



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Efeito do produto natural 2'',3''-dihidro-naflavona sobre
***Trypanosoma cruzi*, cepa Y**

Melissa Cristina Moraes Florencio

Sob a orientação da professora

Lucia Helena Pinto da Silva

e Co-orientação da professora

Patricia Fampa Negreiros Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

616.9363

F632e

T

Florencio, Melissa Cristina Moraes, 1991-

Efeito do produto natural 2'', 3''-di-idrochnaflavona sobre
Trypanosoma cruzi, cepa Y / Melissa Cristina Moraes Florencio
– 2016.

56 f.: il.

Orientador: Lucia Helena Pinto da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

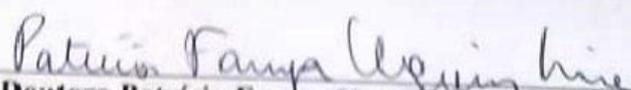
Bibliografia: f. 45-50.

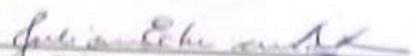
1. Chagas, Doença de – Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* – Teses.
3. Parasito – Teses. 4. Relação hospedeiro-parasito – Teses. 5.
Parasitologia veterinária – Teses. I. Silva, Lucia Helena Pinto da,
1975-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

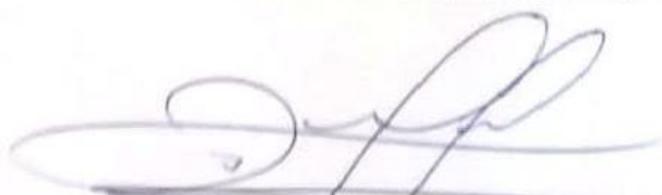
MELISSA CRISTINA MORAES FLORENCIO

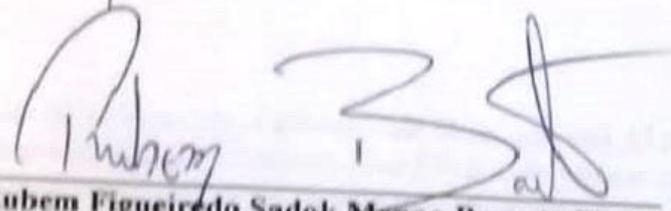
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2016


Doutora Patricia Fampa Negreiros Lima UFRRJ
(Orientador)


Doutora Juliana Echevarria Neves de Lima UFRJ


Doutor Douglas Siqueira de Almeida Chaves UFRRJ


Doutor Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto FioCruz

Esse trabalho é dedicado ao meu avô, João Ferreira de Melo, que aos 35 anos faleceu, vítima da Doença de Chagas, deixando duas filhas, sem jamais conhecer seus netos. Que cada vez mais a ciência permita que homens e mulheres possam viver com seus filhos e conhecer seus netos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valéria e Alexandre, que sempre me apoiaram e incentivaram que eu buscasse meus sonhos. Ao meu irmão, Maruan, por fazer companhia aos meus pais, durante esses anos, e a nossa amizade que é para sempre.

Agradeço à Patrícia Fampa, por toda a minha formação científica. Agradeço também pela amizade e apoio, incentivo e momentos de descontração. À Lúcia, agradeço pelo apoio, doçura e ajuda, sem você o dia de hoje não seria possível, muito obrigada por tudo.

À toda a equipe do Laboratório de Imunologia e Virologia, da UFRRJ, por todo o suporte oferecido no desenvolvimento do trabalho, especialmente as professoras Débora Lima e Maria das Graças Danelli.

Aos membros do Laboratório de Parasitas e Vetores, da UFRRJ, nem tenho como agradecer a vocês pela ajuda, aprendizado, companhia, enfim, pela convivência que teve como consequência a amizade.

Professor Doutor Mário Geraldo de Carvalho, do ICE da UFRRJ, Professora Doutora Maria Tereza Auxiliadora, da UFMT pelo composto cedido;

À veterinária Julliane de Moraes e a bióloga Eveliny Nery, ex alunas da UFRRJ, pela mão de obra dedicada à esse trabalho;

Doutora Aline Araújo Zuma e professora Doutora Maria Cristina Motta, ambas da UFRJ, pela colaboração com a microscopia eletrônica;

Doutor Deivid de Carvalho, e Cristian Ferreira, da UFRJ, pela colaboração nos ensaios de ciclo celular, e pelas dúvidas atendidas;

Professora Doutora Georgia Atella e Professor Doutor Mário Alberto Silva-Neto da UFRJ, pela infraestrutura do laboratório.

