



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FACFAN

Curso de Farmácia

MILENA PEREIRA BATISTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LEVAMISOL SOBRE A  
MORFOLOGIA E MULTIPLICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Campo Grande, MS

2023

MILENA PEREIRA BATISTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LEVAMISOL SOBRE A  
MORFOLOGIA E MULTIPLICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a graduação no curso de Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alda Maria Teixeira Ferreira

Campo Grande, MS

2023

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e a minha família por serem a minha base e a minha vida. Eu não seria metade do que sou sem vocês. A minha mãe, irmã e sobrinha: vocês me fazem acreditar que posso ser e conquistar o mundo todo. Vocês me trouxeram até aqui, essa conquista é de vocês também. Ao meu pai, que já se foi: tudo em mim tem partes de você. Esse é o maior presente que eu poderia ter recebido;

À todos os meus amigos e colegas que carregaram o peso da graduação junto comigo. Só nós sabemos o que carregamos até aqui. Foi uma honra e uma alegria estar com vocês durante o processo;

Aos incríveis professores Davi Campos La Gatta e Alessandra Gutierrez de Oliveira por terem aceitado o convite para a banca, e, especialmente, à professora Alda, pelos dois anos de ensinamentos e aprendizados;

A minha parceira de laboratório, Pietra Sater, pelo apoio, companheirismo e amizade. Foi Deus quem te colocou no meu caminho. Sem você seria muito mais difícil chegar até aqui;

E, finalmente, à UFMS. Um dia eu sonhei em estar aqui e esta instituição me abriu caminho para os meus sonhos.

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> – Medicamentos usados para tratamento da fase aguda da doença de Chagas .....	9
<b>Figura 2</b> – Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
<b>Figura 3</b> – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
<b>Figura 4</b> – Tetramisol e seus isômeros.....	13
<b>Figura 5</b> – Metabólito ativo do levamisol.....	13
<b>Figura 6</b> – Montagem da placa de teste .....	17
<b>Figura 7</b> – Recorte da placa de 96 poços após adição de MTS.....	18
<b>Figura 8</b> – Áreas de contagem da câmara de Neubauer.....	19
<b>Figura 9</b> – Formas epimastigotas não tratadas com 72 horas de crescimento (controle).....	20
<b>Figura 10</b> – Comparação da morfologia dos parasitos tratados com levamisol.....	21

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1** - Características físico-químicas do levamisol..... 12

**Tabela 2** – Média dos valores de absorbância da placa de teste.....19

**Tabela 3** – Resultado de contagens de parasitos em câmara de Neubauer..20

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LEVAMISOL SOBRE A MORFOLOGIA E MULTIPLICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

**RESUMO:** O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, uma das doenças consideradas pela Organização Mundial da Saúde como negligenciadas. O parasito tem a capacidade de causar parasitemia e, eventualmente, invadir tecidos. Os medicamentos destinados ao tratamento para essa doença são eficazes, mas causam muitos efeitos adversos, por isso a adesão ao tratamento é baixa. Diante desse cenário, há a busca por alternativas farmacoterapêuticas, porém esse caminho esbarra em barreiras comuns à descoberta de novos medicamentos, como tempo e recursos. Por isso, o reposicionamento de fármacos se mostra uma alternativa viável, pois demanda menos tempo e/ou recursos. O levamisol é um medicamento da classe dos anti-helmínticos, com efeito imunomodulador, usado para o tratamento de ascaridíase. Artigos recentes ainda apontam sua atividade em formas de *Giardia* sp. Seu mecanismo de ação se dá por interferência enzimática no parasito e, por causa disso, investiga-se a possibilidade de ter atividade contra cepas de *Trypanosoma cruzi*. A atividade do fármaco foi avaliada de três formas: através de teste com MTS, com a concentração de 200ug/mL do fármaco e incubação a 37°C por 72 horas; contagem de parasitos em câmara de Neubauer com concentração de 400ug/mL do fármaco; e análise da morfologia do protozoário através de lâmina de microscopia fixada com paraformaldeído a 4% e corada pelo método Panócito. Como controle, para os três métodos, foi utilizada cultura sem adição do fármaco. O crescimento do parasito foi verificado em 24 horas e em 72 horas e, ao final, foi feita a análise morfológica. A partir dos resultados dos testes foi avaliada a interação desse fármaco com o parasito. Com base nessa avaliação, será possível, futuramente, estipular o efeito desse fármaco como imunomodulador em células infectadas com o parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Levamisol, Doença de Chagas.

