se de métodos mais modernos, específicos e sensíveis. Em casos de resultados inconclusivos persistentes, como sorologia duvidosa ou negativa, é recomendado a realização de testes com maior sensibilidade, como Western blot e PCR (MS, 2005). No entanto, a sensibilidade da PCR pode variar conforme as

características epidemiológicas da população em estudo, volume e número de amostras biológicas coletadas, método de extração do DNA assim como o protocolo utilizado para realização da PCR e a diversidade genética (DTU) de *T. cruzi* (SCHIJMAN et al., 2003). Outra vantagem da técnica de PCR é a possibilidade de se utilizar análises quantitativas para determinação de carga parasitária nos tecidos, principalmente no sangue periférico, auxiliando assim no acompanhamento da evolução da infecção e resposta do organismo durante a terapêutica (URBINA, 2001; MARIN-NETO et al., 2009).

TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

O tratamento da DC é baseado em apenas duas drogas, benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX), sendo a primeira o único medicamento disponível no Brasil. Estes medicamentos apresentam índices de cura parasitológica de 40 a 70% na infecção aguda pelo *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1992; CANÇADO, 2002; WHO, 2016), porém sua eficácia é baixa, 10 a 20% de cura, na fase crônica da doença (RASSI Jr et al., 2010; ZINGALES et al., 2014; RIVERO & ROMANO, 2016). Acredita-se que a diferença na eficácia dos medicamentos nas duas fases da infecção esteja relacionada às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis destes compostos, como a meia-vida relativamente curta e a limitada penetração tecidual (WORKMAN et al., 1984; URBINA & DOCAMPO, 2003). Estes fatores podem dificultar a ação dos fármacos sobre os parasitos que estão nos tecidos em lenta replicação, característica da fase crônica da DC (URBINA, 2009).

Ainda, devido à necessidade do tratamento etiológico prolongado, 30 a 60 dias, associado à elevada toxicidade referente aos medicamentos e às altas taxas de relatos de reações adversas apresentadas pelos pacientes (de até 40,0% dos indivíduos), é frequente a observação de desistência e interrupção da terapêutica pelos pacientes portadores de DC (JANNIN & VILLA, 2007; COURA, 2009; WHO, 2016).

Além disso, outro fator desfavorável ao tratamento etiológico atual é que a resposta ao tratamento com BZ pode variar de acordo com o genótipo de *T. cruzi* (TOLEDO et al., 2003), bem com a DTU do parasito (TESTON et al., 2013; MONTEIRO et al., 2013; GRUENDLING et al., 2015). Fato este que dificulta ainda mais o êxito do tratamento sobre infecções por *T. cruzi* em diferentes regiões geográficas.

Com isso, ressalta-se a importância da busca por novas terapias para DC, com menores efeitos colaterais e maior eficácia terapêutica nas diferentes fases da infecção (ALVES et al., 2012). Para isso, o tratamento combinado, o reposicionamento de fármacos e a pesquisa de doses mais efetivas podem ser opções na melhora do tratamento etiológico

(BUSTAMANTE & TARLETON, 2014) como as associações de fármacos já relatadas por alguns pesquisadores: BZ e cetoconazol (ARAÚJO et al., 2000), BZ e posaconazol (DINIZ et al., 2013), alopurinol e clomipramida (GOBBI et al., 2010) e alopurinol e BZ (MAZETTI et al., 2014).

Além disso, a utilização de produtos naturais, como os óleos essenciais, também pode ser uma estratégia válida para encontrar uma nova droga tripanocida. Estes óleos estão presentes nas plantas como produto natural que contêm compostos aromáticos voláteis e são originados do metabolismo secundário das plantas (SIMÕES et al., 2001). Várias são as atividades farmacológicas conhecidas de alguns óleos essenciais, seja na medicina popular ou em pesquisas científicas. Dentre estas, cita-se: ação carminativa, antiespasmódica, analgésica local, anti-inflamatória, antisséptica, inseticida, entre outras (SIMÕES et al., 2001; AGUIAR et al., 2008; ZANUSSO-JUNIOR et al., 2011; AFFONSO et al., 2012). Ainda, algumas publicações relatam a ação *in vitro* anti - *T. cruzi* de diversos óleos essenciais, contra as três formas evolutivas do parasito, em diferentes condições experimentais (SANTORO et al., 2007a; SANTORO et al., 2007b; IZUMI et al., 2011; SANTOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2011). Ressalta-se que as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à presença, em sua composição, de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanóides.

JUSTIFICATIVA

A DC é uma doença endêmica na América Latina, incluindo o Brasil, e o tratamento etiológico ainda não é satisfatório. Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2015, no Brasil, este tratamento baseia-se unicamente no uso do medicamento benznidazol ou, em caso de intolerância, no uso de nifurtimox, existente na América Central. Ambos causam reações adversas graves ao paciente e, ainda, como já foi demonstrado, a quimioterapia atual apresenta efetividade terapêutica discrepante, tanto em relação à fase da infecção e origem geográfica do paciente, e quando diferentes linhagens genéticas de *T. cruzi* estão envolvidas na infecção (TOLEDO et al., 2003; MURTA et al., 1998), ressaltando a importância da procura de novas drogas, assim como estabelecer critério de cura experimental utilizando técnicas modernas, .

Neste sentido, a avaliação do efeito *in vivo* de óleos essenciais pode ser um caminho para o encontro de substâncias efetivas nas diferentes DTU do parasita e menos tóxicas ao organismo humano. Alguns trabalhos já demonstraram ação de plantas e seus constituintes contra o *T. cruzi in vitro* (ALVES et al., 2012; ESCOBAR et al., 2010; SATALAYA et al.,

2009; BORGES et al., 2012; SANTOS et al., 2012) e *in vivo* (ROJAS et al., 2012). Sendo assim, este trabalho se justifica na busca de novas alternativas de tratamento para DC.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a eficácia *in vivo* dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), de *Zingiber officinale* (gengibre) e de *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) e benzonidazol em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* II e IV.

ESPECÍFICOS

- * Verificar a resposta do tratamento com os óleos essenciais das plantas citadas acima e benzonidazol em camundongos oralmente inoculados com a cepa Y de *T. cruzi* (TcII).
- * Relacionar os resultados obtidos com a composição química dos óleos essenciais.
- * Realizar o monitoramento da cura dos animais submetidos ao tratamento etiológico e imunossupressão com ciclofosfamida, por meio de técnicas parasitológicas (exame de sangue a fresco e hemocultura) e moleculares (PCR).
- * Comparar os resultados obtidos com os óleos essenciais com aqueles obtidos pelo tratamento com a droga padrão (benznidazol).
- * Avaliar o perfil da infecção oral causada por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa AM14 de *T. cruzi* (TcIV) provenientes do vetor e de meio de cultura acelular.
- * Verificar a eficácia do tratamento etiológico dessa infecção com benzonidazol e óleo essencial, isoladamente e em associação.
- * Avaliar a influência do tempo de tratamento na eficácia do benzonidazol na infecção murina com cepa de *T. cruzi* IV resistente.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**, v. 4, p. 146-161, 2012.
- AGUIAR, J.S.; COSTA, D.C.C.M.; NASCIMENTO, C.S.; SENA, R.F.X.K. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 15-22, 2008.
- ALVES, R.T.; REGASINI, L.O.; FUNARI, C.S.; YOUNG, M.C.M.; RIMOLDI, A.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA ROSA J.A. Trypanocidal

activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 528-534, 2012.

ANGHEBEN, A.; ANSEMI, M.; GOBBI, F.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G.; BUONFRATE, D.; TAIS, S.; TALAMO, M.; ZAVARISE, G.; STROHMEYER, M.; BARTALESI, F.; MANTELLA, A.; DI TOMMASO, M.; AIELLO, K.H.; VENERUSO, G.; GRAZIANI, G.; FERRARI, M.; SPREAFICO, I.; BONIFACIO, E.; GAIERA, G.; LANZAFAME, M.; MASCARELLO, M.; CANCRINI, G.; ALBAJAR-VINAS, P.; BISOFFI, Z.; BORTOLONI, A. Chagas disease in Italy: breaking na epidemiological silence. **Eurosurveillance**, v.16, p. 37, 2011.

ARAUJO, M.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.; BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 45, p. 819-824, 2000.

BENITEZ, J.A.; ARAUJO, B.; CONTRERAS, K.; RIVAS, M.; RAMÍREZ, P.; GUERRA, W.; CALDERON, N.; TERRE, C.A.; BARRERA, R.; RODRIGUES-MORALES, A.J. Urban outbreak of acute orally acquired Chagas disease in Táchira, Venezuela. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, p. 638-641, 2013.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M.J.; MONTGOMERY, S.P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 655-681, 2011.
BORGES, A.R.; AIRES, J.R.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; DE FIGUEIREDO, R.C. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123-128, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. Doença de Chagas Aguda relacionada à ingestão de calde de cana em Santa Catarina. Nota técnica. 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/240305_notas.pdf (Acessado em: 07/01/2017).

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **International Archives of Allergy Immunology**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 18, p. 247-292, 1980.

BRITTO, C.; SILVEIRA, C.; CARDOSO, M.A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNANDES, O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 823-826, 2001.

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

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

COSTA, J.; ARGOLLO, A.M.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 1385, p. 47-52, 2006.

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 87-90, 2007.

COURA, J.R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 549-554, 2009.

DEANE, M.P.; BRITO, T.; DEANE, L.M. Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolate from wild animals from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, 225-235, 1963.

DIAS, J.P.; BASTOS, C.; ARAUJO, E.; MASCARENHAS, A.V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E.; MENDONÇA, J.; ARAÚJO, R.F.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; ARAS, R. Acute Chagas Disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 296-300, 2008.

DIAS, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.370-375, 2006.

DIAS J.C.P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 41-45, 2009.

DINIZ, L.D.E.F.; URBINA, J.A.; DE ANDRADE, I.M. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, p.2367, 2013.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCHEC, J.; BURGOS, J.M.; DIEZ, M.; LEVIN, M.J.; FAVALORO, R.R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A.G. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. **PLoS Neglected of Tropical Disease**, v. 3, p. 419, 2009.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V., MARTINEZ J.R.; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 184-190, 2010.

FERREIRA, M.E.; CEBRIÁN-TORREJÓN, G.; CORRALES, A.S.; BILBAO, N.V.; ROLÓN, M.; GOMEZ, C.V.; LEBLANC, K.; YALUF, G.; SCHININI, T.S.; SERNA, E.; ARIAS, A.R.; POUPON, E.; FOURNET, A. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 986-993, 2011.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. Editora Guanabara Koogan, 2ª. ed., Rio de Janeiro, 2001.

GADELHA, A.A.M.; VERÇOSA, A.F.A.; LORENA, V.M.B.; NAKAZAWA, M.; CARVALHO, A.B.; SOUZA, W.V.; FERREIRA, A.G.P.; SILVA, E.D.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; GOMES, Y.M. Chagas disease diagnosis: comparative analysis of

recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test. **Vox Sanguinis**, v. 85, p. 165-170, 2003.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. *Zoologia: guias e manuais de identificação series*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 289-2014.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, 2003.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 557-565, 2000.

GOBBI, P.; BAEZ, A.L.O.; PRESTI, M.S.; FERNÁNDEZ, A.R.; ENDERS, J.E.; FRETES, R.G.E.A.S.; PAGLINI-OLIVA, P.A.; RIVAROLA, H.W. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1279-1283, 2010.

GOMES, Y.M. Diagnóstico Etiológico. In: Malta J. (Org). *Doença de Chagas*. São Paulo: Editora Savier, 119-132, 1996.

GONÇALVES, T.C.M.; TEVES-NEVES, S.C.; SANTOS-MALLET, J.R.; CARBAJAL-DE-LAFUENTE A.L.; LOPES C.M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 429-437, 2013.

GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. *American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research*. 1st edition. Burlington (VA): Elsevier Inc, 2010: 209-231.

GRUENDLING, A.P.; MASSAGO, M.; TESTON, A.P.M.; MONTEIRO, W.M.; KANESHIMA, E.N.; ARAÚJO, S.M.; GOMES, M.L.; BARBOSA, M.G.V.; TOLEDO, M.J.O. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, p. 1178-1189, 2015.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, **Natural Product Reports**, v. 28, p. 809-823, 2011.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 95-97, 2007.

JONES, M.E.; COLLEY, D.E.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAKJONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 348-357, 1993.

JURBERG, J.; ROCHA, D.D.S.; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Biota Neotropica**, v. 9, p. 123-128, 2009.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas In: NEVES, D.P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M. & VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 12 edição. São Paulo: Atheneu, p. 89-114, 2011.

LAGES-SILVA, E. Caracterização do *Trypanosoma cruzi* nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no megaeosôfago e na reativação. 2001. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências/Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

LAVOPIERRE, M.; DICKERSON, G.; GORDON, R. Studies on the Methods of Feeding of Blood-Sucking Arthropods. I.-The Manner in which Triatomine Bugs obtain their Blood-Meal, as observed in the Tissues of the Living Rodent, with some Remarks on the Effects of the Bite on Human Volunteers. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 53, p. 235-250, 1959.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M (org.), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 344-348, 2000.

LUZ, Z.M.P.; COUTINHO, M.G.; CANÇADO, J.R.; KRETTLI, A.U. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 143-148, 1994.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F. Transmissão oral da doença de Chagas: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 226-235, 2014.

MARIN-NETO, J.A.; RASSI, A. Jr; AVEZUM, A.Jr.; MATTOS, A.C.; RASSI, A.; MORILLO, C.; SOSA-ESTANI, S.; YUSUF, S. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that the tripanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-324, 2009.

MARCILI, A.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.; JUNQUEIRA, A.C.V.; DA SILVA, F.M.; PINTO, A.Y.; NAIFF, R.D.; CAMPANER, M.; COURA, J.R.; CAMARGO, E.P.; MILES, M.A.; TEIXEIRA, M.M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius robustus* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615-623, 2009.

MARCILLA, A.; BARGUES, M.D.; ABAD-FRANCH, F.; PANZERA, F.; CARCAVALLO, R.U.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; MILES, M.; DUJARDIN, J.P. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, p. 225-235, 2002.

MAZETTI AL. Benznidazol em combinação com alopurinol : aumento da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 12-4, 2005.

MONTEIRO, W.M.; MAGALHÃES, L.K.C.; DE SÁ, A.R.N.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.; BORGES, L.; PIRES, I.; GUERRA, J.A.; SILVEIRA, H.; BARBOSA, M.G.V. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. **PLOS One**, v. 7, p. e41284, 2012.

MONTEIRO, W.M.; TESTON, A.P.; GRUENDLING, A.P.; REIS, D.; GOMES, M.L.; ARAUJO, S.M.; BAHIA, M.T.; MAGALHÃES, L.K.C.; GUERRA, J.A.O.; SILVEIRA, H.; TOLEDO, M.J.O.; BARBOSA, M.G.V. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, p. e2069, 2013.

MURTA, S.M.F.; GAZZINELLI, R.T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 203-2014, 1998.

NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J. Oral transmission of chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 653-655, 2009.

NOIREAU, F.; CORTEZ, M.R.G.; MONTEIRO, F.A.; JANSEN, A.M.; TORRICO, F.; Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? **Trends Parasitology**, v. 21, p. 7-10, 2005.

NOYA, B.A.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUAREZ, J.A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1308-1315, 2010.

PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; FERREIRA JUNIOR, A.G.; COURA, J.R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 602-614, 2008.

PRATA, A. Chagas disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 8, p. 61-75, 1994.

RASSI, A. Clinical features. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M.E.; RASSI, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo: Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, p. 81-101, 1992.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RASSI, J.R.A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J.M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 275-291, 2012.

RÍOS, J.F.; ARBOLEDA, M.; MONTOYA, A.N.; ALARCÓN, E.P. Probable outbreak of oral transmission of Chagas disease in Turbo, Antioquia. **Biomedica**, v. 31, p. 185-195, 2011.

RIVERO, C.V.; ROMANO, O.S. Drugs for the Etiologic Treatment of Chagas Disease: Myths and Truths. **International Cardiovascular Forum Journal**, v. 7, p. 15-18, 2016.

ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* BRITTON (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 29, p. 61-68, 2012.

ROSA, J.A.; ROCHA, C.S.; GARDIM, S.; PINTO, M.C.; MENDONÇA, V.J.; FERREIRA FILHO, J.C.R.; CARVALHO, E.O.C.; CAMARGO, L.M.A.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, V. 3478, P. 62-76, 2012.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARAES, L.G.; FREIRE, J.M.; SOARES, M.J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, p. 1649-1656, 2007a.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; MENDONÇA, L.Z.; SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007b.

SANTOS, K.K.; MATIAS, E.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S.; BRAGA, M.F.; GUEDES, G.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; DE ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.; MENEZES, I.R.; COUTINHO, H.D. Anti *Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130-132, 2012.

SATALAYA, R.J.; ROJAS, U.J.; RÍOS, B.; GRANDEZ, M.; RENGIFO, E.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; GUIMENEZ, A.; FLORES, N. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. **Biofarbo**, v. 17, p. 23-31, 2009.