**ABSTRACT:** The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas Disease, one of the diseases considered by the World Health Organization to be neglected. The parasite has the ability to cause parasitemia and eventually invade tissues. The drugs used to treat this disease are effective, but cause many adverse effects, which is why adherence to treatment is low. Faced with this scenario, there is a search for pharmacotherapeutic alternatives, but this path comes up against common barriers to the discovery of new drugs, such as time and resources. For this reason, drug repositioning is a viable alternative, as it requires less time and/or resources. Levamisole is a drug from the anthelmintic class, with an immunomodulatory effect, used to treat ascariasis. Recent articles also point to its activity in forms of *Giardia* sp. Its mechanism of action is through enzymatic interference in the parasite and, because of this, the possibility of it having activity against strains of *Trypanosoma cruzi* is being investigated. The drug's activity was assessed in three ways: through the MTS test, with a concentration of 200ug/mL of the drug and incubation at 37°C for 72 hours; counting parasites in a Neubauer chamber with a concentration of 400ug/mL of the drug; and analyzing the morphology of the protozoa using a microscope slide fixed with 4% paraformaldehyde and stained using the Panocyte method. A culture without the addition of the drug was used as a control for the three methods. Parasite growth was checked at 24 hours and 72 hours and, at the end, a morphological analysis was carried out. Based on the results of the tests, the interaction between the drug and the parasite was evaluated. Based on this evaluation, it will be possible in the future to determine the effect of this drug as an immunomodulator in cells infected with the parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Levamisol, Chagas disease.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1	Doença de Chagas .....	8
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
1.3	Cloridrato de levamisol .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	Geral .....	15
2.2	Específicos .....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1	Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
3.2	Fármaco .....	16
3.3	Ensaio colorimétrico com MTS/PMS .....	16
3.4	Avaliação da multiplicação dos parasitos .....	17
3.5	Avaliação da morfologia dos parasitos .....	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
4.1	Ensaio colorimétrico com MTS/PMS .....	18
4.2	Avaliação da multiplicação dos parasitos .....	19
4.3	Avaliação da morfologia dos parasitos .....	20
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

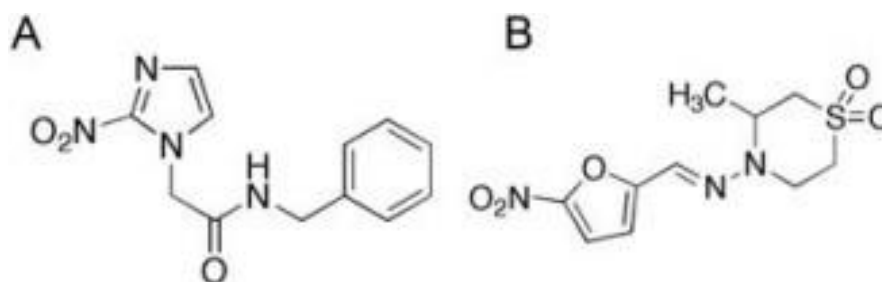
A tripanossomíase americana, conhecida por Doença de Chagas (Chagas, 1909), é uma doença endêmica no continente americano, considerada uma das 17 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Estima-se que, no mundo, 8 milhões de pessoas estejam infectadas e mais de 10 mil venham a óbito por dia em função dessa doença (WHO, 2017). Segundo o Ministério da Saúde (2021), a doença afeta aproximadamente 1 milhão pessoas no Brasil.

A doença cursa por duas fases: aguda e crônica. A fase aguda acontece imediatamente após a infecção, na forma de reações inflamatórias decorrentes das lesões causadas pela entrada do protozoário. Sintomas inespecíficos podem aparecer, como febre e cefaleia. Os sintomas característicos que podem aparecer nessa fase são o Sinal de Romana e o Chagoma de inoculação, ambos caracterizados por inchaço no local de penetração do parasito (Barrett e Croft, 2012; Dias e Coura, 1997). Nesta fase, acontece alta parasitemia e o diagnóstico pode ser feito através da visualização do parasito no sangue periférico em microscopia óptica (Dias e Coura, 1997).

Após a fase aguda, os pacientes entram em uma fase indeterminada onde os sintomas desaparecem. Essa fase pode durar de 5 a 15 anos (Dias e Coura, 1997). Posteriormente a esse período, uma parte dos pacientes apresenta alterações características da forma crônica da doença: modificações no trato digestivo, no sistema nervoso ou, principalmente, alterações cardíacas (Barrett e Croft, 2012). Nessa fase, a parasitemia é baixa ou inexistente, por isso o diagnóstico deve ser feito através de exames sorológicos, biologia molecular ou outros métodos (Dias et al, 2016).

O tratamento disponível para essa condição envolve apenas dois medicamentos: o Benznidazol e o Nifurtimox. Os dois medicamentos agem através da formação e acúmulo de radicais livres derivados do nitrogênio em sua estrutura que sobrecarregam a capacidade antioxidante do parasito (Pan et al, 2013).