SCHILMAN, A.G.; ALTCHER, J.; BURGOS, J.M.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, M.J.; FREILIJ, H. A etiological treatment of congenital Chaga's disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 441-449, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SOTO, H.; TIBADUIZA, T.; MONTILLA, M.; TRIANA, O.; SUÁREZ, D.C.; TORRES, M. Investigation of vectors and reservoirs in an acute Chagas outbreak due to possible oral transmission in Aguachica, Cesar, Colombia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 746-756, 2014.

SOUZA-LIMA, R.C.; BARBOSA, M.G.V.; COURA, J.R.; ARCANJO, A.R.L.; NASCIMENTO, A.S.; FERREIRA, J.M.B.B. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 510-514, 2013.

TAMOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, p. 409-419, 1992.

TESTON, A.P.; MONTEIRO, W.M.; REIS, D.; BOSSOLONI, G.D.; GOMES, M.L.; ARAUJO, S.M.; BAHIA, M.T.; BARBOSA, M.G.V.; TOLEDO, M.J.O. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, p. 85-95, 2012.

TOLEDO, M.J.O.; BAHIA, M.T.; CARNEIRO, C.M.; MARTINS-FILHO, A.O.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W.L.; DE LANA, M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 223-230, 2003.

URBINA, J.A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 733-741, 2001.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, 2009.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 495-501, 2003.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; REIS, D.A.; OLIVEIRA, R.C. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas disease. **Lancet**, v. 348, p. 891-892, 1996.

VALENTE, S.A.; DA COSTA VALENTE, V.; DAS NEVES PINTO, A.Y.; DE JESUS BARBOSA CESAR, M.; DOS SANTOS, M.P.; MIRANDA, C.O.; CUERVO, P.; FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 291-297, 2009.

WORKMAN, P.; WHITE, R. A.; WALTON, M. I.; OWEN, L. N.; TWENTYMAN, P. R. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. **British Journal of Cancer**, v. 50, p. 291-303, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis) 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (Acesso em: 23/04/2016).

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v. 57, p. 105-109, 2008.

ZANUSSO-JUNIOR, G.; MELO, J.O.; ROMERO, A.L.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Evaluation of the anti-inflammatory activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) in rodents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 17-23, 2011.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; MORAES, C.B.; LUQUETTI, A.; GUHL, F.; SCHIJMAN, A.G.; RIBEIRO, I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 828-833, 2014.

ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LÓPEZ, B.; SÁNCHEZ, G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 253-257, 2004.

CAPÍTULO II

Artigo I:

Efficacy of different essential oils on mice experimentally infected by the oral route with *Trypanosoma cruzi*

**Efficacy of different essential oils on mice experimentally infected by the oral route with
*Trypanosoma cruzi***

Gerson Zanusso Junior^{1*}, Miyoko Massago¹, Ana Paula M Teston¹, Alexandre T Morey²,
Max Jean O Toledo¹.

¹Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá (UEM), Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

²Department of Microbiology, State University of Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, s/n, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

*** Corresponding Author.**

Gerson Zanusso Junior

State University of Maringá (UEM)

Avenida Colombo 5790, Jardim Universitário,

87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Tel.: (55 44) 3011 8991; Fax: (55 44) 3011 4860;

E-mail: gersonjr17@hotmail.com

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the efficacy of *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* and *Syzygium aromaticum* essential oils (EOs) in mice orally infected with *T. cruzi*.

Methods: Three experiments were conducted, each with 48 Swiss mice. Animals were inoculated with 2×10^6 metacyclic trypomastigotes of *T. Cruzi* Y-strain and allocated into the following groups (N=12): 1) Untreated control; 2) treated with benznidazole (BZ); 3) treated with EO 100 mg/kg; And 4) treated with EO 250 mg/kg. The groups were evaluated by fresh blood test, blood culture, conventional PCR, real-time PCR and cure rate (CR).

Results: All animals were effectively infected with *T. cruzi*. Treatment with *C. citratus* and *Z. officinale* EOs altered some of the parameters derived from the parasitemia curve, but CRs did not differ from that of BZ. *S. aromaticum* EO, however, not only altered all parameters derived from the parasitemia curve, similarly to BZ, but CR with EO 100 mg/kg was also significantly higher than BZ.

Conclusion: The results indicate that the essential oils tested, especially *S. aromaticum*, either alone or in association, should be further investigated in the treatment of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Essential oils; Chemotherapy; Mice.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the protozoan parasite responsible for Chagas disease, which infects about 6-7 million people worldwide. Once exclusive to the Americas, where it reached endemic status in 21 Latin American countries, Chagas disease is currently considered a globalized disease [1].

Triatomines are the main vectors for the transmission of Chagas disease in endemic countries. However, in Brazil, most of the new cases (71%) have been acquired by the oral route, especially in regions considered non-endemic, characterizing a new epidemiological scenario [1,2].

Although it is the parasitic disease with the greatest impact in the Americas, it is often untreated due to the shortcomings of currently available therapies [3]. Based on only two drugs, benznidazole and nifurtimox, etiological treatment is far from effective because it requires prolonged time, and drugs are poorly tolerated, highly toxic, with varying efficacy depending on the phase of infection [1,4,5,6]. .

Thus, new drugs for the treatment of Chagas disease, with little or no side effects, are urgently required. Several natural products from different structural classes have been shown to be effective against *T. cruzi* [7]. Different essential oils (EOs) have already been tested *in vitro* against *T. cruzi*, which demonstrated biological activity. Among tested Eos, the lemongrass (*Cymbopogon citratus*) EO has been shown to be effective against the amastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi*, while the clove (*Syzygium aromaticum*) EO inhibited the growth of epimastigote forms and blood trypomastigotes [8,9,10].

These promising results warrant new studies conducted *in vivo* to better ascertain the efficacy of EOs in the treatment of Chagas disease. Therefore, the objective of this animal study was to evaluate the efficacy of *C. citratus*, *Z. officinale* and *S. aromaticum* EOs in mice experimentally infected *T. cruzi*.

METHODS

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Experimentation of the State University of Maringá (UEM), Brazil (CEUA/UEM, resolution N° 023/2014) and conducted in accordance with the guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Parasites, animals and infection

T. cruzi Y-strain, obtained from the strain bank at the Chagas Disease Laboratory (UEM), was used in the present study. Three groups of 48 female Swiss mice, aged 21 to 28 days and weighing between 18 and 20 grams, were used. The animals were kept in micro-acclimated cages (Alesco[®], dimensions of 20 x 32 x 21 cm), with a 12 h light-dark cycle, and received rodent food and water *ad libitum*. Each animal was inoculated by gavage with 2×10^6 metacyclic trypomastigotes obtained from the acellular culture suspended in 1 ml of LIT medium, according to the protocol by Dias et al. [11] and modified by Teston et al. [12].

Experimental groups, treatment schedules and essential oils

After weighing, the animals were separated into four groups of 12 animals each, so that mean weight of all four groups was similar. The following groups were constituted for each experiment: 1) Untreated control (UC); 2) treated with benznidazole 100 mg/kg (TBZ); 3) treated with one of the experimental EOs 100 mg/kg (TEO100); And 4) treated with one of the experimental EOs 250 mg/kg (TEO250). Treatments were initiated on the 5th day after inoculation (d.a.i) and both BZ and EOs were administered by gavage in a single daily dose for 20 consecutive days. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*; lot 0664), ginger (*Zingiber officinale*; lot 09419), and clove (*Syzygium aromaticum*; lot 09464) EOs were obtained by hydrodistillation of plant material (Quinari Fragrâncias e Cosméticos LTDA, Brazil) and

analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS; Shimadzu QP 2000) under the following conditions: DB-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m); Helium (1 ml/min); Injector temperature (240°C) and detector temperature (230°C) under the following operating conditions: column temperature, 50-160°C, at 3°C/min; Volume injected of 1 μ l (2 mg of the essential oil in 1 ml of ethyl acetate). The identification of the compounds present in the EOs was performed by comparison with the CG-MS (National Institute of Standards and Technology - Nist.62 Library) and also the Kovats indexes.

Fresh blood test (FBT)

Parasitemia was evaluated daily in blood collected from the caudal vein of each animal from 3rd d.a.i. according to Brener [13], until negativation for three consecutive days. FBT was performed to confirm infection, obtain the parasitemia curve and the percentage of animals FBT positive (%FBT+). After the end of treatment, parasitemia was also evaluated on alternate days for one week. The following parameters, derived from the parasitemia curve, were determined: mean patent period (PP), mean of the periods when parasitemia was detected in each mouse; maximum parasitemia peak (Pmax), calculated from the parasitemia peak detected in each mouse in the group; maximum peak day (Dpmax), mean of days each mouse had Pmax detected; total parasitemia (TP), mean of the sum of daily parasitemia of each animal throughout the experiment; and the area under the parasitemia curve (AUC).

Blood culture (BC)

BC was performed in LIT medium 30 days after the end of treatment, according to Filardi and Brener [14]. Blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus of treated (TEO100, TEO250 and TBZ) animals and untreated controls (UC) to obtain the percentage of animals blood culture positive (%BC+).

Conventional polymerase chain reaction (cPCR)

cPCR was also performed at 30 days post treatment, when 200 µl of blood was added to an eppendorf tube containing 400 µl of guanidine 6.0 M/EDTA 0.2 M solution, according to Miyamoto et al. [15]. Primers 121 and 122 (5'AGATAATGCATGA-3' and 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), which amplify the 330 bp fragment of *T. cruzi* kinetoplast DNA (kDNA) minicircles, were used. Samples that generated these products were considered positive and were observed by electrophoresis in 4.5% polyacrylamide gel and silver staining. Based on these results, the percentage of cPCR positive (%cPCR+) mice was obtained.

Qualitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

At 115 d.a.i. the cardiac tissue of three animals from each experimental group was collected *in totum*. Samples (30 mg/animal) were extracted using the chloroform-isopropanol method [16]. The obtained DNA was analyzed using SYBR green qPCR SuperMix UDG/ROX Platinum reagent (Invitrogen, USA) and Rotor-Gene thermocycling equipment (Qiagen) [17]. PCR was performed using 100 ng of whole genomic DNA (gDNA) and the primers TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3') and TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') [18]. Tissue DNA from healthy and Y-strain infected mice were used as negative and positive controls of the extraction. The mix without the genomic DNA was used as negative control of the amplification.

Infectivity and Mortality

Infectivity rate (%INF) was calculated based on the number of animals positive for infection in at least one of the tests performed (FBT, BC or cPCR). Animal survival was registered daily, and cumulative mortality rate (%MOR) was calculated for each group.

Treatment effectiveness

To evaluate the effectiveness of the different treatments, cure rates (CRs) were obtained from animals treated with the reference drug (BZ) and each of the three EOs. Animals presenting negative results in all the tests were considered "cured". CRs were obtained by dividing the number of cured animals by the total number of animals treated X 100.

Statistical analyzes

The data were distributed in frequency tables and described in terms of percentages or means. Statistical analyzes were performed using the software Bioestat 5.0 (Belém, Pará, Brazil), with the significance level set at 5%. Proportions were compared using the G or chi-square test. Means were compared using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test. AUC was calculated using the GraphPad Prism 5.0 program.

RESULTS

Infectivity rate (%INF) was 100% in all experimental groups, i.e. all animals inoculated with *T. cruzi* Y-strain became infected. Cumulative mortality rate (%MOR) was 0%, i.e. no animal from any of the groups died during the experiments.

Test 1: Lemongrass EO

The chromatographic analysis showed that lemongrass EO presented in its composition geranial (α -citral) and neral (β -citral) as its main constituents, with 46.8% and 33.5%, respectively. The highest parasitemia levels were observed in UC, followed by TLEO100, TLEO250, and TBZ. Treatment with the reference drug BZ was able to promote parasitemia negativity in most animals immediately after the first day of treatment, and in all animals after the third day of treatment. Groups treated with TLEO100 and TLEO250 maintained

parasitemia positivity for almost the entire treatment period. All animals presented negative FBT after the end of treatments (Figure 1).

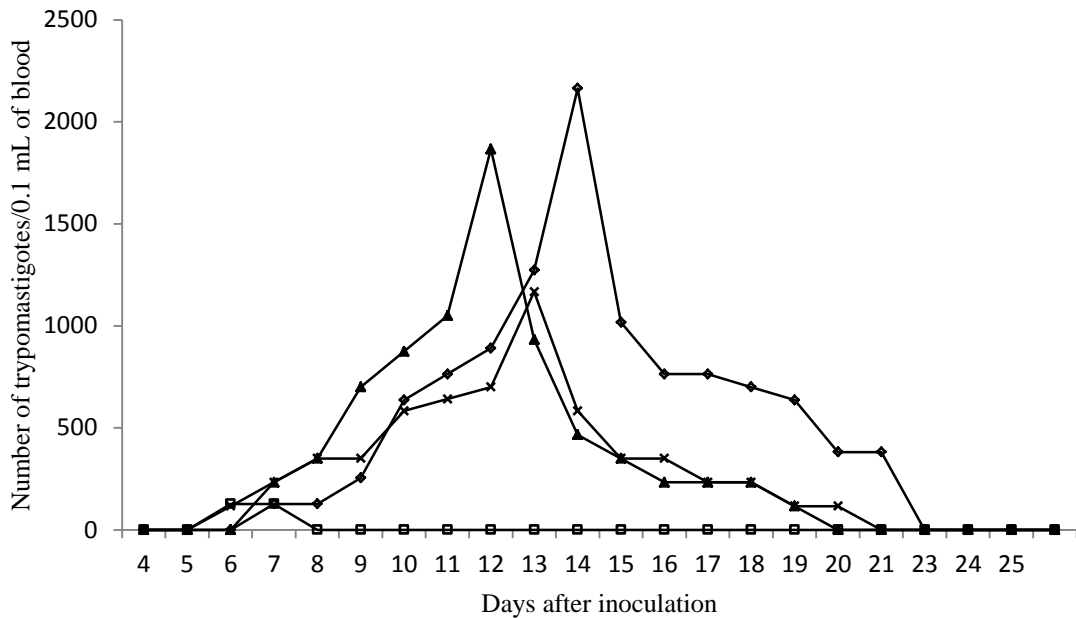


Figure 1. Experiment 1 (treatment started on the 5th day after inoculation). Mean parasitemia curve of mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y strain - TcII) treated with benznidazole 100 mg/kg/day (TBZ; □), *Cymbopogon citratus* essential oil at the doses of 100 mg/kg/day (TLEO100; ▲) and 250 mg/kg/day (TLEO250; ×), during 20 consecutive days, and untreated controls (UC; ◇)

All parameters derived from the parasitemia curve, except for Dpmax, presented statistically significant differences among groups ($p < 0.0001$). TBZ presented the lowest values for all parameters ($p \leq 0.01$). When compared to UC, animals treated with TLEO100 and TLEO250 presented a significant reduction in PP ($p < 0.01$), Pmax ($p < 0.01$), and AUC ($p = 0.0178$). A significant reduction in PT ($p \leq 0.0102$) was also observed but only in those animals treated with TLEO250 (Table 1). The %BC+ varied among groups ($p < 0.03$). TBZ presented the highest %HC+, reaching statistical significance when compared with TLEO100 and TLEO250 ($p = 0.03$). cPCR confirmed the infection in 4 animals in the UC group, which had previously been FBT+ but were BC-. The %cPCR+ also varied among groups ($p = 0.03$), being smallest in the TBZ group. In TLEO250 group, cPCR was observed in 6/7 animals (85.7%). Tissue analysis performed on cardiac samples from three animals of each group,

showed %qPCR+ only in one mouse in the TLEO250 group, which had already been shown to be cPCR+. CRs obtained from animals treated with lemongrass EO did not significantly differ from animals treated with BZ. These results demonstrated that mice orally inoculated with *T. cruzi* Y-strain responded poorly to treatment with both lemongrass EO (in both dosages) and the reference drug (BZ) (Table 1).

Table 1. Statistical comparisons of parasitological and molecular parameters, and cure rates in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y-strain - TcII), treated with benznidazole (TBZ), lemongrass essential oil 100 mg/kg/day (TLEO100), lemongrass essential oil 250 mg/kg/day - 20X (TLEO250), and untreated controls (UC).

Parameters	UC	TBZ	TLEO100	TLEO250	<i>p</i> *
PP	9.8 ± 1.3	0.2 ± 0.4	6.8 ± 2.9	6.1 ± 2.6	<0.0001
Pmax	3181.8 ± 1545.2	254.6 ± 540.0	2450.0 ± 2541.5	1750.0 ± 633.2	<0.0001
Dpmax	14.3 ± 2.3	6.5 ± 0.5	11.6 ± 3.5	13.0 ± 0.6	NS
TP	9672.7 ± 4577.6	233.3 ± 544.9	6883.3 ± 5010.8	5133.3 ± 1823.7	<0.0001
AUC	11136.3 ± 5533.6	233.3 ± 544.9	7991.7 ± 5393.0	5950.0 ± 2203.5	<0.0001
%BC+	50.0 (4/8)	75.0 (6/8)	37.5 (3/8)	22.2 (2/9)	0.03
%cPCR+	100.0 (4/4)	0.0 (0/1)	20.0 (1/5)	85.7 (6/7)	0.02
%qPCR+	0.0 (0/3)	0.0 (0/3)	0.0 (0/3)	33.3 (1/3)	NS
Cure rate	-	12.5 (1/8)	50.0 (4/8)	11.1 (1/9)	NS

PP: patent period (in days); *Pmax*: parasitemia peak (number of trypomastigotes/0.1 ml of blood); *Dpmax* maximum peak day; *TP*: total parasitemia; *AUC*: area under the curve; *%BC+*: percentage of animals with positive blood culture; *%cPCR+*: percentage of animals cPCR positive; *%qPCR+*: percentage of animals with qPCR positive; *NS* = not significant. *Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. The G-tests or chi-square test were used for the analysis of proportions, and the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for means analysis.

Test 2: Ginger EO

Chromatographic analysis showed that the main constituents of the ginger EO were α -pinene (17.9%), β -pinene (14.9%) and zingiberene (14.7%). FBT was negative for all the animals in the TBZ group. As a result, animals in the TBZ group presented null values in all five parameters derived from the parasitemia curve (Figure 2). Significant differences were observed among groups ($p < 0.0001$) in 4/5 of the parasitemia parameters. When compared to UC, animals treated with TLEO100 and TLEO250 demonstrated a significant reduction in PT ($p = 0.02$) and AUC ($p = 0.04$) (Table 2). BC and cPCR confirmed infectivity in 100% of the animals tested, including those in the TBZ group. However, no significant differences in

%HC+ and %cPCR+ were observed among the groups. CR for BZ-treated animals was zero, showing once again that the reference drug was not effective in the animals orally inoculated with the *T. cruzi* Y-strain. CRs obtained from animals in TGEO100 and TGEO250 groups were not significantly different from BZ. Although %qPCR+ was numerically highest in the TGEO250 group and lowest in the TBZ group, no statistical differences were found among groups (Table 2).

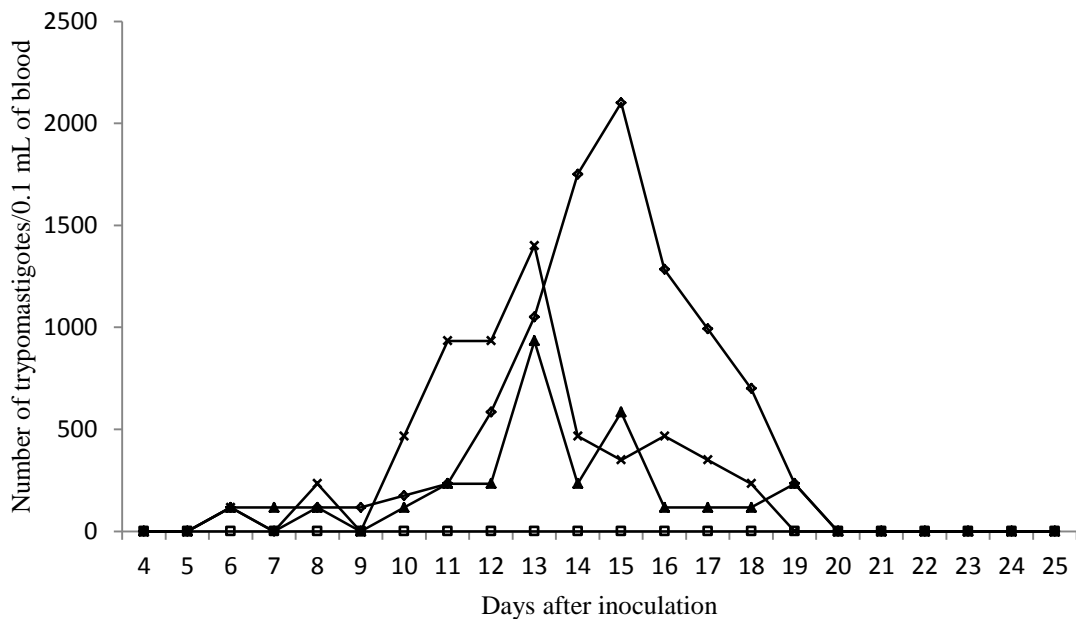


Figure 2. Experiment 2 (treatment started on 5th dai). Mean parasitemia curve of mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y strain - TcII) treated with benznidazole 100 mg/kg/day (TBZ; □), *Zingiber officinale* essential oil at the doses of 100 mg/kg/day (TGEO100; ▲) and 250 mg/kg/day (TGEO250; ×), during 20 consecutive days, and untreated controls (UC; ◇).

Table 2. Statistical comparisons of parasitological and molecular parameters, and cure rates in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y-strain - TcII), treated with benznidazole 100 mg/kg/day - 20X (TBZ), ginger essential oil 100 mg/kg/day - 20X (TGEO100), ginger essential oil 250 mg/kg/day - 20X (TGEO250), and untreated controls (UC).

Parameters	UC	TBZ	TGEO100	TGEO250	p*
PP	6.4 ± 2.9	0.0	4.3 ± 3.1	4.6 ± 3.4	<0.0001
Pmax	2800 ± 2067.9	0.0	1400.0 ± 596.9	1983.3 ± 1260.5	<0.0001
Dpmax	13.8 ± 2.1	0.0	13.5 ± 1.9	13.4 ± 1.3	NS
TP	8866.7 ± 7146.9	0.0	3266.7 ± 2096.5	5133.3 ± 4235.2	<0.0001
AUC	10208.3 ± 8000.5	0.0	3558.3 ± 2320.8	5425.0 ± 4776.9	<0.0001
%BC+	55.6 (5/9)	75.0 (6/8)	55.6 (5/9)	66.7 (6/9)	NS
%cPCR+	100.0 (4/4)	100.0 (2/2)	50.0 (2/4)	100.0 (2/2)	NS
%qPCR+	33.3 (1/3)	0.0 (0/3)	33.3 (1/3)	66.6 (2/3)	NS
Cure rate	-	0.0 (0/8)	22.2 (2/9)	11.1 (1/9)	NS

PP: patent period (in days); Pmax: parasitemia peak (number of trypomastigotes/0.1 ml of blood); Dpmax maximum peak day; TP: total parasitemia; AUC: area under the curve; %BC+: percentage of animals with positive blood culture; %cPCR+: percentage of animals cPCR positive; %qPCR+: percentage of animals with qPCR positive; NS = not significant. *Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. The G-tests or chi-square test were used for the analysis of proportions, and the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for means analysis.

Test 3: Clove EO

The major constituents identified in the clove EO were eugenol and β -caryophyllene at concentrations of 82.9% and 13.0%, respectively. UC group demonstrated the highest parasitemia level ($p < 0.0100$) when compared to the other groups (Figure 3). Only one animal in the TBZ group presented PP and, as a result, all the parameters derived from the parasitemia curve were significantly lower in this group when compared with the other groups ($p < 0.0001$). When compared to UC, animals in the TCEO100 and TCEO250 groups presented reduced PP, Pmax, Dpmax, PT and AUC values. The %HC+ varied among groups, being highest for the TBZ group and lowest for the TCEO250 ($p = 0.01$). However, %cPCR+ and %qPCR+ presented no significant differences. None of the animals treated with BZ was cured. CRs demonstrated significant differences among groups ($p = 0.03$). CR induced by the clove EO (TCEO100) was significantly higher than that found for mice in TCEO250 and TBZ groups (Table 3).

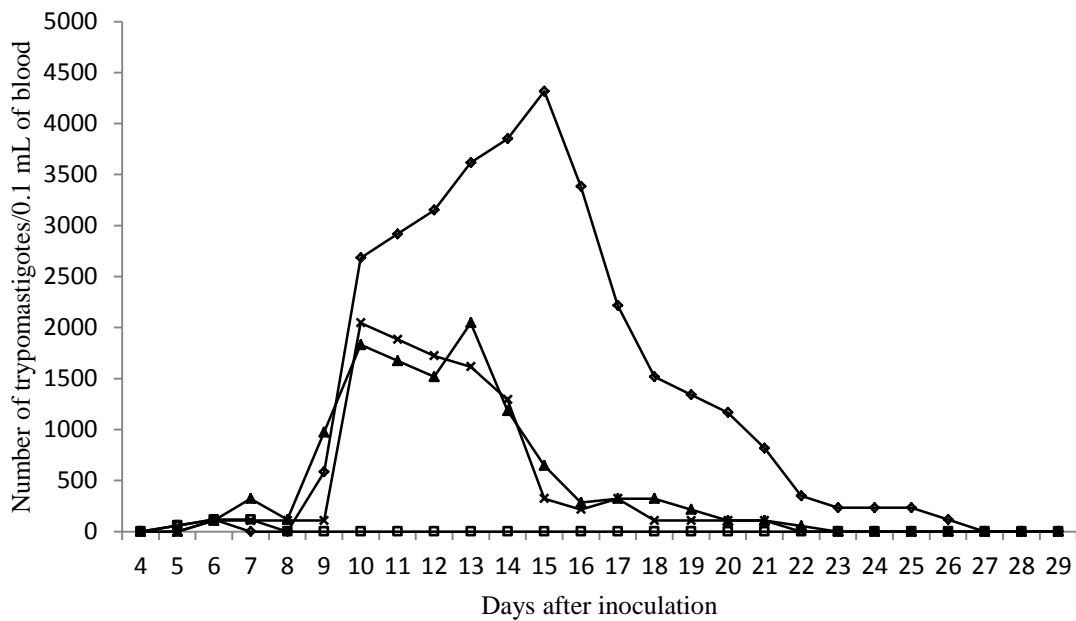


Figure 3. Experiment 3 (treatment started on 5th dai). Mean parasitemia curve of mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y strain - TcII) treated with benznidazole 100 mg/kg/day (TBZ; □), *Syzygium aromaticum* essential oil at the doses of 100 mg/kg/day (TCEO100; ▲) and 250 mg/kg/day (TCEO250; ×), during 20 consecutive days, and untreated controls (UC; ◇).

Table 3. Statistical comparisons of parasitological and molecular parameters, and cure rates in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* (Y-strain - TcII), treated with benznidazole 100 mg/kg/day - 20X (TBZ), clove essential oil 100 mg/kg/day - 20X (TCEO100), clove essential oil 250 mg/kg/day - 20X (TCEO250), and untreated controls (UC).

Parameters	UC	TBZ	TCEO100	TCEO250	p*
PP (days)	12.6 ± 2.9	0.1 ± 0.3	6.1 ± 4.3	5.2 ± 3.2	<0.0001
Pmax	5367.0 ± 1872	116.7 ± 386.9	3877.0 ± 2073.0	3446.0 ± 2466.0	<0.0001
Dpmax	12.7 ± 1.4	5.0 ± 0.0	11.2 ± 1.5	11.3 ± 2.0	<0.0001
TP	28233.0 ± 9455	116.7 ± 404.1	8723.0 ± 5516.0	8185.0 ± 6152.0	<0.0001
AUC	32675 ± 11194.7	58.3 ± 202.1	10507.6 ± 6222.7	10146.1 ± 7543.9	<0.0001
%BC+	55.6 (5/9)	77.8 (7/9)	22.2 (2/9)	11.1 (1/9)	0.01
%cPCR+	77.8 (7/9)	77.8 (7/9)	55.6 (5/9)	66.7 (6/9)	NS
%qPCR+	33.3 (1/3)	0.0 (0/3)	0.0 (0/3)	0.0 (0/3)	NS
Cure rate	-	0.0 (0/9)	44.4 (4/9)	22.2 (2/9)	0.03

PP: patent period (in days); Pmax: parasitemia peak (number of trypomastigotes/0.1 ml of blood); Dpmax maximum peak day; TP: total parasitemia; AUC: area under the curve; %BC+: percentage of animals with positive blood culture; %cPCR+: percentage of animals cPCR positive; %qPCR+: percentage of animals with qPCR positive; NS = not significant. *Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. The G-tests or chi-square test were used for the analysis of proportions, and the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for means analysis.

DISCUSSION

Chagas disease is one of 17 neglected tropical infirmities listed by the World Health Organization, with less than 1% of infected people being estimated to receive adequate treatment. Currently available drugs, benznidazole and nifurtimox, can cure infected patients, but are effective only at the beginning of the infection, and their therapeutic effectiveness is dependant on the genetic variability of *T. cruzi*. Moreover, treatment is long with several adverse reactions, which result in high rates of patient non adherence [19]. Products derived from medicinal plants may lead the way in the discovery of new drugs, or combination of drugs, for the treatment of Chagas disease. Indeed, several studies have supported the therapeutic value of different natural products as trypanocidal agents [9,10,20,21,22,23].

In the present study, the effectiveness of three different essential oils (EOs) were evaluated in the treatment of mice orally infected with *T. cruzi*. Three separate tests were conducted following the same design, comparing the results obtained with each EO at the doses of 100 and 250 mg with the results of untreated animals (UC) and animals treated with the reference drug (BZ). Seven parasitological parameters, five of them related to the parasitemia curve (PP, Pmax, Dpmax, TP, and AUC) and two related to the presence of the parasite in the blood (FBT, and BC); two molecular analysis, one performed in blood (cPCR) and one in the cardiac tissue (qPCR); and cure rates (CRs), were analysed. All inoculated animals became infected and no deaths were recorded during the follow-up period.

The *T. cruzi* Y-strain of TcII DTU [24] is considered highly virulent for albino mice [25]. Apart from being partially resistant to benznidazole and nifurtimox, it presents high infectivity, parasitemia and lethality in mice. As a result, the Y-strain has been widely used in studies, including those screening for new drugs against Chagas disease. In the present study, low levels of parasitemia and zero mortality were observed with the oral administration of this strain. This biological behavior was quite different from that previously observed in mice

inoculated both intraperitoneally and orally. In a study performed by our group using the same inoculum and inoculation route, a mortality rate of 90%, and Pmax, PT and AUC values approximately 40-fold higher than in the current study, were observed [11]. Differences may be due to the prolonged maintenance of the strain in LIT acellular culture medium only, without blood passages in mice, which may have led to a reduction of the Y-strain virulence in the present study. This is consistent with the low qPCR positivity found in the cardiac tissue of the animals tested. *T. cruzi* Y-strain is biologically heterogeneous and some subpopulations (clones) can be selected after years of laboratory storage [26]. Nonetheless, other biological characteristics of the orally administered Y-strain were maintained, such as PP duration (around 10 days), Dpmax (around day 14), and high infectivity (100% of inoculated animals became infected).

The three EOs evaluated in this study altered the parasitemia curve profile, demonstrating reduced values of different parameters when compared to UC. Animals treated with BZ and TCEO, in the two tested doses, reduced all the five parasitemia parameters, indicating a superior suppressive effect on parasitemia than TLOE and TGOE. However, animals treated with BZ presented significantly higher %BC+ (75%) than animals in the TLEO and TCEO groups. A possible explanation for this result would be that blood trypomastigote forms of the Y-strain are more sensitive to BZ than tissue amastigotes. Moreover, as BC was performed 30 days after the end of the experiment, %BC+ might have started to rise again after the pressure exerted by the drug on parasitemia was ceased. Alternatively, EO penetration power into tissues might have been greater than BZ, reaching tissue amastigote forms more effectively.

The highest CRs after treatment were 50.0% (4/8) obtained with TLEO100, and 44.4% (4/9) with TCEO100. Lemongrass and clove EOs also promoted reduction in most of the parameters evaluated (6/8). Although BZ presented higher suppressive effect on parasitemia,

CRs suggest greater effectiveness of these two EOs, mainly in the elimination of tissue amastigotes. These results place the lemongrass and clove EOs, and their major components, as potential candidates for the treatment of patients orally infected with *T. cruzi*.

The biological activity of natural products is directly related to their constituents. Lemongrass (*C. citratus*), ginger (*Z. officinale*) and clove (*S. aromaticum*) EOs main constituents are terpenes and terpenoids, which have already been shown to have *in vitro* activity against the protozoan that causes Chagas disease [8,9,28,29,30,31]. Promising therapeutic effects of the *C. citratus* EO have already been demonstrated *in vitro* on the genus *Trypanosoma* [32] and *T. cruzi* [8]. Moreover, extracts prepared from ginger have also shown trypanocidal activity against *T. evansi* [33], while ginger and lemongrass oils were effective against four *Leishmania* species [34]. The effect obtained with the use of lemongrass EO on parasitemia in the present study, although inferior to BZ, can be attributed to its major constituents, geranial (α -citral) and neral (β -citral), which has already demonstrated *in vitro* activity against *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes [Cardoso & Soares, 2010]. In an *in vivo* study, the *Aloysia triphylla* EO also demonstrated activity against *T. cruzi*, and the authors attributed this effect to these same substances found in the lemongrass EO [35].

Among the EOs tested against the oral infection by *T. cruzi* in this study, the clove EO presented the most promising results. CR promoted by clove EO (44.4%), while still far from ideal, was higher than that obtained with BZ (0.0%). This result can be attributed to its compounds, eugenol and caryophyllene, which represent almost the totality of the constituents identified. They have already demonstrated antiparasitic effect *in vitro* against promastigotes forms of *Leishmania* and epimastigotes forms of *T. cruzi*, with Caryophyllene, in particular, presenting better clinical activity against the two parasites [36].