**Figura 1** – Medicamentos usados para tratamento da fase aguda da doença de Chagas. (A) Benznidazol e (B) Nifurtimox.



**Fonte:** Barrett e Croft, 2012

O Benznidazol, de peso molecular 260.25g/mol, é bem absorvido por via oral, tem seu pico plasmático em até 4 horas e seu tempo de meia vida é de 12 horas. Produz alguns metabólitos que são eliminados pela urina e pelas fezes, mas é eliminado quase totalmente inalterado por via renal. O Nifurtimox, de peso molecular 287.29g/mol, também é bem absorvido por via oral, mas alcança pico plasmático em 3,5 horas. Seu tempo de meia vida é mais curto, 3 horas, e a metabolização produz acúmulo de metabólitos não identificados (De Fátima Oliveira, 2008; Alexandre, 2014).

Ambos os medicamentos são altamente tóxicos, apresentando diversos efeitos adversos, e não apresentam efetividade na fase crônica da doença (Castro et al, 2006; Urbina & Docampo, 2003). Essas características fazem com que o tratamento seja difícil e de baixa adesão.

O diagnóstico pode ser feito por diversos métodos, que variam de acordo com a fase da doença. Na fase aguda, o método mais indicado é o exame direto por microscopia óptica, para visualização do parasito no sangue periférico. Métodos sorológicos podem ser utilizados em caráter complementar. Na fase crônica, devido à baixa parasitemia, os métodos sorológicos são mais indicados. A infecção é confirmada pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi* do tipo IgG em dois testes sorológicos de fundamentação diferentes (Dias et al, 2016).

A dificuldade de tratamento e diagnóstico da doença se dá, entre outros fatores, pela capacidade do protozoário causador de se adaptar e escapar do sistema imune do hospedeiro.

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, pertencente à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida. Uma característica dos protozoários pertencentes a essa ordem é a presença de uma mitocôndria única, que abriga o DNA mitocondrial, concentrado em uma região chamada cinetoplasto ou kinetoplasto e, portanto, o DNA mitocondrial é denominado cDNA ou kDNA (Neves et al, 2005; Votýpka et al, 2015).

Durante seu ciclo de vida, o parasito passa por três formas evolutivas principais: tripomastigotas (metacíclicas e sanguíneas), epimastigotas e amastigotas. A forma tripomastigota metacíclica é infectante ao hospedeiro vertebrado (como o homem) e está presente no sangue periférico. Tem capacidade de infectar células, mas não de se replicar. A forma amastigota está presente dentro das células do hospedeiro vertebrado e possui a capacidade de se replicar. A forma epimastigota está presente no inseto vetor etambém tem capacidade de se replicar (Brener, 1973; Chagas, 1909; Tyler e Engman, 2001).