In this study, the efficacy of the different treatments on the animals orally inoculated with *T. cruzi* was monitored with parasitological (ESF and HC) and molecular techniques

(cPCR in blood, and qPCR in cardiac tissue). Moreover, the animals were not subjected to immunosuppression with cyclophosphamide, as currently recommended for cure control of experimental chemotherapy of *T. cruzi* infection. Regarding the molecular analyzes, our results showed that cPCR in blood had a greater detection capacity of *T. cruzi* DNA than qPCR performed in cardiac tissue. The the low %qPCR+ results indicate that the Y-strain tested showed low tissue invasion capability. When applied in blood, the same technique has demonstrated higher detection capability than cPCR in mice orally inoculated with TcIV strains obtained from oral infection outbreaks in the Amazon [12]. These differences may be related to the genetic content of parasite DTUs, the different targets of the two PCR protocols, and the biological material used in the analyzes (blood and cardiac tissue). The amount of parasites and the period over which the tests were performed may also vary. In the present study, blood analyzed with cPCR was collected at 55 d.a.i, while cardiac tissue was collected at 115 d.a.i.

Mice orally inoculated with the Y-strain did not respond to BZ treatment, with cure rates varying from 0% to 12.5% (mean 4.2%). This is in contrast with the CRs around 50% (30-70%) obtained with mice inoculated intraperitoneally, the classic route used by researchers, with the same strain and inoculum [14,27,37]. This suggests that the Y-strain is partially resistant to BZ *in vivo* when inoculated intraperitoneally, and even less susceptible to the drug when inoculated orally. Thus, the orally inoculated Y-strain was shown to be resistant to BZ in the present study. This is in agreement with results previously obtained by our group, which showed that mice orally infected with *T. cruzi* (TcIV strains), in addition to present more severe infection, responded worse to BZ treatment when compared to animals inoculated intraperitoneally [12].

CONCLUSIONS

Our results showed that the Y strain of *T. cruzi* when inoculated orally is resistant to treatment with BZ. All the essential oils tested altered the parameters of the parasitemia curve, however, benzonidazole had a greater suppressive effect. Treatment with *S. aromaticum* EO at the dose of 100 mg proved to be promising for *T. cruzi* infection, being more effective than the reference drug. Further studies are warranted to investigate *S. aromaticum* EO in order to evaluate the toxicity and efficacy of its major components *in vivo*, either alone or in association, on the genetic diversity of *T. cruzi*.

DECLARATIONS

Acknowledgements

This research was supported by Araucaria Foundation for Scientific and Technological Development (251/2014) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 483469/2013-0).

Conflict of interest

No conflict of interest associated with this work.

Contribution of authors

We declare that this work was done by the author(s) named in this article and all liabilities pertaining to claims relating to the content of this article will be borne by the authors.

Gerson Zanusso Junior, was responsible for the conception and design of the study, data collection and analysis, and writing the manuscript. Miyoko Massago was responsible for the data collection and analysis. Ana Paula M. Teston was responsible for the conception and design of the study and data collection. Alexandre T. Morey was responsible for the

molecular analyses. Max Jean O. Toledo was responsible for the conception and design of the study, data analysis, and writing the manuscript. All authors read and approved the manuscript for publication.

REFERENCES

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [cited 2016 Jul 28]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Brasil, Ministério da Saúde (2013). Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA), 2007 a 2011 [cited 2013 Jun 17]. Available from: http://www.bvsmms.saude.gov.br/bvs/./saude_brasil_2013_analise_situacao_saude.pdf.
3. Bustamante JM, Tarleton RL. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014; 7: 317-25.
4. Rassi Jr A, Rassi A, de Rezende JM. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin N Am* 2012; 26: 275-291.
5. Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109: 828-833.
6. Rivero CV, Romano OS. Drugs for the etiologic treatment of chagas disease: myths and truths. *Int Card For J* 2016; 7: 15-18.
7. Ferreira DS, Esperandim VR, Toldo MPA, Kuehn CC, Prado Jr JC, Cunha WR, Silva MLA, Albuquerque S. In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* 2013; 134: 455–459.
8. Santoro GF, Cardoso MG, Guimaraes LG, Freire JM, Soares MJ. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol* 2007a; 134: 1649-1656.
9. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Mendonça LZ, Soares MJ. *Trypanosoma cruzi*: Activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007b; 116: 283-290.
10. Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Nakamura CV. Natural products and Chagas disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod Rep* 2011; 28: 809-23.
11. Dias GBM, Gruending AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJO. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol* 2013; 135: 511–517.
12. Teston APM, Abreu AP, Abegg CP, Gomes ML, Toledo MJO. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. *Acta Trop* 2016; 166: 212–217.
13. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; 4: 389–396.

14. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 755-759.
15. Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araújo SM, Bahia MT, Lana M, Toledo MJ. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Parasitol* 2006; 112: 198-201.
16. Caldas S, Caldas IS, Diniz Lde F, Lima WG, Oliveira Rde P, Cecílio AB, Ribeiro I, Talvani A, Bahia MT. Real-time PCR strategy for quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* 2012; 123: 170-177.
17. Valdez RH, Tonin LT, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Dias Filho BP, Kaneshima EN, Yamada-Ogatta SF, Yamauchi LM, Sarragiotto MH, Nakamura CV. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. *Antimicrob Agents Chemoter* 2012; 56(1): 507-512.
18. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantification of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129: 53-59.
19. Drugs for Neglected Diseases initiative. Chagas disease [cited 2016 Aug 20]. Available from: <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>.
20. Bastos JK, Albuquerque S, Silva ML. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. *Planta Med* 1999; 65: 1-4.
21. Saraiva J, Vega C, Rolon M, da Silva R, E Silva ML, Donate PM, Bastos JK, Gomez-Barrio A, de Albuquerque S. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2007; 100: 791-795.
22. Batista JM Jr, Lopes AA, Ambrósio DL, Regasini LO, Kato MJ, Bolzani Vda S, Cicarelli RM, Furlan M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential antitrypanosomal agentes. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 538-540.
23. Escobar P, Milena Leal S, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 184-190.
24. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG;. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 1051-1054.
25. Pereira da Silva LH, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 1953; 20: 191-208.
26. De Araújo SM, Chiari E. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 175-181.
27. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ* 1985; 63: 721-726.

28. Grecco SdosS, Reimão JQ, Tempone AG, Sartorelli P, Cunha RL, Romoff P, Ferreira MJ, Fávero OA, Lago JH. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Exp. Parasitol* 2012; 130: 141–145.
29. Campos MC, Salomão K, Castro-Pinto DB, Leon LL, Barbosa HS, Maciel MA, de Castro SL. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2010; 107: 1193–1204.
30. Menna-Barreto RF, Laranja GA, Silva MC, Coelho MG, Paes MC, Oliveira MM, de Castro SL. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res* 2008; 103: 111-117.
31. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 446-475.
32. Habila N, Agbaji AS, Ladan Z, Bello IA, Haruna E, Dakare MA, Atolagbe TO. Evaluation of In Vitro Activity of Essential Oils against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma evansi*. *J Parasitol Res* 2010; 2010: 1-5.
33. Shaba P, Pandey NN, Sharma OP, Rao JR, Singh RK. In vitro trypanocidal activity of methanolic extracts of *Quercus borealis* leaves and *Zingiber officinale* roots against *Trypanosoma evansi*. *Greener Journal of Agricultural Sciences* 2011; 1: 41-47.
34. JF Sanchez-Suarez, I Riveros, G Delgado. Evaluation of the Leishmanicidal and Cytotoxic Potential of Essential Oils Derived From Ten Colombian Plants. *Iranian J Parasitol* 2013; 1: 129-136.
35. Cardoso J, Soares MJ. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 1026-1032.
36. Rojas J, Palacios O, Ronceros S. The effect of the essential oil from *Aloysia triphylla* Britton (lemon verbena) on *Trypanosoma cruzi* in mice. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2012; 29: 61-68.
37. Leite NF, MSc. Sobral-Souza CE, BSc. Albuquerque RS, Brito DIV, Lavor AKLS, Alencar LBB, Tintino SR, Ferreira JVA, Figueredo GF, Lima LF, Cunha FAB, Pinho AI, Coutinho HDM. In vitro cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2013; 18: 522-528.
38. Toledo MJO, Guilherme ALF, Silva JC, Gasperi MV, Mendes AP, Gomes ML, Araújo SM. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from different endemic areas of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 1997; 39: 283–290.
39. Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas Disease. *Acta Trop* 2016; 156: 1–16.

Article II:

Efficacy of essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole on murine oral infection with *Trypanosoma cruzi* IV from outbreak of foodborne infection

**EFFICACY OF ESSENTIAL OIL OF *Syzygium aromaticum* ALONE AND IN
COMBINATION WITH BENZNIDAZOLE ON MURINE ORAL INFECTION WITH
Trypanosoma cruzi IV FROM OUTBREAK OF FOODBORNE INFECTION**

Gerson Zanusso Junior^a, Miyoko Massago^a, Danielle Kian^b, Max Jean de Ornelas Toledo^{a,*}

^a State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

^b State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil.

Gerson Zanusso Junior, gersonjr17@hotmail.com

Miyoko Massago, mi_massago@hotmail.com

Danielle Kian, danykian@gmail.com

Max Jean de Ornelas Toledo, mjotoledo@uem.br

***Corresponding Author**

Universidade Estadual de Maringá

Avenida Colombo 5790, Jardim Universitário,

87.020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Tel.: (+55 xx 44) 3011 8991; Fax: (+55 xx 44) 3011 4860;

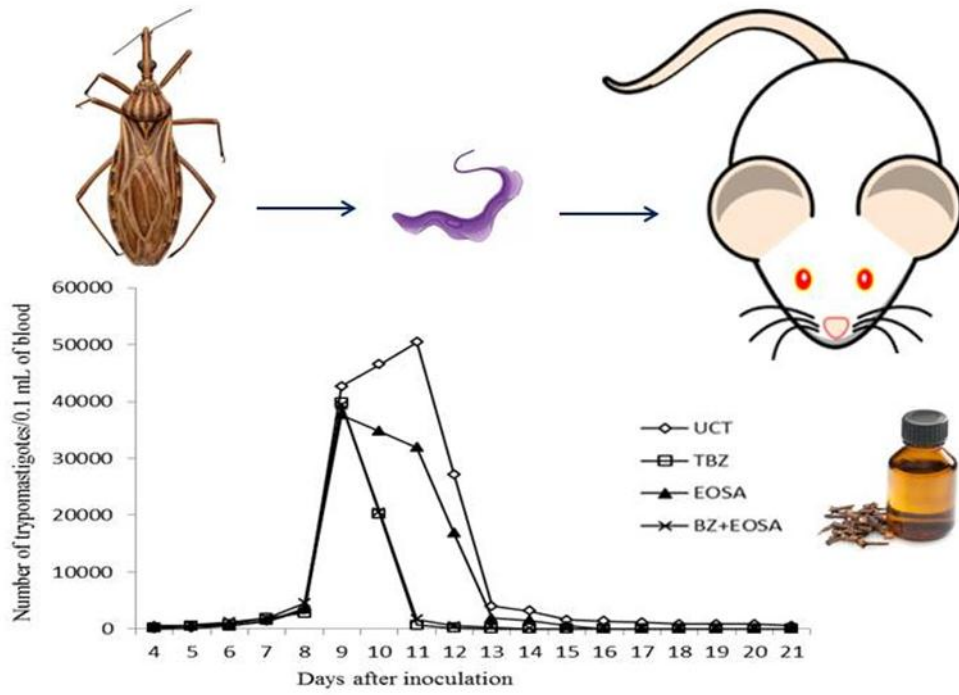
E-mail: mjotoledo@uem.br

ABSTRACT

Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi*, remains a serious public health problem. One of the causes of the high morbidity and mortality in patients is the lack of an effective drug therapy. Thus, the aim of this study was to evaluate the efficacy of the essential oil of *Syzygium aromaticum* alone and in combination with benznidazole (BZ) in mice orally inoculated with strain of *T. cruzi* IV obtained from oral CD outbreak occurred in Western Brazilian Amazonia. All the animals inoculated with metacyclic trypomastigote forms (AM14 strain, BZ resistant), derived from the insect *Rhodnius robustus*, became infected and there was no difference in the mortality rate between the experimental groups. When compared with untreated control animals (UTC), the treatment with essential oil of *S. aromaticum* (EOSA) alone promoted reduction in 1/5 parameters derived from the parasitemia curve, whereas the treatments with BZ alone or in combination (BZ+EOSA) promoted reduction in 4/5 of those parameters, presenting similar profiles of parasitemia curve. The animals treated with BZ and with the combination BZ+EOSA presented lower patency periods in comparison with the animals in EOSA group, and lower positivity of blood cultures when compared with the UTC group. The results of molecular analysis by qPCR in both blood and cardiac tissue did not show differences between the groups. The cure rates obtained with the different treatments presented the following ascending order: EOSA=12.5% (1/8), BZ=25.0% (2/8) and BZ+EOSA=37.5% (3/8), suggesting a synergistic action between benznidazole and the essential oil of *S. aromaticum*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* IV; oral infection; benznidazole; essential oil; *Syzygium aromaticum*; mice.

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

Insect-derived metacyclic forms is more virulent for mice than culture-derived ones.

Mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV displayed a more intense infection.

The AM14 strain of *T. cruzi* IV was resistant to benznidazole (25% cure) in vivo.

Essential oil of *S. aromaticum* plus benznidazole cured 37.5% of the treated animals.

This essential oil may constitute a promising therapeutic agent for Chagas disease.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis, was first described in the early twentieth century (Chagas, 1909) and still remains a serious public health problem, especially in Latin America. Currently, 6 - 7 million people are infected with its etiologic agent, *Trypanosoma cruzi*, worldwide (Bern, 2015), and more than 10,000 people die every year from clinical manifestations of Chagas disease (WHO, 2017).

Since its discovery, the control of the infection in humans has proven difficult probably due to the different modes of transmission, known as vector-borne, transfusion, congenital, through organ transplantation and oral route. Although triatomine vectors are considered the main responsible for the transmission of *T. cruzi* in endemic countries, socioeconomic development, public policies and use of chemical control contributed to decreasing this mode of transmission. In Brazil, between 2000 and 2013, 69% (1,082/1,574) of the new cases of CD reported were orally acquired (Brasil, 2013).

Even though it is a centennial infectious disease, the high morbidity and mortality presented by the patients occurs, among other factors, as a result of the inexistence of an effective drug therapy. Currently, only two drugs are available for the treatment of CD: benznidazole (BZ) and nifurtimox. In addition, these drugs have high toxicity and cause adverse effects that could hamper the continuity of the treatment due to the need for prolonged dosing (Jannin and Villa, 2007; Coura, 2009; Rassi et al., 2012). They also present low efficacy in the chronic phase, a more prevalent form of the disease, in which around 20% cure is observed (Macedo et al., 2002; Zingales et al., 2014; Rivero and Romano, 2016). Another factor that influences the efficacy of the treatments is the genetic diversity of *T. cruzi*. Its strains are referred to as discrete typing units (DTUs) and present different drug susceptibilities, leading to a discrepancy in the results of the specific treatment in patients from different geographical areas (Murta et al., 1998; Coura and Castro, 2002; Toledo et al., 2003; Teston et al., 2013).

Therefore, the importance for searching new therapies for CD, with less side effects and greater therapeutic efficacy in both acute and chronic phases is emphasized (Alves et al., 2012). In this context, the use of natural products may be a valid strategy to find a new trypanocidal drug, since several studies have already demonstrated *in vitro* (Satalaya et al., 2009; Escobar et al., 2010; Ferreira et al., 2011; Borges et al., 2012; Santos et al., 2012) and *in vivo* (Ferreira et al., 2011; Rojas et al., 2012) activity of natural products against *T. cruzi*. Among these studies, promising results have been observed with the use of essential oils (Santoro et al., 2007a; 2007b; Izumi et al., 2011), highlighting previous results from our research group that demonstrated greater efficacy of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (Indian clove) than the reference drug benznidazole in the experimental murine infection by oral route (Zanusso-Jr et al., in publication).

Thus, the aim of this study was to evaluate the efficacy of the essential oil of *S. aromaticum* alone and in combination with benznidazole in mice experimentally infected by oral route with strain of *T. cruzi* IV obtained from an acute case of CD derived from oral outbreak occurred in Western Brazilian Amazon.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethical aspects

The use, maintenance and care with the experimental animals were carried out in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Experimentation at the State University of Maringá (CEUA/UEM; Registration No. 023/2014). The use of the strain of *T. cruzi* obtained from a patient from the State of Amazonas was approved by the ethics committee of the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas (process No. 360/07).

2.2. Obtainment of the inoculum

Triatomines of the species *Rhodnius robustus*, vector of Chagas disease in the Amazon region, were used in order to obtain the inoculum of metacyclic trypomastigotes. The insects were kindly provided by Dr. José Jurberg from the National and International Triatomine Taxonomy Reference Laboratory, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Thirty insects were infected on artificial feeder containing metacyclic trypomastigote forms from cultures with LIT (Liver Infusion Tryptose) medium diluted in blood of healthy mice. After the infection, the triatomines were maintained in a B.O.D. incubator, with temperature of 26 °C and relative humidity of 70% and were re-fed 20 days after infection in healthy mice. The insects were dissected 47 days after the infective repast and their intestinal contents were macerated and diluted in LIT medium. The number of parasite forms was evaluated according to the Brener technique (1962) and the proportion of trypomastigote forms was determined in Giemsa-stained smears. The inoculum was adjusted with LIT medium for the concentration of 2×10^4 insect-derived metacyclic trypomastigotes (IMT)/mL.

2.3. Inoculation of the animals

Male Swiss mice, 20-24 days old and weighing between 18 and 22 g, were obtained from the central animal facility of UEM. They were maintained in fasting for 12 hours before being inoculated by gavage and kept in micro-acclimated cages (Alesco®, dimensions of 20 x 32 x 21 cm), with light/dark cycle, and feed and water on free demand.

The strain AM14 of *T. cruzi* obtained from an outbreak of orally acquired acute Chagas disease in the municipality of Coari, located in the State of Amazonas, Western Brazilian Amazon, was used. This strain has been maintained in the Trypanosomatid Collection of the Chagas Disease Laboratory at UEM. It was genotyped as *T. cruzi* IV (TcIV) (Monteiro et al.,

2012) and considered BZ resistant *in vivo*. Mice inoculated intraperitoneally with blood trypomastigotes (BT) of this strain had 30% (3/10) cure rate (Teston et al., 2013), whereas those inoculated orally with metacyclic trypomastigotes from acellular culture (CMT) had 18.2% (1/11) cure (Teston, 2016).

2.4. Experimental groups

Ten days after inoculation (dai), the animals were allocated into four groups, according to the weight and parasitemia, being as follows: 1) Untreated control (UTC; n = 8); 2) treated with benznidazole (LAFEPE) 100 mg/kg (TBZ; n = 8); 3) treated with essential oil of *S. aromaticum* 100 mg/kg (EOSA; n = 9) and 4) treated with BZ 100 mg/kg in combination with essential oil of *S. aromaticum* 100 mg/kg (BZ+EOSA; n = 9). The treatments were administered for 20 consecutive days by gavage. One week after the end of the treatment (37th dai), all the groups were submitted to immunosuppression with cyclophosphamide (Cy; Baxter, Brazil), 50 mg/kg, for 4 consecutive days in the first week, and for 3 alternate days in the two following weeks (Bertoli et al., 2006).

2.5. Essential oil

The essential oil of *S. aromaticum* (Indian clove) was commercially obtained (Quinari®, Ponta Grossa, Brazil) and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS; Shimadzu QP 2000) under the following conditions: DB-5 column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); Helium (1 mL/min); injector temperature (240 °C) and detector temperature (230 °C) under the following operating conditions: column temperature, 50-160 °C, at 3 °C/min; injected volume, 1 µL (2 mg of the essential oil in 1 mL of ethyl acetate). The identification of the compounds present in the essential oils was carried out by comparison

with the CG-MS System (*National Institute of Standards and Technology - Nist.62 Library*) and also by comparison with the Kovats indices.

2.6. Evaluation of the efficacy of the treatments

To evaluate the efficacy of the treatments with the essential oil alone or in combination with BZ (BZ+EOSA), the animals in the different experimental groups were subjected to fresh blood examination, blood culture and real-time polymerase chain reaction after immunosuppression with Cy.

2.6.1. Fresh blood examination (FBE)

Parasitemia was daily evaluated in blood collected from the tail vein of the animal from the 3rd dai, according to Brener (1962), until obtaining negative results for three consecutive days. The following parameters derived from the parasitemia curve were determined: Mean patent period (PP), which was calculated as the average of the periods in which each mouse had parasitemia detected by the FBE; Maximum peak of parasitemia (Pmax), which is the average calculated from the peak of parasitemia detected for each mouse; maximum peak day (Dpmax), which was the mean of the days in which each mouse had the peak of parasitemia detected; total parasitemia (TP), which is the average of the sum of the daily parasitemia of each animal throughout the experiment; and area under the parasitemia curve (AUC). After the treatments with BZ or essential oil, alone or in combination, and during immunosuppression with Cy, parasitemia was evaluated every two days. With these results, the parameter percentage of animals with positive fresh blood examination (%+FBE) was obtained.

2.6.2. Blood Culture (BC)

BC was performed 30 days after the end of the treatments (60 dai), according to Filardi and Brener (1987), using samples of blood collected from the retro-orbital venous plexus and inoculated in LIT medium. With the results of this method, the parameter percentage of animals with positive blood culture (%+BC) was obtained.

2.6.3. Real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The collection of venous blood and cardiac tissue for molecular analysis using the qPCR technique was also performed 30 days after the treatments and 60 dai. This qPCR protocol has been used by our group showing results significantly higher than those obtained by conventional PCR (cPCR) in blood of mice infected with 4 different TcIV strains: a positivity of 93.8% of qPCR against 46.5% of cPCR (Teston et al., 2017). For extracting the DNA, 100 μ L of blood and 30 mg of tissue (Caldas et al., 2012) were used, and the DNA obtained was analyzed using the reagent Platinum SYBR green qPCR SuperMix UDG/ROX (Invitrogen, USA) and thermocycling equipment Rotor-Gene q 5 plex (Quiagen) (Valdez et al., 2012). PCR was performed using 100 ng of total genomic DNA (gDNA) and primers TCZ-F (5' = -GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3' =) and TCZ-R (5' = -CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' =) (Cummings and Tarleton, 2003). With these results, the percentage of animals with positive real-time PCR in blood (%+qPCRb) and tissue (%+qPCRt), and the quantification of the parasite load of *T. cruzi* in cardiac tissue (qPCRt), were obtained.

2.7. Infectivity and mortality

The infectivity rate (%INF) was obtained by the percentage of animals that had positivity in at least one of the tests performed (FBE, BC or qPCR).

The survival of the animals was evaluated daily over the 60 dai and the cumulative mortality rate (%MORT) was calculated for the different experimental groups.

2.8. Criteria of cure

The animal with negative results in all the diagnostic techniques used (FBE, BC and qPCR), after the etiologic treatment and immunosuppression with Cy, was considered “cured”. The animal that tested positive for at least one of those tests was considered “uncured”. Cure rates were obtained for the groups submitted to the different treatments by dividing the number of animals cured by the total number of treated animals, expressed as a percentage (Toledo et al., 2003).

2.9. Statistical analyzes

Statistical analyzes were performed using the *software* Biostat 5.3 (Belém, Pará, Brazil), considering the significance level of 5%. The means were compared using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test and for proportions, the G test was used. The AUC parameter was calculated with the GraphPad Prism 5.0 software. Statistical comparisons of PP, Dpmax, Pmax, TP, AUC, %+FBE, %+BC, and %+qPCR were performed between the experimental groups (UTC, TBZ, EOSA and BZ+EOSA). The cure rate was compared between the treated groups.

3. RESULTS

The chromatographic analysis of the essential oil of *S. aromaticum* used in this study demonstrated that the main components identified were eugenol and β -caryophyllene in concentrations of 82.9% and 13.0%, respectively.

All the animals inoculated orally with 2×10^4 TMI of the TcIV strain became infected, i.e. they had %INF = 100 (34/34). The %MORT of the TBZ group was zero, whereas in the UTC group it was 12.5% (1/8), and for the groups EOSA and BZ+EOSA it was 11.1% (1/9), with no statistical difference between the groups.

The parasitemia curves of the animals submitted to the different treatments and of UTC are shown in Figure. It can be observed that the profiles of the curves of the animals in TBZ and BZ+EOSA groups were identical and, although the animals in EOSA group had patent parasitemia during the course of the treatment, their parasitemia levels were lower than the animals in UTC. Regarding the five parameters derived from the parasitemia curve, a significant decrease was observed in 4/5 of them, except in Pmax, both in the comparison of the groups at the same time as in the two-by-two comparison (Figure and table).

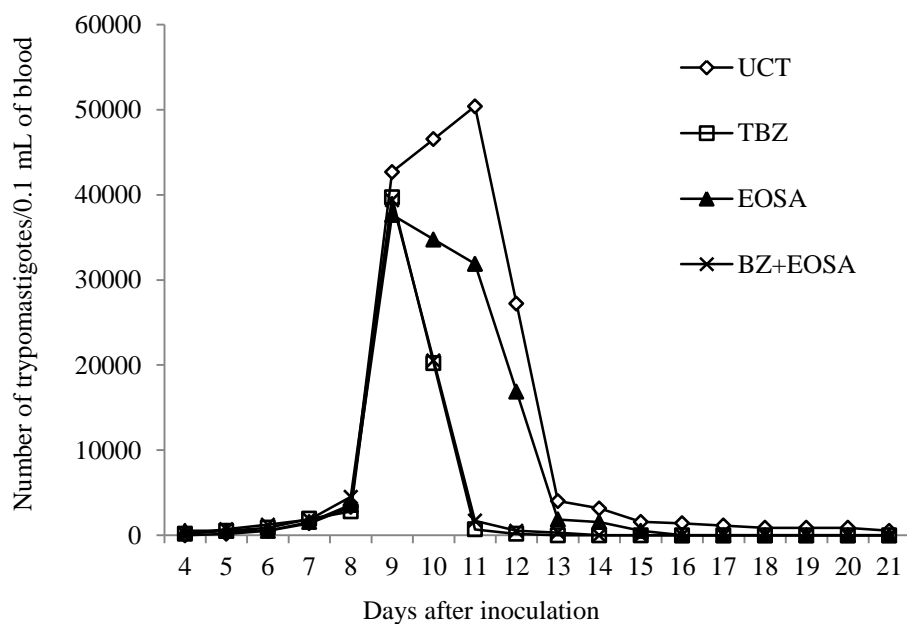


Figure. Curves of mean parasitemia in mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* (AM14 strain - TcIV), treated with benznidazole (TBZ: 100 mg/kg/day), essential oil of *Syzygium aromaticum* (EOSA: 100 mg/Kg/day), combination of BZ and EOSA (BZ+EOSA) and untreated control (UTC). Inoculum: 2×10^4 insect-derived metacyclic trypomastigotes /mL. Treatments started ten days after inoculation and performed for twenty consecutive days.

Table. Statistical comparisons of parasitological, molecular parameters and cure rates in mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* (AM14 strain - TcIV), treated with benznidazole (TBZ: 100 mg/kg/day), essential oil of *Syzygium aromaticum* (EOSA: 100 mg/kg/day), EOSA in combination with benznidazole (100 + 100 mg/kg/day), during 20 consecutive days and untreated control (UTC). Inoculum: 2×10^4 insect-derived metacyclic trypomastigotes /mL.

Parameters	UTC (n = 8)	TBZ (n = 8)	EOSA (n = 9)	BZ+EOSA (n = 9)	p
PP (in days)	13,2 ± 1,9	5,1 ± 1,8	9,0 ± 1,9	5,7 ± 1,8	<0,0001
Pmax	50.400,0 ± 20.051,9	39.725,0 ± 24.773,4	37.644 ± 27.731,3	39.355,5 ± 29.866,6	NS
Dpmax	11,5 ± 0,9	10,0 ± 0,0	10,8 ± 1,0	10,0 ± 0,0	0,0014
TP	186.200,5 ± 69.667,5	76.475,0 ± 43.199,1	113.788,9 ± 69.200,1	85.077,7 ± 52.323,1	0,0145
AUC	186.212,5 ± 74.336,0	66.325,0 ± 38.298,1	130.900 ± 89.744,1	70.077,7 ± 48.465,1	0,0067
%+FBE	0,0 (0/8)	0,0 (0/8)	0,0 (0/9)	0,0 (0/9)	NS
%+BC	100,0 (7/7)	37, 5 (3/8)	87,5 (7/8)	50,0 (4/8)	0,0163
%+qPCRb	57,1 (4/7)	37,5 (3/8)	62,5 (5/8)	50,0 (4/8)	NS
%+qPCRt	42,5 (3/7)	25,0 (2/8)	37,5 (3/8)	25,0 (2/8)	NS
qPCRt	1,9 ± 4,8	1,1 ± 1,6	1,5 ± 1,6	1,4 ± 6,6	NS
% cure	-	25,0 (2/8)	12,5 (1/8)	37,5 (3/8)	NS

PP: patent period; Pmax: maximum peak of parasitemia (number of trypomastigotes/0.1 mL of blood); Dpmax: day of maximum peak; TP: total parasitemia; AUC: area under the curve; %+FBE: percentage of animals with positive fresh blood examination after treatment and immunosuppression; %+BC: percentage of animals with positive blood culture; %+qPCRb: percentage of animals with positive qPCR in blood; %+qPCRt: percentage of animals with positive qPCR in tissue; qPCRt: quantitative real-time PCR in tissue (parasites/100 ng DNA); NS: not significant; Values of $p \leq 0.05$

were considered significant. G-test was used for analysis of proportions and the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for the analysis of means.

Still in the two-by-two comparison, among the other parameters of the curve, decreased PP, Dpmax, TP and AUC ($p \leq 0.0084$) were observed in TBZ and BZ+EOSA groups, both differing from AUC group. A decrease in TP ($p = 0.0433$) of the EOSA group compared with UTC, and difference in PP ($p \leq 0.0341$) between the EOSA group and the groups TBZ and BZ+EOSA, with the latter presenting lower values, was also observed. All treated animals, as well as UTC, presented negative FBE after the end of the etiologic treatment and immunosuppression with Cy (Table).

The treatments also promoted decrease in %+BC ($p = 0.0103$), in the comparison between the groups. However, in the two-by-two comparison, only the animals treated with BZ, alone and in combination with EOSA, had reduction in this parameter ($p \leq 0.0350$) when compared with the animals in UTC (Table).

Higher %+qPCRb was observed in the EOSA group and the highest values of %+qPCRt and tissue parasite load indicated by qPCRt were observed in UTC group. However, there was no statistical difference between the experimental groups for the molecular parameters analyzed (%+qPCRb, %+qPCRt and qPCRt).

Cure rates did not differ between the groups, both in the comparison between groups and in the two-by-two comparison (Table). However, considering the number of cured animals, they presented the following ascending order: EOSA (1/8), TBZ (2/8) and BZ+EOSA (3/8).

4. DISCUSSION

After more than a century since its discovery, Chagas disease persists as a public health problem. The several changes in its epidemiological profile between different decades (Pinto

et al., 2008; Brazil, 2013) and the existence of only two drugs for the etiological treatment (WHO, 2015), are the likely responsible for the continuity of this situation. Currently in Brazil, the main acquisition route of *T. cruzi* infection is oral, observed mainly in outbreaks of acute cases caused by food, palm fruits mainly the *açaí*, contaminated with the parasite, especially the DTU TcIV, but also TcI, in Brazilian Amazon (Pinto et al., 2008; Marcili et al., 2009; Monteiro et al., 2013). In contrast to the previous publications of our research group, which have been addressing genetic and biological aspects of the strains of *T. cruzi* TcIV (Reis et al., 2012; Meza et al., 2013; Monteiro et al., 2013; Teston et al., 2013; Gruending et al., 2015; Teston et al., 2017), in the present study we used an inoculum with metacyclic forms derived from sympatric species of triatomine, *R. robustus*, experimentally infected.

Under these experimental conditions, which are closer to the transmission cycle that occurs in nature, the results of the present study showed a more intense infection, characterized by higher patency periods, maximum peak of parasitemia, positivity of FBE and BC, and mortality rate when compared with the results obtained by Teston et al. (2017). These authors used the same experimental model, but an inoculum of 2×10^6 metacyclic forms derived from acellular culture medium (LIT).

It was also possible to observe that the inoculum and the age of the mice are factors that must be taken into account in the evolution of the infection with *T. cruzi* orally acquired. Massago (2017) observed lower maximum peak of parasitemia and zero mortality in mice orally inoculated with the same strain (AM14), by using older animals (28-35 days) and an inoculum with less than half of the infective forms (8.6×10^3 insect-derived metacyclic trypomastigotes), than the used in the present study. Those findings corroborate the statement that the evolution of the disease depends on the amount of metacyclic insect forms inoculated in vertebrate hosts (Magalhães and Andrade, 1991).

In recent years, the use of natural products as a source of research for new drugs has increased (Monzote et al., 2012). Among them, essential oils have already demonstrated anti-trypansomatid effect (Azeredo et al., 2004; Monzote et al., 2012), as well as their main components, such as eugenol (Ueda-Nakamura et al., 2006; Misra et al., 2009; Nibret and Wink, 2010).