**Figura 2** – Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.

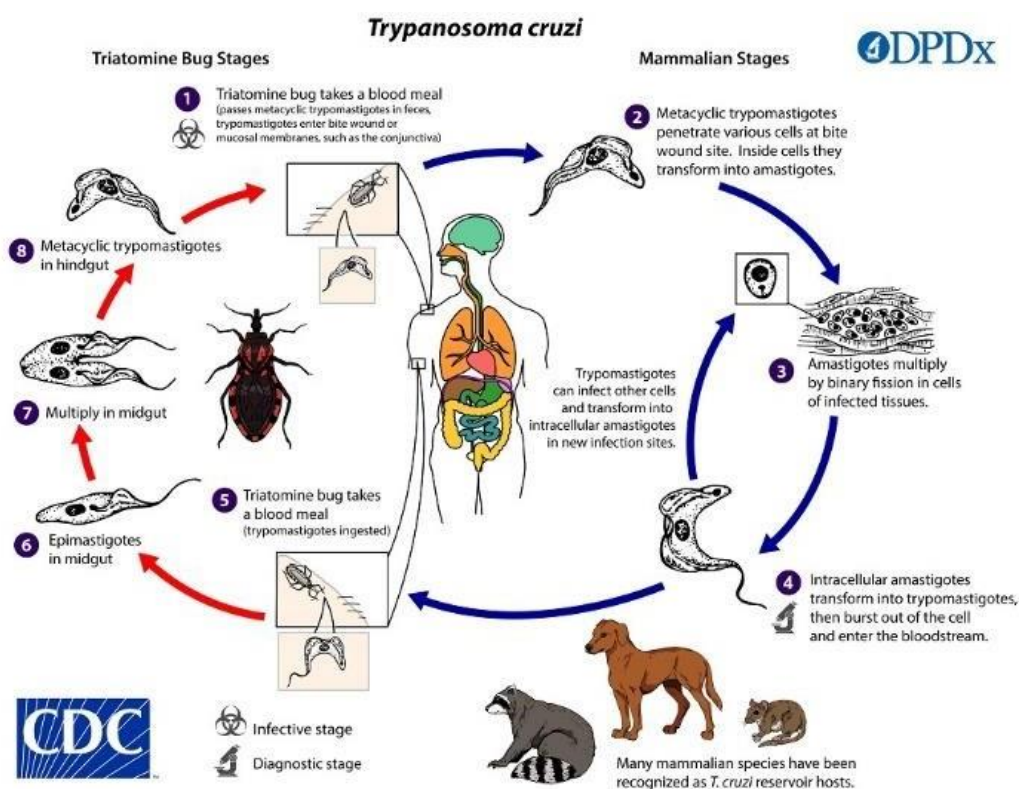


Fonte: Tavares, 2016

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* é heteroxênico, ou seja, possui dois hospedeiros. No hospedeiro invertebrado — o inseto vetor da subfamília Triatominae — o parasito, na forma epimastigota, se multiplica e se diferencia em formas tripomastigotas metacíclicas. Essa forma evolutiva tem capacidade de infectar células humanas e pode infectar o hospedeiro vertebrado através das fezes do vetor, que defeca durante o repasto sanguíneo e libera os parasitos. No hospedeiro infectado, os tripomastigotas metacíclicas invadem as células e se diferenciam em

amastigotas. As formas amastigotas se multiplicam e novamente se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas para sair da célula, podendo infectar novas células e tecidos (Brener, 1973; Chagas, 1909; Neves et al, 2005; Tyler e Engman, 2001).

**Figura 3** – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: CDC, 2019

A transmissão vetorial, apesar de ser a mais conhecida, não é a mais frequente. Atualmente, com os esforços de combate ao inseto vetor, a transmissão oral, através de alimentos, e a transmissão congênita são as mais frequentes (Dias et al, 2016).

### 1.3 Cloridrato de levamisol

Diante do exposto nos itens acima, fica clara a necessidade de avanços no tratamento dessa doença. Uma das alternativas é o reposicionamento de fármacos, para que se alcance uma farmacoterapia efetiva, que evite a evolução da doença para casos gravíssimos.

O reposicionamento de fármaco é uma prática comumente utilizada na atuação clínica, além de ser alvo de muitas pesquisas. Essa prática supera muitas barreiras do descobrimento de novos fármacos, como recursos financeiros e tempo de

investimento, uma vez que é de uma composição já previamente aprovada para uso. Um exemplo dessa prática é o uso do ácido acetilsalicílico, aprovado para uso como anti-inflamatório, mas comumente utilizado como antiagregante plaquetário (Silva, 2015).

O cloridrato de levamisol é um anti-helmíntico eficiente e de amplo espectro para o tratamento de nematóides gastrointestinais em seres humanos e em animais (Amery e Bruynseels, 1992), podendo também atuar como imunomodulador (Stogaus e King, 1995). As características físico-químicas desse fármaco são apresentadas na tabela a seguir.

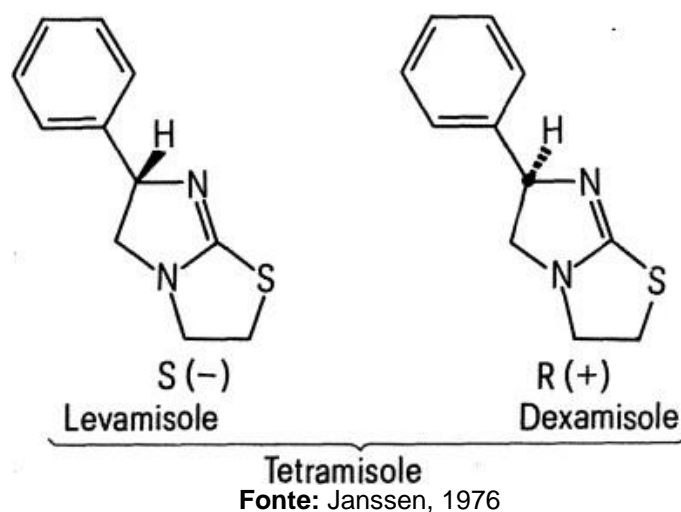
**Tabela 1** – Características físico-químicas do levamisol.

Nomenclatura IUPAC: (6S)-6-phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole
Fórmula molecular: C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S
Peso molecular: 204.29g/mol
LogP (octanol/água): 1,84
Tempo de meia-vida: 4-6 horas

**Fonte:** Pubchem; Drugbank.

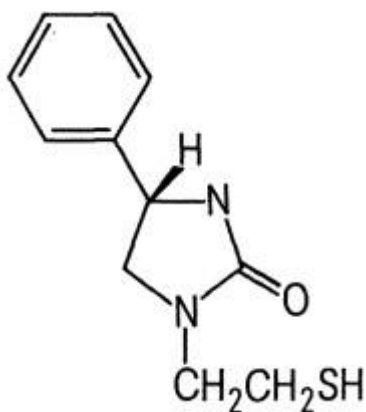
O levamisol é o levoisômero da mistura racêmica que compõe o Tetramisol, no qual está vinculado o efeito antihelmíntico do composto (Amery e Bruynseels, 1992). Seu mecanismo de ação se dá pela paralisia muscular dos helmintos, que não conseguem se aderir a parede da mucosa intestinal e acabam sendo eliminados (Martin, 1993). A paralisia causada pelo fármaco acontece de duas formas: pela ligação com a enzima succinato desidrogenase, o que impede a conversão de succinato em fumarato, com consequente interrupção do ciclo de Krebs e produção de ATP e; pela ligação à canais nicotínicos, causando despolarização da membrana e paralisia neuromuscular (Janssen-Cilag Farmacêutica LTDA).