Treatment with EOSA alone provided reduction only in the parameter TP when compared with the UTC group, presenting lower suppressive effect on the parasitemia than the reference drug, BZ. These results disagree with those previously obtained by our group (Zanusso-Jr, in publication) which showed that the essential oil of *S. aromaticum*, at the same dose and route of administration, promoted a significant decrease in PP, Pmax, Dpmax and AUC, besides of TP, compared with the UTC animals. These differences may be due to methodological differences between the two studies regarding the concentration and infective form present in the inoculum, in addition to the genetic lineage of the strain of *T. cruzi*. In the present study, we used the strain AM14, belonging to DTU TcIV and resistant to BZ, whereas in the previous study we used the strain Y, classified as TcII (Zingales et al., 2009) and partially resistant to the drug (Filardi and Brener, 1987). In addition, in the present work, for the inoculation of the animals, metacyclic trypomastigote forms derived from the triatomine species *R. robustus* from the same geographic region were used. Thereby, the genetic diversity of *T. cruzi* and the sympatry between parasite and vector may have contributed to the discrepancy observed in the effect of the essential oil.

Mice treated with benznidazole alone or in combination with the essential oil of *S. aromaticum* showed a nearly identical profile of parasitemia curve and decrease of 80.0% (4/5) of the parameters of the parasitemia curve compared with the untreated control animals. These data are in agreement with previous results that showed decreased parasitemia levels in

the animals inoculated by oral route with culture-derived metacyclic forms of four TcIV strains from Amazonas and treated with BZ (Teston, 2016).

Mice inoculated with the AM14 strain of *T. cruzi* IV had reactivation of the infection after immunosuppression with Cy, characterized by increased BC positivity (100% in UTC group). Teston et al. (2017) demonstrated 44.7% in BC positivity in mice inoculated similarly, but without immunosuppressive treatment. The lower positivity in BC (%+BC = 37.5) was observed for TBZ group in the current study, indicating a greater suppressive effect on parasitemia caused by the reference drug. Differently from UTC and EOSA groups, when compared two-by-two, the group treated with the combination BZ+EOSA had similar result to the one presented by TBZ group for BC, indicating that the treatment with BZ provided a more efficient control of the parasitemia and, consequently, of the infection. Even with all the animals presenting negative result in FBE after administration of the immunosuppressive agent, 87.5% of the animals treated only with the essential oil had positive BC, suggesting reactivation of the infection after immunosuppression with Cy and therapeutic failure.

By adopting an arbitrary criteria for classification of *T. cruzi* strains regarding their susceptibility to drugs, which considers as resistant the strains with up to 33% cure rate (CR); intermediate susceptibility, strains with CR of 34-66%; and sensitive, strains with CR \geq 67% (Toledo et al., 2003), the AM14 strain of TcIV in the oral infection in mice was resistant to the etiological treatment with BZ (25.0% cure). This finding agrees with the previous results obtained by our group, which considered this strain resistant to BZ, both with intraperitoneal inoculum of blood trypomastigotes and treatment starting on the 5th dai (30% cure - Teston et al., 2013), as well as oral inoculum of culture-derived metacyclic trypomastigotes (18.2% cure - Teston, 2016).

Regarding the animals treated with the combination BZ+EOSA, the profile presented by the strain studied was intermediate sensitivity (37.5% cure). Therefore, although there was no

statistical difference between the cure rates obtained by the different treatments, they suggest a possible synergism of effects between the essential oil used and the reference drug, since the use of these compounds in combination provided a greater number of cured animals for the group BZ+EOSA.

5. CONCLUSION

The infection in mice by oral route with a TcIV strain has been proved to be more severe than the infection acquired by intraperitoneal route. The latter, experimentally, is the most frequent route used by different researchers. In addition, this study demonstrated that the infection caused by insect-derived metacyclic trypomastigotes, sympatric to the vector, leads to an even more intense infectious disease than that caused by culture-derived metacyclic trypomastigotes. However, the response to the etiological treatment was not influenced by the infection route (oral or IP), by the number of inoculated forms (2×10^4 or 2×10^6), neither by the infective form present in the inoculum (BT, CMT or IMT), and the AM14 strain was considered resistant to the treatment with BZ (25% cure).

In this model, treatment with the essential oil of *S. aromaticum* in combination with benznidazole demonstrated a result numerically higher than the treatment with the reference drug or with EOSA alone. Therefore, the essential oil of *S. aromaticum*, as well as its constituents, alone or in combination, may constitute promising alternatives for the development of new therapeutics for Chagas disease.

Funding: This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq, grant number 307539/2013] and Araucaria Foundation, Curitiba, Paraná State [grant number 10943812, 251/2014].

6. REFERENCES

1. Chagas, C., 1909. Nova tripanossomíase humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1 (2), 159–218.
2. Bern, C., 2015. Chagas disease. N. Engl. J. Med. 373, 456-466.
3. World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> (accessed 17.03.17).
4. Brasil, Ministério da Saúde. Uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2013_analise_situacao_saude.pdf (accessed 03.11.17).
5. Coura, J.R., 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104, 549-554.
6. Jannin, J., Villa, L., 2007. An overview of Chagas disease treatment. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102, 95–97.
7. Rassi Jr, A., Rassi, A., de Rezende, J.M., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect. Dis. Clin. N. Am. 26, 275-291.
8. Macedo, A.M., Oliveira R.P., Pena, S.D.J., 2002. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. Exp. Mol. Med. 4, 1-16.
9. Rivero, C.V., Romano, O.S., 2016. Drugs for the Etiologic Treatment of Chagas Disease: Myths and Truths. Int. Card. For. J. 7, 15-18.
10. Zingales, B., Miles, M.A., Moraes, C.B., Luquetti, A., Guhl, F., Schijman, A.G., Ribeiro, I., 2014. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 109(6), 828-833.
11. Coura, J.R., Castro, S.L., 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 3-24.

12. Murta, S.M.F., Gazzinelli, R.T., Brener, Z., Romanha, A.J., 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93, 203-214.
13. Teston, A.P.M., Monteiro, W.M., Reis, D., Bossolani, G.D.P., Gomes, M.L., Araujo, S.M., Bahia, M.T., Barbosa, M.G.V., Toledo, M.J.O., 2013. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop. Med. Int. Health.* 18, 85-95.
14. Toledo, M.J.O., Bahia, M.T., Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., Tafuri, W.L., de Lana, M., 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(1), 223-230.
15. Alves, R.T., Regasini, L.O., Funari, C.S., Young, M.C.M., Rimoldi, A.; Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., de Albuquerque, S., da Rosa, J.A., 2012. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. de Farmacogn.* 22(3), 528-534.
16. Borges, A.R., Aires, J.R.A., Higino, T.M.M., Medeiros, M.G.F., Citó, A.M.G.L., Lopes, J.A.D., de Figueiredo, R.C., 2012. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp. Parasitol.* 132(2),123-128
17. Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V.; Martinez, J.R., Stanshenko, E., 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105, 184–190.
18. Ferreira, M.E., Cebrián-Torrejón, G., Corrales, A.S., Bilbao, N.V., Rolón, M., Gomez, C.V., Lebranc, K., Yaluf, G., Schinini, T.S., Serna, E., Arias, A.R., Poupon, E. Fournet, A., 2011. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. *J. Ethnopharmacol.*133, 986–993.

19. Santos, K.K.A., Matias, E.F.F., Tintino, S.R., Souza, C.E.S., Braga, M.F.B.M., Guedes, M.M., Rolón, M., Vega, C., de Arias, A.R., Costa, J.G., Menezes, I.R., Coutinho, H.D., 2012. Anti *Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp. Parasitol.* 31(1),130-132.
20. Satalaya, R.J., Rojas, U.J., Ríos, B., Grandez, M., Rengifo, E., Ruiz, G., Guitierrez, D., Guimenez, A., Flores, N., 2009. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. *Biofarbo.* 17(2), 23-31.
21. Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Júnior, V.F., Nakamura, C.V., 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat. Prod. Rep.* 28, 809-823.
22. Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimaraes, L.G., Freire, J.M., Soares, M.J., 2007a. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitol.* 134, 1649-1656.
23. Santoro, G.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Mendonça, L.Z., Soares, M.J., 2007 b. *Trypanosoma cruzi*: Activity of the essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes, *Exp. Parasitol.* 116, 283-290.
24. Zanusso-Jr, G., Massago, M., Teston, A.P., Morey, A.T., Toledo, M.J.O., in publication. Efficacy of different essential oils on mice experimentally infected by the oral route with *Trypanosoma cruzi*. *Trop. J. Pharm. Res.*
25. Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4, 389-396.

26. Bertoli, M., Andó, M.H., Toledo, M.J.O., de Araújo, S.M., Gomes, M.L., 2006. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. Parasitol. Res. 99, 7-13.
27. Filardi, L.S., Brener, Z., 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 (5), 755 -759.
28. Teston, A.P.M., de Abreu, A.P., Abegg, C.P., Gomes, M.L., Toledo, M.J.O., 2017. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. Acta Trop. 166, 212-217
29. Caldas, S., Caldas, I.S., Diniz, L.F., Lima, W.G., Oliveira, R.P., Cecílio, A.B., Ribeiro, I., Talvani, A., Bahia, M.T., 2012. Real-time PCR strategy for quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Trop. 123, 170-177.
30. Valdez, R.H., Tonin, L.T., Ueda-Nakamura, T., Silva, S.O., Dias Filho, B.P., Kaneshima, E.N., Yamada-Ogatta, S.F., Yamauchi, L.M., Sarragiotto, M.H., Nakamura, C.V., 2012. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino) phenyl-1,2,3,4 -tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. Antimicrob. Agents Chemoter. 56, 507-512
31. Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantification of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR, Mol. Biochem. Parasitol. 129, 53-59.
32. Pinto, A.Y.N., Valente, S.A., Valente, V.C., Ferreira Junior, A.G., Coura, J.R., 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41 (6), 602-614.
33. World Health Organization (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis) 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (accessed 05.08.16).

34. Marcili, A., Valente, V.C., Valente, S.A., Junqueira, A.C.V., da Silva, M., Pinto, A.Y.N., Naiff, R.D., Campaner, M., Coura, J.R., Camargo, E.P., Miles, M.A., Teixeira, M.M.G., 2009. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int. J. Parasitol.* 39 (5), 615-623.
35. Monteiro, W.M., Teston, A.P.M., Gruending, A.P., Reis, D., Gomes, M.L., Araujo, S.M., Bahia, M.T., Magalhães, L.K.C., Guerra, J.A.O., Silveira, H., Toledo, M.J.O., Barbosa, M.G.V., 2013. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2069.
36. Gruending, A.P., Massago, M., Teston, A.P.M., Monteiro, W.M., Kaneshima, E.N., Araújo, S.M., Gomes, M.L., Barbosa, M.G.V., Toledo, M.J.O., 2015. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92(6), 1178-1189.
37. Meza, S.K.L., Kaneshima, E.N., Silva, S.O., Gabriel, M., Araujo, S.M., Gomes, M.L., Toledo, M.J.O., 2014. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp. Parasitol.* 146, 34-42.
38. Reis, D., Monteiro, W.M., Bossolani, G.D.P., Teston, A.P.M., Gomes, M.L., Araujo, S.M., Barbosa, M.G.V., Toledo, M.J.O., 2012. Biological behavior in mice of *Trypanosoma cruzi* isolates from Amazonas and Paraná, Brazil. *Exp. Parasitol.* 130 (4), 321-329.
39. Massago, Miyoko. 2016. Evolução da infecção e resposta ao tratamento com benzonidazol em camundongos inoculados pela via oral com *Trypanosoma cruzi* IV. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

40. Monzote, L., Hill, G.M., Cuellar, A., Scull, R., Setzer, W.N., 2012. Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. [Nat. Prod. Commun.](#) 7 (11), 1531-1534.
41. Azevedo, C.M.O., Santos, T.G., Maia, B.H.L.N.S., Soares, M.J., 2014. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 309.
42. Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Maza, P.K., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Alviano, D.S., Rosa, S.M., Lopes, A.H., Alviano, C.S., Nakamura, C.V., 2006. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. [Parasitol. Int.](#) 55(2), 99-105.
43. Mirsa, P., Kumar, A., Khare, P., Grupta, S., Kumar, N., Dube, A., 2009. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of Piper betle on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. *J. Med. Microbiol.* 58, 1058–1066
44. Nibret, E., Wink, M., 2010. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomed.* 17 (12), 911-920.
45. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiaria, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 (7), 1051 -1054.
46. Teston, A.P.M., Abreu, A.P., Gruendling, A.P., Bahia, M.T., Gomes, M.L., Araújo, S.M., Toledo, M.J.O., 2016. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. *Exp. Parasitol.* 166, 44-50.

Article III:

***Trypanosoma cruzi* IV resistente ao benzonidazol: cura de camundongos infectados tem relação direta com o tempo do tratamento**

***Trypanosoma cruzi* IV resistente ao benzonidazol: cura de camundongos infectados tem relação direta com o tempo do tratamento**

Gerson Zanusso Junior¹, Miyoko Massago¹, Ana Paula M Teston¹, Alexandre T Morey², Max Jean O Toledo^{1*}.

¹Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, s/n, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

*** Autor de correspondência.**

Max Jean de Ornelas Toledo

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Avenida Colombo 5790, Jardim Universitário,
87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Tel.: (55 44) 3011 8991; Fax: (55 44) 3011 4860;

E-mail: mjotoledo@uem.br

RESUMO

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e seu tratamento etiológico é realizado com benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NX). Durante as décadas de 80 e 90, na quimioterapia experimental da infecção pelo *T. cruzi*, essas drogas eram administradas por via oral durante 90 ou 20 dias consecutivos e ainda não se utilizavam métodos moleculares no monitoramento da cura. Com o advento de técnicas mais modernas e sensíveis se faz necessário estabelecer novos critérios de cura que favoreçam o incremento de novos medicamentos na clínica. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo de tratamento na eficácia do BZ em camundongos inoculados com uma cepa de *T. cruzi* obtida de surto de doença de Chagas oral na Amazônia Ocidental brasileira. Camundongos suíços foram inoculados por via oral (VO) ou intraperitoneal (IP) com a cepa AM14 de *T. cruzi* IV e tratados com BZ durante 20, 40 ou 60 dias consecutivos. O animal tratado que apresentou resultados negativos no exame de sangue a fresco, hemocultura e PCR em tempo real (qPCR) em sangue e tecido cardíaco, após imunossupressão com ciclofosfamida, foi considerado “curado”. Os índices de cura obtidos com os tempos de 20, 40 e 60 dias de tratamento foram, respectivamente, de 20,0% (1/5), 75,0% (3/4) e 100,0% (4/4) para os animais IP, e de 20,0% (1/5), 0,0% (0/5) e 100,0% (5/5) para os animais VO, sugerindo que a eficácia do BZ é tempo dependente na infecção experimental por *T. cruzi* IV.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* IV, quimioterapia experimental, benzonidazol, tempo de tratamento, critério de cura.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença tropical negligenciada que acomete milhões de pessoas no mundo. Em áreas endêmicas, cerca de 56.000 novos casos são notificados por ano e aproximadamente 12.000 mortes são relacionadas a doença (1). A infecção é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida por vetores triatomíneos e também por outras vias (congenita, transfusional, transplantes de órgãos, oral e acidentes de laboratório).

O cenário epidemiológico da doença de Chagas vem se alterando nas últimas décadas e, atualmente, a infecção adquirida por via oral (VO) é a forma mais frequente de transmissão no Brasil e em outros países da América Latina, destacando o aumento do número de notificações em áreas antes consideradas não endêmicas e centenas de surtos relacionados a ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou suas excretas (2, 3). Uma maior severidade da infecção oral com *T. cruzi* tem sido observada tanto em modelo murino (4) quanto em pacientes de surtos de doença de Chagas oral da região Amazônica brasileira (2, 5).

As cepas de *T. cruzi* são referidas atualmente como unidades de tipagem distintas (DTU, de TcI a TcVI) (6) e a ampla diversidade genética da espécie pode influenciar suas propriedades biológicas (7), incluindo sua resistência a droga, e deve, portanto, ser levada em consideração no tratamento da doença de Chagas (8, 9).

Benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NX) são as drogas disponíveis para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*, sendo o BZ considerado o medicamento de primeira escolha e o NX destinado aos pacientes que não toleram o BZ (10, 11). O BZ atua por modificação covalente de biomoléculas devido aos intermediários reativos de nitro-redução (12, 10). Embora seu mecanismo de ação seja conhecido, BZ possui baixa eficácia e causa importantes reações adversas na maioria dos pacientes (13). Assim, pesquisas recentes têm buscado novas

alternativas de tratamento para a doença de Chagas, porém, até o momento, sem sucesso ou em fase de testes (9, 14, 15).

Durante décadas anteriores, na quimioterapia experimental da infecção pelo *T. cruzi*, o BZ e NX eram administrados por via oral em dois esquemas terapêuticos: no primeiro os camundongos são submetidos a um tratamento intermitente durante 90 dias (16) e no segundo por 20 dias consecutivos (17). No monitoramento da cura, não se utilizavam técnicas moleculares, hoje, sabidamente mais sensíveis na detecção da falha terapêutica (18, 19, 20). Camundongos experimentalmente infectados com diferentes genótipos de *T. cruzi*, em infecções simples ou duplas, tratados com benzonidazol e com exames parasitológicos sanguíneos e sorológicos negativos, persistem com PCR convencional positiva nos tecidos, onde o DNA de *T. cruzi* ainda é detectado, indicando infecção residual (21).