**Figura 4** – Tetramisol e seus isômeros.



As moléculas de levamisol penetram pelas membranas do helminto e, ao chegar ao seu local de ação, são hidrolizadas e formam o metabólito ativo que interage com seu sítio de ação (enzima succinato desidrogenase) (Janssen, 1976).

**Figura 5** – Metabólito ativo do levamisol.



**Fonte: Janssen, 1976**

A atuação do levamisol sobre o metabolismo energético do helminto – mesmo com as diferenças fundamentais entre helmintos e protozoários – é a característica que permite a suspeita de que esse fármaco pode atuar sobre formas de *Trypanosoma cruzi*.

Ribeiro e colaboradores (2015) produziram e caracterizaram um sistema microemulsionado com levamisol, o qual apresentou efeito estimulador da fagocitose e da destruição intracelular de *Entamoeba histolytica* (Ribeiro et al, 2015) e *Giardia* sp (Hernandes et al, 2017). Com base nesses resultados, ambos os autores sugerem

que o sistema de liberação microemulsionado com levamisol representa uma alternativa para uso em terapia contra parasitos ou como agente imunomodulador (Ribeiro, 2016). Nesse sentido, faz-se necessário avaliar cautelosamente os efeitos, quando presentes, de levamisol sobre o parasito, afim de que seu efeito imunomodulador sobre células infectadas *in vitro* pela cepa Dm28c de *T.cruzi* possa ser avaliado sem qualquer interferência.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do levamisol em formas replicativas de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a multiplicação *in vitro* de formas epimastigotas de *T.cruzi* tratadas com levamisol;

Avaliar a morfologia dos parasitos após tratamento com levamisol;

Avaliar a viabilidade de formas epimastigotas de *T.cruzi* tratadas com levamisol.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de *Trypanosoma cruzi*:

Formas epimastigotas de *T.cruzi* Dm28c foram mantidas em cultura a 28°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques periódicos. Para os experimentos foram utilizados parasitos em fase exponencial de crescimento.

Neste trabalho, foram utilizadas formas epimastigotas por questões de segurança do pesquisador, por não ser a forma infectante, e também por ser a padronização de triagem do Grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

#### 3.2 Fármaco:

Levamisol (*Levamisole hydrochloride* — Merck Cas: 16595-80- 5).

#### 3.3 Ensaio colorimétrico com MTS/PMS

O princípio do ensaio de viabilidade com MTS/PMS é a redução do MTS ao produto Formazan, que possui coloração roxa. O MTS não é capaz de entrar na célula, por isso – em presença de viabilidade celular – o PMS penetra na célula e transfere os elétrons do NADH para o MTS, que é reduzido ao produto Formazan (Kuate, Karaosmanoğlu & Sivas, 2017).

O efeito do levamisol sobre a viabilidade de formas epimastigotas do parasito foi determinado pelo ensaio do MTS (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-5-(3carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) (Henriques, 2011). Células em fase exponencial foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL e transferidas para placas de 96 poços. As células foram incubadas por 72h na presença de várias concentrações do fármaco (200ug/mL, 100ug/mL, 50ug/mL e 25ug/mL), em triplicata, e mantidas a 28°C. Após a incubação, foi adicionada a solução de MTS a cada poço e as placas foram incubadas por 4h a 37°C. Posteriormente, a densidade óptica foi medida, em 492nm em um leitor  $\mu$ Quant. Como controle foi utilizada uma cultura de parasitos sem adição do fármaco.

A recorte de interesse da montagem da placa de teste é apresentada a seguir.

**Figura 6** – Montagem da placa de teste.



### 3.4 Avaliação da multiplicação dos parasitos

O efeito do levamisol sobre a multiplicação de formas epimastigotas do parasito foi determinado por meio de contagem em câmara de Neubauer. Em uma cultura, com inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, foi adicionado o fármaco testado em concentração de 400ug/mL. A concentração testada foi escolhida em função da falta de resultados no teste com 200ug/mL, por isso a concentração foi extrapolada. A cultura sem adição do fármaco foi utilizada como controle para esse ensaio. Todo o experimento foi realizado em triplicata e mantido a 28°C. O crescimento do parasito foi verificado em 24 horas e em 72 horas, por meio de contagens na câmara de Neubauer.

### 3.3 Avaliação da morfologia dos parasitos

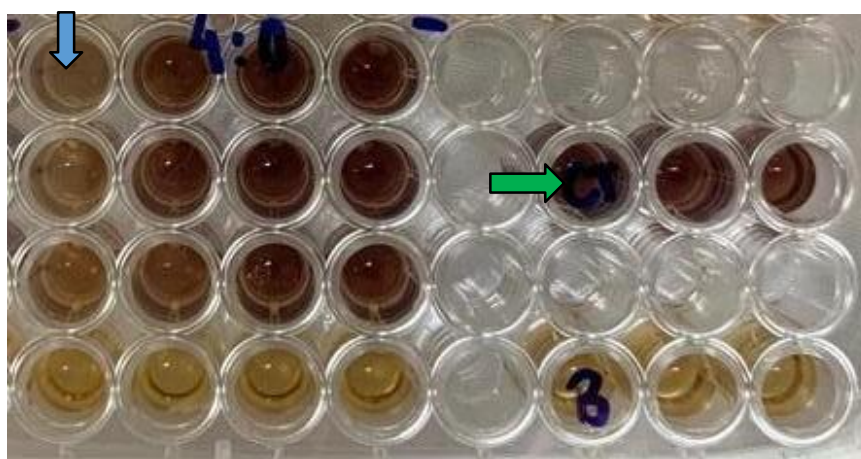
A fim de observar se o tratamento com levamisol provoca alguma alteração morfológica nas formas epimastigotas de *T.cruzi*, foi realizada a análise da mesma por microscopia óptica, após 72 horas. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 2.000xg por 5 minutos, lavados uma vez em PBS 1X e fixados com paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Então foram aplicados  $5 \times 10^5$  células em 10µL, sobre uma lâmina de microscopia e corados pelo método Panótico (ciclohexadieno 0,1%, azobenzenosulfônicos 0,1% e fenotiazina 0,1%). As lâminas foram montadas em Permout® (Fisher Scientific) e examinadas em um microscópio Nikon E600 em aumento de 1000x.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio colorimétrico com MTS/PMS

O ensaio colorimétrico foi realizado mais de uma vez, em dias distintos, para confirmação dos dados. Os resultados apresentados a seguir foram gerados em parceria com a aluna de PIBIC do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Pietra Sater. A placa de teste é apresentada a seguir.

**Figura 7** – Recorte da placa de 96 poços após adição de MTS.



A figura mostra as triplicatas das quatro concentrações testadas de levamisol. É possível observar, visualmente, a diferença de coloração entre a triplicata de poços de maior concentração (200µg/mL) apontados pela seta azul e a triplicata de controle sem o fármaco adicionado apontados pela seta verde. Os valores de absorbância, juntamente com os resultados visuais, ilustram a atividade do fármaco em diminuir a viabilidade do parasito, que, por consequência, não é capaz de reduzir o MTS e produzir o Fornazan — substância que fornece a cor roxa.

**Tabela 2** – Média dos valores de absorbância da placa de teste.

	Controle	200µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	25µg/ml
Absorbância	1.333	0.734	1.124	1.398	1.443

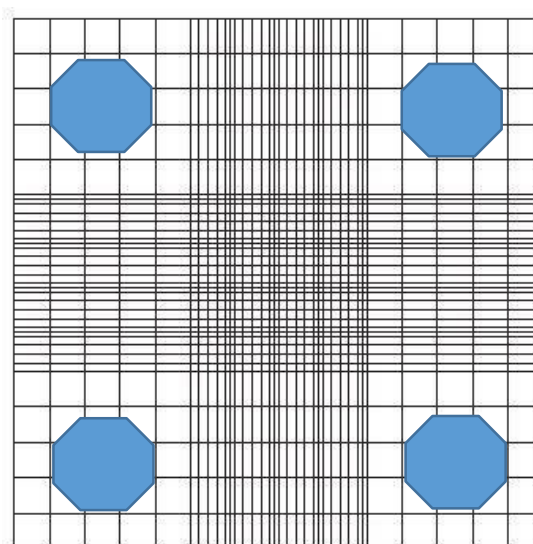
A IC<sub>50</sub> calculada – concentração inibitória de 50% das formas testadas – foi de 123,3. Esse valor demonstra uma atividade fraca sobre o parasito, se comparada a IC<sub>50</sub> do Benznidazol calculada em 16 pelo Grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Apesar da disparidade dos valores, a redução de quase 50% na absorbância

de maior concentração do fármaco (200ug/ml) em relação ao controle demonstra a existência de atividade antiparasitária.

#### 4.2 Avaliação da multiplicação dos parasitos

Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer diluídos em PBS em diluição 1:80. O exponencial  $10^4$  é utilizado como fator de correção em função da área de cada quadrado de contagem e sua profundidade (SPlabor, 2021), como demonstra a figura abaixo.

**Figura 8** – Áreas de contagem da câmara de Neubauer. Os hexágonos azuis representam as áreas de contagem de parasitos.