Além de diferentes protocolos de PCR para análise de diferentes materiais biológicos, como o sangue e outros tecidos, a utilização de imunossupressão por ciclofosfamida (Cy) nos animais submetidos ao tratamento etiológico constitui em um critério de cura mais confiável e seguro (14, 22).

Neste contexto, para o estabelecimento de novos protocolos e pesquisa de novas drogas para tratamento da doença de Chagas, é de suma importância estabelecer critérios experimentais que favoreçam o incremento de novos medicamentos na clínica ou mudanças na terapêutica dos fármacos já existentes, podendo, com isso, alcançar mais benefícios para o paciente.

Considerando que o uso da imunossupressão com Cy e a análise por técnicas moleculares constituem um critério de cura mais aceito atualmente na quimioterapia experimental da doença de Chagas, a nossa hipótese é que o aumento no tempo de tratamento influencia na eficácia do BZ. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de tratamento na eficácia do BZ em camundongos inoculados por via oral e intraperitoneal

com uma cepa de *T. cruzi* IV obtida de surto de doença de Chagas oral na Amazônia Ocidental brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

As diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foram seguidas com relação ao uso, a manutenção e os cuidados com os animais experimentais e aprovadas pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (UEM; parecer número 023/2014). O comitê de ética da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado aprovou o uso e manutenção da cepa obtida de humano na região Amazônica (parecer número 1940/08).

Parasitas e inoculação dos animais

Foi utilizada a cepa AM14 de *T. cruzi* obtida de um caso agudo de doença de Chagas adquirida por via oral, proveniente de surto ocorrido no município de Coari, estado do Amazonas, Amazônia Ocidental brasileira. Esta cepa foi genotipada como TcIV (23) e vem sendo mantida criopreservada no Laboratório de Doença de Chagas da UEM.

Os animais foram inoculados com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura em meio LIT, utilizando um volume de 0,2 mL para a via intraperitoneal (IP) e de 1,0 mL para a via oral (VO) (4, 24).

Animais

Foram utilizados camundongos suíços fêmeas, com idade entre 21-28 dias e pesando entre 18-20 g, fornecidos pelo Biotério Central da UEM e mantidos em gaiolas micro-

ambientadas (Alesco[®]; dimensões de 20 x 32 x 21 cm), ciclo claro-escuro, no biotério do laboratório de doença de Chagas durante todo o experimento.

Tratamento etiológico

Após confirmar a infecção, os animais foram separados em oito grupos com média de peso semelhantes. Os animais foram tratados diariamente, a partir do 10º dia após inoculação (dai), com BZ 100 mg / kg / dia (17). Os seguintes grupos experimentais foram constituídos de acordo com a via de inoculação (IP ou VO) e duração do tratamento (20, 40 ou 60 dias): A) controle não tratado (IP-CNT, n=6); B) controle não tratado (VO-CNT, n=6); C) IP + BZ por 20 dias (IP-TBZ20, n=5); D) VO + BZ por 20 dias (VO-TBZ20, n=5); E) IP + BZ por 40 dias (IP-TBZ40, n=5); F) VO + BZ por 40 dias (VO-TBZ40, n=5); G) IP + BZ por 60 dias (IP-TBZ60, n=5); e H) VO + BZ por 60 dias (VO-TBZ60, n=5). Foram utilizados dois animais de cada grupo CNT (IP e VO) como controles de cada tempo de tratamento.

Imunossupressão

Sete dias após o término do tratamento etiológico, tanto os animais TBZ quanto os animais CNT inoculados por via IP e VO, foram submetidos a um esquema de imunossupressão com ciclofosfamida (Cy) 50 mg / kg / dia durante três semanas, por 4 dias consecutivos na primeira semana e 3 dias consecutivos nas 2 semanas seguintes, segundo protocolo de Diniz et al. (14) modificado. Portanto, o dia de infecção no qual se iniciava o tratamento imunossupressivo variou entre os grupos, sendo iniciado no 37º dai, 57º dai e 74º dai, respectivamente para os animais TBZ20, TBZ40, TBZ60 e seus controles.

Parâmetros parasitológicos e infecciosidade

A parasitemia foi avaliada a partir do 3º dia, através do exame de sangue a fresco (ESF) segundo o protocolo de Brener (25) com o sangue da veia caudal, até a negatização por três dias consecutivos. Na semana após o término do tratamento etiológico assim como na última semana de imunossupressão o ESF foi repetido em dias alternados para obter o percentual de animais com ESF positivo (%ESF+). Os seguintes parâmetros derivados da curva de parasitemia foram determinados: Período patente (PP) médio, que foi calculado como a média dos períodos que cada camundongo teve parasitemia detectada pelo ESF; pico máximo de parasitemia (Pmax), que consiste na média calculada a partir do pico de parasitemia detectado para cada camundongo; dia do pico máximo (Dpmax), que foi a média dos dias em que cada camundongo teve o pico de parasitemia detectado; parasitemia total (PT), que consiste na média da soma da parasitemia diária de cada animal ao longo do experimento; e área sob a curva de parasitemia (ASC).

Vinte e oito dias após o tratamento de cada grupo (TBZ20; TBZ40; TBZ60), foi coletado sangue do plexo venoso retroorbital de cada animal, sendo 200 µL de sangue destinados à PCR em tempo real qualitativa em sangue (qPCRs) e 200 µL para a realização de hemocultura (HC) em meio LIT (3 mL) segundo Filardi e Brener (17). As HC foram incubadas a 28 °C em estufa B.O.D. e as leituras foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias após a coleta. Com os resultados da HC foi obtido o parâmetro porcentagem de animais com hemocultura positiva (%HC+).

Ainda, após eutanásia com overdose de quetamina + xilazina, os animais de cada grupo tiveram o coração retirado *in totum*. Amostras de sangue (100 µL; qPCRs) e um fragmento do coração (30 mg) foram submetidos à extração de DNA pelo método isopropanol/ clorofórmio (26). O DNA obtido foi analisado no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, usando o reagente SYBR green qPCR SuperMix UDG/ROX Platinum (Invitrogen, USA) e o equipamento de termociclagem Rotor-

Gene (Qiagen; 27). A qPCR foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA genômico (gDNA) e os iniciadores TCZ-F (5'GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3') e TCZ-R (5'CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (28). DNA extraído de tecido tanto de camundongo sadio quanto de camundongo infectado com cepa Y (TcII) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A mistura dos reagentes sem o gDNA foi utilizada como controle negativo da amplificação. Com os resultados da qPCR foi possível calcular o parâmetro porcentagem de animais com qPCR positiva (%qPCR+).

A taxa de infecciosidade (%INF) foi calculada a partir dos resultados positivos obtidos nos testes de ESF, HC, qPCRs e qPCRt. As mortes foram registradas durante todo o período de duração de experimento, e a taxa de mortalidade (%MOR) calculada para cada grupo experimental.

Avaliação da eficácia do tratamento

Tanto os animais dos grupos TBZ quanto os animais CNT foram avaliados por ESF, HC e qPCR. A eficácia dos tratamentos foi determinada com base nos índices de cura (IC) obtidos com os diferentes tempos de tratamento. Foi considerado “curado” o animal que apresentava resultado negativo em todas as técnicas citadas acima. Os IC foram obtidos pela razão entre o número de animais curados e o total de animais tratados X 100.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software* BioEstat (versão 5.3, Belém, Pará, Brasil). Foram utilizadas tabelas de frequências com percentual, seguidas de análise de proporções pelos testes Exato de Fisher ou Teste G. Os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney foram utilizados para comparação de médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A %INF de camundongos inoculados com formas metacíclicas de cultura de *T. cruzi* IV tanto por via oral (VO) quanto por via IP foi de 100%, uma vez que todos os animais apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos testes utilizados (ESF, HC e/ou qPCR). Mortes foram registradas durante e após a imunossupressão com ciclofosfamida (Cy), mas a taxa de mortalidade não diferiu entre os grupos, quando estes eram comparados ao mesmo tempo. Já na comparação dois a dois, a %MORT de 50,0 apresentada pelo grupo controle oralmente inoculado (VO-CNT) foi diferente ($p = 0,0495$) dos grupos VO-TBZ40 e VO-TBZ60 que apresentaram %MORT = 0,0 (dados não mostrados).

Em relação à curva de parasitemia, observou-se que os animais do grupo VO-CNT apresentaram maior Pmax, ASC e PT em relação aos animais IP-CNT ($p \leq 0,0104$), e foram semelhantes nos parâmetros PP e Dpmax (Figura 1). Independentemente da via de inoculação, todos os animais apresentaram supressão da parasitemia em até dois dias após início do tratamento com BZ. Após imunossupressão por Cy somente dois animais apresentaram reativação da infecção, ambos pertenciam aos grupos CNT, um inoculado por via IP e o outro por VO, e voltaram a apresentar parasitemia patente 60 e 59 dai respectivamente (Figura 1). Após o período do tratamento etiológico com BZ, apenas os animais dos grupos CNT que foram submetidos à imunossupressão por Cy mais precocemente (à partir 37º dai), voltaram a apresentar parasitemia patente, inoculados tanto por via oral quanto intraperitoneal, sendo diferentes dos grupos TBZ20-IP e TBZ-20VO ($p = 0,0185$).

Os animais tratados por 20 dias apresentaram menor %HC+ quando comparados aos CNT, principalmente os do grupo IP (Tabela 1). Todos os animais que foram tratados por 40 e 60 dias, seja inoculados IP ou VO, apresentaram resultados negativos na HC, diferindo dos animais CNT que apresentaram 100% de positividade. Não houve diferença na %HC+ entre

os grupos inoculados via IP e tratados nos diferentes tempos. Houve redução da %HC+ nos grupos VO-TBZ40 e VO-TBZ60 quando comparados ao grupo VO-TBZ20 ($p = 0,0083$).

As %qPCR_s+ apresentaram grande variação entre os diferentes grupos e os animais tratados por 60 dias apresentaram 0% de positividade (Tabela 1). Os resultados da qPCR em tecido cardíaco foram semelhantes aos do sangue.

Os índices de cura (IC) observados para os animais que receberam tratamento por 60 dias foram numericamente maiores (100% de cura) que os dos grupos tratados por 20 (20% de cura) e 40 dias (75 e 0% de cura; figura 2). Na comparação dentro de cada tempo de tratamento, foi observado que animais inoculados por via IP e tratados por 40 dias mostraram maior IC se comparados aos inoculados VO tratados pelo mesmo tempo. Para os tempos de 20 e 60 dias de tratamento não houve diferença no IC entre as diferentes vias de inoculação. Na comparação entre os grupos TBZ20-IP, TBZ40-IP e TBZ60-IP observou-se maior IC (100,0%) para os animais tratados por 60 dias, diferindo-se entre eles estatisticamente ($p = 0,0200$). Entre os animais inoculados VO, também foi observado IC de 100,0% para o grupo tratado por 60 dias, também com diferença entre os grupos ($p = 0,0005$).

DISCUSSÃO

No Brasil, assim como na maioria dos países endêmicos, o tratamento etiológico da doença de Chagas é realizado administrando-se o medicamento benzonidazol (BZ) em esquema prolongados, no entanto, tanto a evolução da infecção quanto a eficácia do tratamento podem variar de acordo com as características biológicas do parasito (7, 8, 20), a via de inoculação (4) e a forma infectante presente no inóculo (29) logo, a necessidade de se avaliar e padronizar critérios de cura com diferentes metodologias e esquemas de tratamento para quimioterapia experimental da infecção pelo *T. cruzi*.

No presente trabalho foi utilizado a cepa AM14 (TcIV), considerada resistente ao tratamento com BZ em animais experimentalmente infectados pela via IP com tripomastigotas sanguíneos (19, 29, 30) e de cultura acelular (20) sendo que, nestes experimentos o tratamento com BZ foi realizado por vinte dias consecutivos. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o perfil de suscetibilidade ao BZ dessa cepa de *T. cruzi* se manteve como resistente (20% de cura), mesmo na inoculação por via oral e mantendo-se o período de tratamento de vinte dias. No entanto, independente da via de inoculação, foi demonstrado que o prolongamento do tempo de tratamento influencia a resposta do camundongo ao BZ e, conseqüentemente, o perfil de suscetibilidade da cepa a este agente quimioterápico, pois todos os animais que receberam BZ por sessenta dias consecutivos foram considerados curados, utilizando-se critério de cura robusto.

Todos os animais inoculados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* IV se infectaram, porém a evolução da infecção diferiu de acordo com a via de inoculação, sendo que os animais que receberam o parasito pela VO apresentaram infecção mais severa em relação aos inoculados pela via IP diferindo em 60,0% (3/5) dos parâmetros derivados da curva analisados, incluindo um nível de parasitemia cerca de 6 vezes mais elevado no oralmente inoculados, corroborando com os dados obtidos por Teston et al. (4). A capacidade infecciosa por VO dos tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* está relacionada à presença de glicoproteínas de membrana estágio específica, as quais modulam a infecção pela via oral, promovendo a invasão celular pela mucosa gástrica (gp30 e gp82) ou impedindo esta penetração (gp90) (31). Maeda et al. (32) ao estudar uma cepa TcIV observou altas taxas de gp82 e baixos níveis de gp90 ácido sensível, o que poderia promover sua maior penetração pela VO comparado com TcI.

Após tratamento com BZ e imunossupressão com Cy observou-se reativação da infecção, caracterizada pela volta da parasitemia patente (ESF positivo), apenas nos animais

controle não tratados, correspondentes a vinte dias de tratamento. Porém, positividade na HC foi registrada nos animais de todos os grupos controle, concordando com os resultados obtidos por Teston et al. (19) que observaram HC positiva nos camundongos inoculados com a cepa AM14 pela via IP tanto do grupo controle não tratado quanto nos tratados com BZ por 20 dias. Entretanto, no presente estudo os animais inoculados tanto pela VO quanto pela via IP, quando submetidos ao tratamento de 40 e 60 consecutivos com BZ, apresentaram ESF e HC negativos. Estes resultados também ressaltam a importância da complementação do critério de cura com análises moleculares, incluindo a qPCR em tecido cardíaco, o que é contraindicado em pacientes.

Os animais inoculados por via IP e tratados com BZ durante 40 dias (IP-TBZ40) apresentaram 75% de cura enquanto que nenhum animal do grupo VO-TBZ40 foi considerado curado. Isso comprova a pior resposta ao tratamento da infecção oral (4). Além maior sensibilidade da qPCR na comprovação da falha terapêutica. Por outro lado, mesmo com o uso de uma técnica altamente sensível como a qPCR no monitoramento da cura, foi observado um índice de 100% de cura em camundongos infectados por *T. cruzi* (TcIV), independente da via de inoculação, estendendo-se o tempo do tratamento para sessenta dias consecutivos. Ou seja, foi registrado um crescente índice de cura com o aumento no tempo de tratamento, corroborando com Jacobs et al. (33), que verificaram melhora na resposta ao tratamento com o aumento do tempo de medicação.

Extrapolando os resultados da infecção experimental para o uso clínico, o tempo de tratamento em humanos deveria ser de pelo menos 60 dias consecutivos, especialmente para pacientes infectados com TcIV como ocorre nos surtos de doença de Chagas oral na Região Amazônica (23). Vale lembrar que o BZ proporciona várias reações adversas ao organismo, o que implica na desistência da terapêutica por parte dos pacientes. Pessoas com DC têm

dificuldade de prolongar o uso de BZ visto que a toxicidade do medicamento é dose e tempo dependente.

Diante disso, uma grande vertente para os pesquisadores é a descoberta de novas maneiras para minimizar as reações adversas no uso de BZ pelos pacientes sem que sua eficácia terapêutica seja prejudicada. Bustamante e Tarlenton (15) são enfáticos em relatar algumas possibilidades de novas drogas para tratamento da DC, as quais encontram-se em testes confirmatórios, com a esperança de melhora terapêutica assim como serem menos tóxicas ao homem.

Os esquemas terapêuticos anti-*T. cruzi* devem ser determinados empiricamente e os compostos ou substâncias com diferentes mecanismos de ação podem ser combinados para produzir terapias eficazes com toxicidade reduzida (34). Isso relaciona-se diretamente com nossos resultados visto que mostramos a necessidade do aumento no tempo de uso do BZ para se obter a cura, pelo menos no caso da DTU TcIV. Algumas associações de drogas já foram testadas e demonstraram-se promissoras para aumentar a eficácia do tratamento, entre elas a associação do BZ com outros fármacos como cetaconazol (35), BZ e posaconazol (14), alopurinol e clomipramida (36) e alopurinol e BZ (37).

Uma das questões mais relevantes, além da melhoria na eficácia do tratamento etiológico da doença de Chagas, é a falta de ferramentas para identificar e certificar a cura parasitológica definitiva. O uso de testes distintos pode oferecer melhores contribuições e avanços no consentimento mútuo do critério de cura entre pesquisadores (38). Os resultados obtidos no presente estudo favorecem uma mudança de protocolos utilizados há décadas para quimioterapia experimental contra o *T. cruzi*, principalmente no que se refere ao tempo de tratamento de animais infectados assim como da utilização de metodologias complementares entre si (ESF, HC, PCR e imunossupressão). Uma forma moderna que pode ser utilizada em

conjunto com estas metodologias é o uso de exames de imagem por bioluminescência *in vivo* (39).

Em suma, a cura da infecção murina experimental por *T. cruzi* (TcIV) foi diretamente relacionada ao tempo de tratamento com benzonidazol. O uso da droga de referência por sessenta dias consecutivos proporcionou índice de cura de 100% em camundongos inoculados pela via oral e intraperitoneal, utilizando como critério de cura exames parasitológicos e moleculares em animais imunossuprimidos. O que sugere mudança nos critérios de cura para quimioterapia experimental murina da infecção por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

1. WHO. 2015. Fact Sheet 340: Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Pinto AY, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. 2008. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. A study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 41: 602–614. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000600011>.
3. Dias JCP, Ramos Jr AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR 2015. Brazilian Consensus on Chagas Disease. *Epidemiol. Serv. Saúde* 25:7-86. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.
4. Teston APM, Abreu AP, Abegg CP, Gomes ML, Toledo MJO. 2017. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. *Acta Trop* 166:212–217. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.019>.
5. Pinto AYN, Valente VC, Ferreira SMAG, Ferreira Jr AG, Valente SAS. 2010. Alterações eletrocardiográficas durante e após tratamento com benzonidazol em fase aguda de doença de

- Chagas autóctone da Amazônia brasileira. Rev Pan-Amazônica Saúde 1:67–78.
<http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200008>.
6. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiaria E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104 (7):1051 - 1054.
 7. Toledo MJO, de Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Coelho GLL, Veloso VM, Barnabe c, Tibayrenc M, Tafuri WL. 2002. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. Exp Parasitol 100:161–172.
 8. Toledo MJO, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho AO, Tibayrenc M, Barnabe C, Tafuri WL, de Lana M. 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother 47:223–230. <https://doi:10.1128/AAC.47.1.223-230.2003>.
 9. Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman, AG, Ribeiro I. 2014. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz 109(6):828-833. <https://doi:10.1590/0074-0276140156>.
 10. Mecca MM, Bartel LC, Castro CR, Castro JA. 2008. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(6):549-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000600007>.
 11. Rassi AJr, Rassi A, Marin-Neto JÁ. 2010. Chagas disease. Lancet 375:1388-1402.
 12. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*

- and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146:601-620. <https://10.1016/j.cbpa.2006.03.004>.
13. Urbina JA, Docampo R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19(11):495-501.
 14. Diniz LF, Urbina JA, Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TAF, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT. 2013. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLoS Negl Trop Dis* 7(8):e2367. <https://10.1371/journal.pntd.0002367>.
 15. Bustamante JM, Tarleton RL. 2014. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Rev Clinical Pharmacology* 7:317-325. <https://doi:10.1586/17512433.2014.909282>.
 16. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ* 63, 721–726.
 17. Filardi LS, Brener Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:755–759. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90020-4).
 18. Miyamoto CT, Gomes ML, Marangon AV, Araújo SM, Bahia MT, Lana M, Toledo MJO. 2006. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Exp Parasit* 112:198–201. <https://10.1016/j.exppara.2005.10.006>.
 19. . Teston APM, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GDP, Gomes ML, Araujo SM, Bahia MT, Barbosa MG, Toledo MJO. 2013. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health*. 18:85-95. <https://doi:10.1111/tmi.12014>.

20. Gruending AP, Massago M, Teston APM, Monteiro WM, Kaneshima EN, Araújo SM, Gomes ML, Barbosa MG, Toledo MJO. 2015. Impact of benznidazole on infection course in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* I, II and IV. *Am J Trop Med Hyg* 96(6):1178-89. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0690>.
21. Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JC, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Vitelli-Avelar DM, Bahia MT, Martins-Filho OA, Macedo AM, Lana M. 2008. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemother* 61(6):1319-1327. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn092>.
22. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 14(5):542-550. <https://doi.org/10.1038/nm1744>.
23. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJO, Borges L, et al. (2012) *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS ONE* 7(7):e41284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041284>.
24. Dias, G.B.M., Gruending, A.P., Araújo, S.M., Gomes, M.L., Toledo, M.J.O. 2013. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol* 135: 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.08.013>.
25. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1962; 4: 389–396.
26. Caldas S, Caldas IS, Diniz L de F, Lima WG, Oliveira Rde P, Cecílio AB, Ribeiro I, Talvani A, Bahia MT. 2012. Real-time PCR strategy for quantification in blood and tissue samples of

- experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Tropica, 123, 170-177. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2012.05.002>.
27. Valdez RH, Tonin LT, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Dias Filho BP, Kaneshima EN, Yamada-Ogatta SF, Yamauchi LM, Sarragiotto MH, Nakamura CV. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino) phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. Antimicrob Agents Chemoter. 56 (2012) 507-5012. <https://doi:10.1128/AAC.05575-11>.
28. Cummings KL, Tarleton RL. 2003. Rapid quantification of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol. 129 53-59. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8).
29. Massago M. 2016. Evolução da infecção e resposta ao tratamento com benzonidazol em camundongos inoculados pela via oral com *Trypanosoma cruzi* IV. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.
30. Monteiro, W.M., Teston, A.P.M., Gruendling, A.P., Reis, D., Gomes, M.L., Araujo, S.M., Bahia, M.T., Magalhães, L.K.C., Guerra, J.A.O., Silveira, H., Toledo, M.J.O., Barbosa, M.G.V., 2013. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2069. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002069>.
31. Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Int 2008; 57: 105–109. <https://10.1016/j.parint.2007.12.008>.
32. Maeda FY, Clemente TM, Macedo S, Cortez C, Yoshida N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. Parasit Vectors 2016; 9 (1): 189 – 201. <https://10.1186/s13071-016-1455-z>.

33. Jacobs RT, Nare B, Wring SA, Orr MD, Chen D, Sligar JM, Jenks MX, Noe RA, Bowling TS, Mercer LT, Rewerts C, Gaukel E, Owens J, Parham R, Randolph R, Beaudet B, Bacchi CJ, Yarlett N, Plattner JJ, Freund Y, Ding C, Akama T, Zhang YK, Brun R, Kaiser M, Scandale I, Don R. 2011. SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001151>.
34. Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. 2014. New, Combined, and Reduced Dosing Treatment Protocols Cure *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *Journal of Infectious Diseases* 209(1):150–162. <https://10.1093/infdis/jit420>.
35. Araujo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z. 2000. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 45:819-824.
36. Gobbi P, Baez ALO, Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes RGEAS, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. 2010. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 107:1279-1283. <https://10.1007/s00436-010-2002-z>.
37. Mazetti AL. Benznidazol em combinação com alopurinol : aumento da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
38. Lana M, Martins-Filho AO. 2015. Revisiting the Posttherapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts? *BioMed Research International*. Article ID 652985,10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/652985>.

39. Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. 2015. Limited Ability of Posaconazole to Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4653–4661. <http://doi:10.1128/AAC.00520-15>.

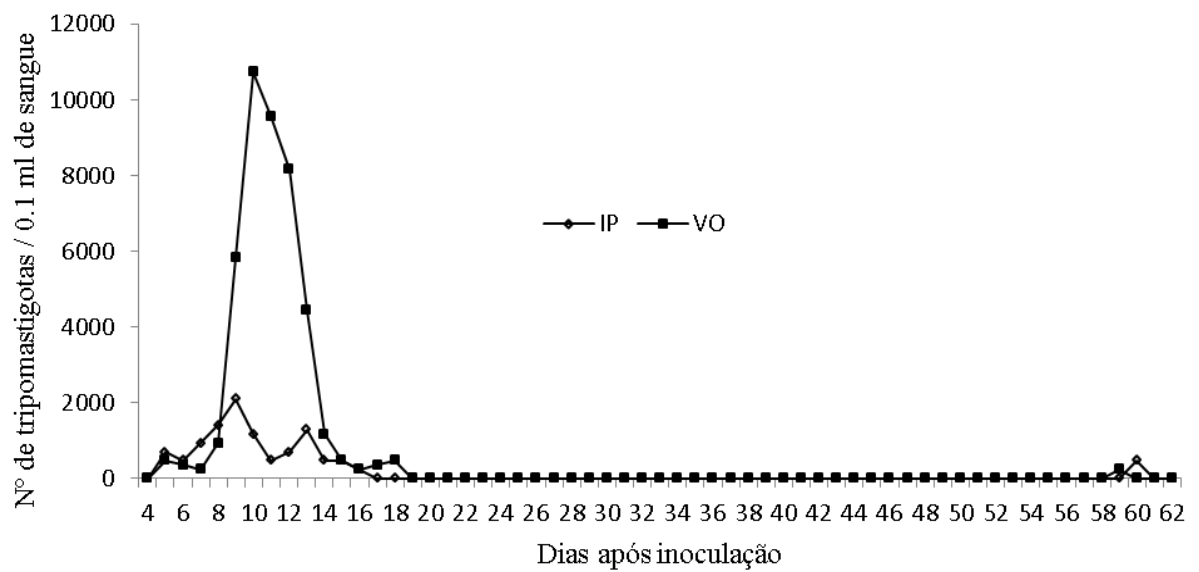


FIGURA 1. Curva de parasitemia média de camundongos suíços inoculados por via intraperitoneal (IP) e por via oral (VO) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura acelular / animal de *Trypanosoma cruzi* (cepa AM14 – TcIV), e imunossuprimidos com ciclofosfamida 50 mg/kg a partir do 37º dia após a inoculação.

TABELA 1. Taxas de positividade do exame de sangue a fresco (%ESF+), hemocultura (%HC+) e PCR em tempo real (qPCR) em sangue e tecido cardíaco de camundongos inoculados por via intraperitoneal (IP) e oral (VO) com *Trypanosoma cruzi* (capa AM14-TcIV), tratados com benznidazol 100 mg / kg /dia (TBZ) durante 20, 40 e 60 dias consecutivos e controles não tratados (CNT)

	%ESF+	%HC+	%qPCRs+	%qPCRt+
IP-CNT	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	0,0 (0/1)	0,0 (0/1)
VO-CNT	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)
IP-TBZ20	0,0 (0/4)	50,0 (2/4)	50,0 (2/4)	50 (2/4)
VO-TBZ20	0,0 (0/4)	75,0 (3/4)	25,0 (1/4)	20 (1/5)
IP-CNT	0,0 (0/2)	100,0 (2/2)	0,0 (0/2)	100,0 (2/2)
VO-CNT	0,0 (0/2)	-	-	0,0 (0/1)
IP-TBZ40	0,0 (0/4)	0,0 (0/4)	25,0 (1/4)	0,0 (0/4)
VO-TBZ40	0,0 (0/5)	0,0 (0/5)	80,0 (4/5)	80 (4/5)
IP-CNT	0,0 (0/2)	100,0 (2/2)	100,0 (2/2)	100,0 (1/1)
VO-CNT	0,0 (0/2)	100,0 (2/2)	50,0 (1/2)	100,0 (1/1)
IP-TBZ60	0,0 (0/4)	0,0 (0/4)	0,0 (0/4)	0,0 (0/5)
VO-TBZ60	0,0 (0/5)	0,0 (0/5)	0,0 (0/5)	0,0 (0/5)

%ESF+: porcentagem de animais com exame de sangue a fresco positivo após tratamento e imunossupressão; %HC+: porcentagem de animais com hemocultura positiva; %qPCRs+: porcentagem de animais com qPCR positiva em sangue; %qPCRt+: porcentagem de animais com qPCR positiva em tecido cardíaco.

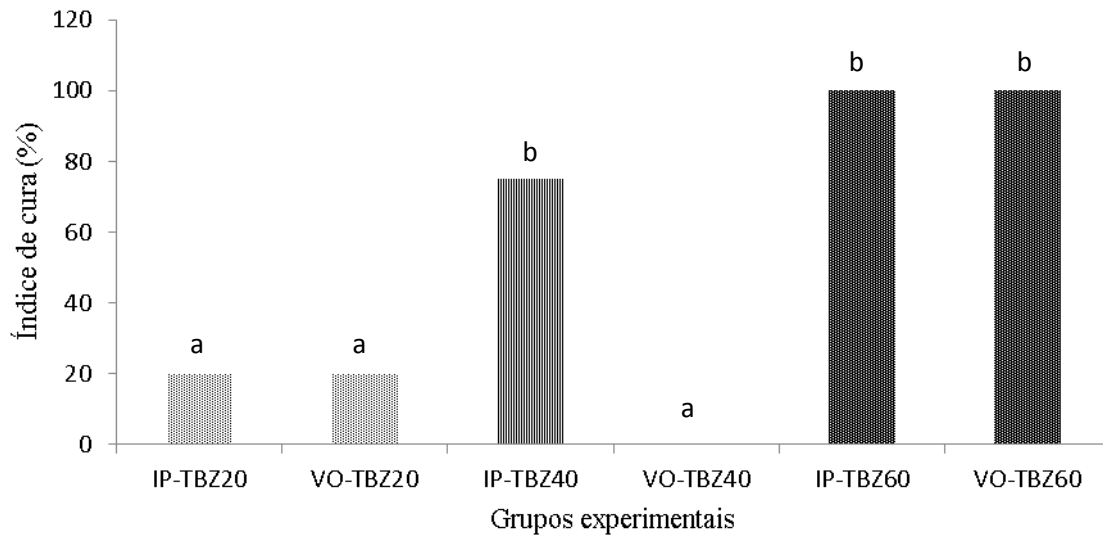


FIGURA 2. Índices de cura obtidos em camundongos suíços inoculados por via intraperitoneal (IP, $n = 13$) e por via oral (VO, $n = 15$) com *Trypanosoma cruzi* (cepa AM14 – TcIV), tratados com benzonidazol (100 mg / kg / dia), durante 20 ($n = 10$), 40 ($n = 9$) ou 60 ($n = 9$) dias consecutivos. Inóculo: 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura acelular / animal. Início do tratamento: 10º dia após a inoculação. Letras diferentes (“a” e “b”) representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$), exceto na comparação entre os grupos TBZ20 x TBZ40. Teste exato de Fisher ou teste G.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Este estudo sobre avaliação da eficácia da quimioterapia experimental com benzonidazol e óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Syzygium aromaticum* em camundongos inoculados com *Trypanosoma cruzi* II e IV mostrou que:

- A cepa Y de *T. cruzi* quando inoculada por via oral é resistente ao tratamento com benzonidazol.
- O benzonidazol apresenta maior efeito supressivo sobre a parasitemia.
- O tratamento com os óleos essenciais de *C. citratus*, *Z. officinale* e *S. aromaticum* alteraram o perfil da curva de parasitemia, com destaque para o óleo essencial de *S. aromaticum* que proporcionou a redução de todos os parâmetros derivados quando comparado aos animais não tratados.
- O tratamento com o óleo essencial de *S. aromaticum* na dose de 100 mg/kg proporcionou o maior índice de cura entre os grupos tratados, apresentando maior eficácia que o medicamento de referência, benzonidazol.
- A infecção causada por tripomastigotas metacíclicos de inseto, simpátricos ao vetor, leva a um quadro infeccioso mais intenso do que aquele ocasionado por tripomastigotas metacíclicos de cultura.
- Camundongos inoculados por via oral com 2×10^4 tripomastigotas metacíclicos de inseto da cepa AM14 (TcIV) não responderam ao tratamento etiológico, sendo esta cepa considerada resistente ao benzonidazol.
- A cepa Y (TcII) proveniente de cultura foi parcialmente resistente ao óleo essencial de *S. aromaticum* (índice de cura de 44%??) na dose de 100 mg / kg. Por outro lado, a

cepa AM14 (TcIV) proveniente de vetor mostrou-se resistente a este tratamento, sugerindo que a genética do parasito pode influenciar sua suscetibilidade a droga.

- Pode haver um sinergismo de efeitos no uso da associação de benzonidazol e óleo essencial de *S. aromaticum*, uma vez que, o índice de cura obtido foi numericamente superior ao obtido com o tratamento com ambos isoladamente.
- O aumento do tempo de tratamento com BZ de 20 para 60 dias consecutivos promove a cura parasitológica de camundongos oralmente inoculados com cepa TcIV resistente a droga.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar parâmetros histopatológicos e imunológicos em infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* e tratados com óleos essenciais;
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais testados para continuidade com maior segurança em experimentos pré-clínicos e clínicos;
- Estudar a eficácia destes óleos essenciais frente a uma maior diversidade genética do *T. cruzi*;
- Avaliar a eficácia em experimentos *in vivo* dos componentes majoritários dos óleos essenciais isoladamente ou em associação com medicamentos de referência ou produtos naturais promissores contra *T. cruzi*;
- Estudar a farmacocinética e a biodisponibilidade dos óleos essenciais a fim de maximizar seu potencial de uso na terapêutica;
- Estudar o mecanismo de ação dos óleos essenciais e/ou seus constituintes para controle da infecção por *T. cruzi*.
- Avaliar a eficácia do tratamento com BZ, administrado por 60 dias consecutivos, em camundongos infectados com outras cepas/DTU de *T. cruzi*.