Fonte: SPlabor, 2021

Os resultados das contagens são apresentados na tabela 3. É possível observar a redução no número de parasitos na contagem da amostra com adição do fármaco em relação ao controle e também o aumento de atividade do fármaco em 72 horas em relação à contagem de 24 horas.

**Tabela 3** – Resultado de contagens de parasitos em câmara de Neubauer.

	<b>24 horas</b>	<b>72 horas</b>
Controle	$257,5 \times 10^4$	$1.360 \times 10^4$
Levamisol (400ug/ml)	$197 \times 10^4$	$514 \times 10^4$

Os valores apresentados foram gerados através da média das triplicatas testadas.

Como é possível perceber pelos valores apresentados na tabela, a contagem de 24 horas apresenta pouca diferença significativa entre o controle não tratado e a

concentração de 400ug/ml de levamisol. Em 72 horas, porém, a diferença se mostra significativa. Mais de 50% de diferença na contagem de formas epimastigotas ilustra a atividade antiparasitária do fármaco.

#### 4.3 Avaliação da morfologia dos parasitos

As lâminas foram coradas pelo método Panótico, que permite a visualização da forma do parasito, seu flagelo e cinetoplasto, como demonstrado na figura abaixo.

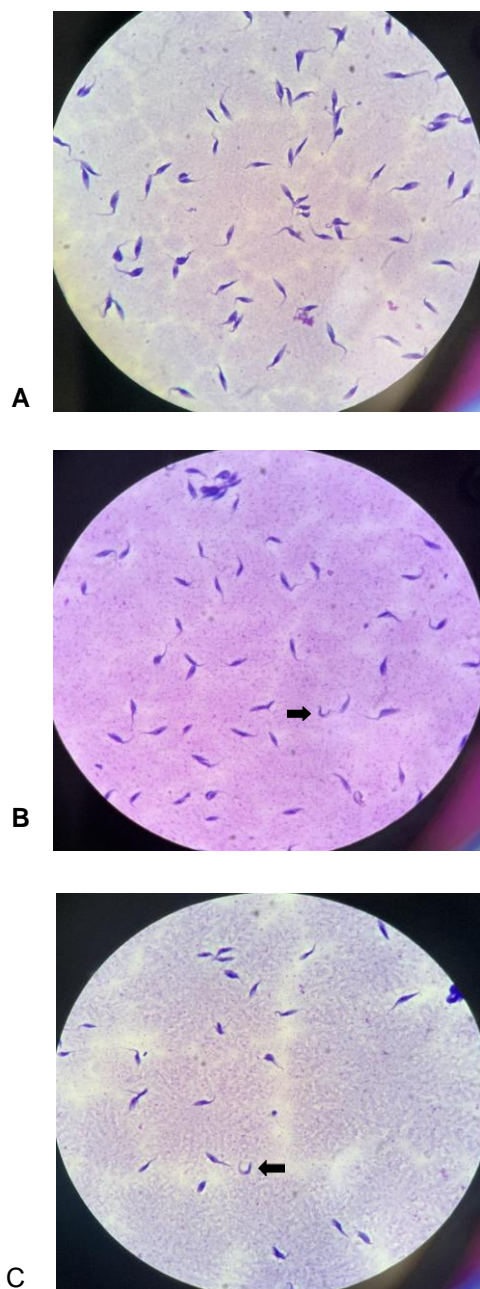
**Figura 9** – Formas epimastigotas não tratadas com 72 horas de crescimento (controle).



As setas indicam as estruturas celulares: F (flagelo). N (núcleo) e K (cinetoplasto). Aumento de 1.000x.

Após observação microscópica dos parasitos tratados com as concentrações de 200ug/mL e 400ug/mL de levamisol, não foram observadas alterações morfológicas, em comparação com os parasitos não tratados (controle). Os dados indicam que, embora o fármaco tenha afetado a multiplicação do parasito (Tabela 2), não causou alterações morfológicas microscópicas.

**Figura 10** – Comparação da morfologia dos parasitos tratados com levamisol.



A) Parasitos não tratados (controle), (B) Parasitos tratados com a concentração de 400ug/mL de levamisol, e (C) Parasitos tratados com a concentração de 200ug/mL de levamisol. Aumento de 1.000x.

Apesar de não ser evidenciada a alteração da morfologia dos parasitos tratados com levamisol, em comparação com os parasitos da cultura controle, pôde-se observar a presença de raras formas tripomastigotas (setas nas figuras 9B e 9C), nas lâminas preparadas a partir das culturas submetidas ao tratamento por 72h com ambas as concentrações do fármaco, o que não foi observado nas lâminas confeccionadas com a cultura controle. Em contagem de 200 parasitos submetidos ao tratamento com a concentração de 400ug/mL observou-se 7 formas com morfologia de tripomastigotas,

enquanto que no tratamento com a concentração de 200ug/mL observou-se apenas 4 formas, sugerindo que o levamisol pode ter influência na diferenciação do parasito. Esses dados, porém, devem ser confirmados em novos testes posteriores.

Os resultados apresentados sugerem atividade do levamisol em formas de *Trypanosoma cruzi*. Possivelmente, assim como ocorre no tratamento contra helmintos, o fármaco causa interferência no metabolismo energético ao impedir a conversão de succinato a fumarato.

## 5 CONCLUSÕES

Os três métodos usados para testagem do levamisol em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c confirmam a atividade do fármaco sobre este parasito.

A atividade do levamisol deve ser avaliada posteriormente em projetos do Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, mas os resultados desse trabalho demonstram uma promissora atividade antiparasitária do fármaco levamisol.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE J. P. D. O.; TESTON A. P. M.; JÚNIOR G. Z.. **Tratamento etiológico da doença de Chagas: um antigo problema de saúde pública**. Uningá Review, v. 20, n. 2, 2014.

AMERY W. K.; BRUYNSEELS J. P. **Levamisole, the story and the lessons**. International journal of immunopharmacology, v. 14, n. 3, p. 481–486, 1992.

ANDRADE S. G. **Patologia experimental da Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 178-179, 2000.

BARRETT M. P.; CROFT S. L. **Management of trypanosomiasis and leishmaniasis**. British Medical Bulletin, v. 104, ed. 1, p. 175–196, 2012.

BRENER, Z. **Biology of *Trypanosoma cruzi***. Annual Reviews in Microbiology, v. 27, n. 1, p. 347-382, 1973.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 6, n. 3, p.93-100, 1964.

CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis)**. Human & Experimental Toxicology, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Tripanossomose Americana** [Internet]. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana**: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, p.159, 1909.

DE FÁTIMA OLIVEIRA, M. et al. **Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil**. Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

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

DIAS J. R.; COURA J. C. P. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**, uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486p.

DrugBank. **Levamisole**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00848>.

HERNANDES, M. R. G. et al. **In vitro immunomodulatory effects of microemulsions with levamisole delivery systems on blood phagocytes interacting with *Giardia lamblia***. Parasitology International, v. 66, n. 3, p. 299-304, 2017.

JANSSEN, P. A. J. **The Levamisole Story**. Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrés des recherches pharmaceutiques, v. 20, p. 347-383, 1976.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. **Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables**. In: Medicinal spices and vegetables from Africa. Academic Press, p. 271-297, 2017.

Ascaridil [Bula]. São Paulo: **JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA**. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/ascaridil.pdf>.

MARTIN, R. J. **Neuromuscular transmission in nematodes parasites and antinematodal drug action**. Pharmacology & therapeutics, v. 58, n. 1, p. 13-50, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim epidemiológico**. Número especial, 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim\\_especial\\_chagas\\_14abr21\\_b.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf)

NEVES, D. P.; MELO, A. L. D.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11 edição. Atheneu, 2005. p. 85-108.

PAN, P. et al. **Cloning, characterization, and sulfonamide and thiol inhibition studies of an  $\alpha$ -Carbonic Anhydrase from *Trypanosoma cruzi***, the causative agent of chagas disease. Journal of Medicine Chemistry, v. 56, n. 4, p.1761-

1771, 2013.

PubChem. **Levamisole**. PubChem Open Chemistry Database. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26879>.

RIBEIRO, E. B. et al. **Design and Development of Nanoemulsion Systems Containing Interferon Gamma**. Protein and Peptide Letters, v. 23, n.7, p. 626-638, 2016.

RIBEIRO, E. B.; LANE P. K. D. **Microemulsions with Levamisole Delivery Systems as Novel Immunomodulating Agents with Potential for Amebiasis Therapies**. Science of Advanced Materials, v. 7, n. 1, p. 15-27, 2015.

SILVA, G. C. D. **Estratégias em reposicionamento de fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2015.

SPLABOR. **O que é uma câmara de Neubauer e como ela funciona?**2021. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/30-produtos-para-laboratorio-de-quimica/o-que-e-uma-camara-de-neubauer-e-como-ela-funciona/#Calculo da Concentracao de Celulas>

STOGAUS R.; KING M. G. **Is oral levamisole immunostimulation in rats mediated by reduced levels of free plasma corticosterone?** International journal of immunopharmacology, v. 17, n. 8, p. 635–640, 1995.

TAVARES, P. C. B. **Expressão gênica de proteínas associadas ao reparo de membrana e dinâmica do citoesqueleto de actina em mioblastos infectados pelo *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Revisited**. International journal for parasitology, v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 2001.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. **Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances**. Trends in Parasitology, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

VOTÝPKA, J. et al. **New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae:**

**Criteria for Taxonomic (Re)description.** Trends In Parasitology, v. 31, n. 10, p. 460-469, 2015.

WHO (World and Health Organization). **Neglected tropical diseases.** 2017.  
Disponível: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)