À banca, pela dedicação ao trabalho e pela participação nesse momento tão importante da minha vida.

Agradeço por fim à coordenação do curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e ao CNPq e à CAPES pelo apoio para a realização deste trabalho.

RESUMO

FLORENCIO, Melissa Cristina Moraes. **Efeito do produto natural 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.** 2016. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, uma doença negligenciada que afeta aproximadamente 8 milhões na América Latina. Dada a capacidade de o parasita de evadir o sistema imune do hospedeiro, a baixa eficiência dos tratamentos oferecidos e os sintomas e lesões debilitantes causados pela doença, é muito importante a busca por novas terapêuticas mais eficientes. A flora brasileira possui uma imensa diversidade de metabólitos secundários que podem apresentar ação antiparasitária. 2'',3''-di-idroochnaflavona é um biflavonoide extraído de *Luxemburgia nobilis*. No trabalho atual, investigamos o efeito de 2'',3''-Di-idroochnaflavona contra *T. cruzi*, cepa Y. Os resultados mostram que o composto tem ação contra o parasita apresentando IC₅₀ de 2,5 µM para formas epimastigotas após 96 horas de tratamento. O composto não demonstrou efeito dose-dependente nas concentrações testadas. Formas epimastigotas tratadas com 2'',3''-Di-idroochnaflavona apresentaram alterações morfológicas como inchaço mitocondrial e acúmulo de corpos lipídicos, observadas por microscopia eletrônica. Não foram identificadas, no entanto, alterações na quantidade de lipídios nos parasitos tratados e marcados com Nile Red por quantificação de fluorescência e microscopia de fluorescência. Experimentos preliminares mostraram que a metaciclologênese *in vitro* é alterada na presença do composto. Em macrófagos peritoneais murinos de Balb/c, as formas amastigotas intracelulares foram afetadas pelo tratamento com a droga nas concentrações de 2,5 e 5 µM, com diminuição de 72 e 85%, respectivamente, no índice de associação entre os parasitas e as células hospedeiras. Nos ensaios citotóxicos, o composto não apresentou toxicidade para população enriquecida de linfócitos de camundongos pelo método de exclusão por azul de Trypan e para macrófagos peritoneais de camundongo pelo método de exclusão por azul de Trypan e XTT. Nossos resultados indicam que a 2'',3''-di-idroochnaflavona tem potencialidade para se tornar uma nova proposta de tratamento contra a doença de Chagas por apresentar um baixo IC₅₀ e não ser tóxica. Os mecanismos de ação desse composto ainda não foram totalmente esclarecidos, apresentando um amplo campo a ser aprofundado. Nossos dados, juntos com outros trabalhos de quimioterapia com produtos de origem natural abrem uma nova possibilidade de desenvolvimento de um tratamento com menos efeitos colaterais e menos tóxico, porém eficiente contra o parasito.

Palavras chaves: doença de Chagas, *Luxemburgia nobilis*, biflavonoide.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease which affects 8 million people in Latin America. Due to parasite high capacity to evade host immune system, and low efficacy combined to serious side effects to patients caused by available drugs against Chagas disease, the identification of alternative therapeutics is essential. Brazilian flora exhibits an immense diversity of metabolites that could fill these requirements. 2'',3''-dihydrochonaflavone is a biflavonoid extracted from *Luxemburgia nobilis*. In the present work, we investigated the action of 2'',3''-dihydrochonaflavone against *T. cruzi* (Y strain). Our experiments showed that this compound is effective against parasite epimastigotes forms, presenting IC₅₀ value of 2.5 μM after 96 h of treatment. The effect of the compound didn't show dose-dependent effect at the tested concentrations. Morphological alterations were also detected in treated parasites such as mitochondrial swelling and lipid bodies accumulation observed by electronic microscopy. We investigated the lipid intensity in epimastigotes treated with 7.5 μM of the biflavonoid for 4 days by Nile Red fluorescence labeling either by fluorometric quantification or fluorescence microscopy, but there was no significant difference compared to untreated parasites. We also observed that if the tested drugs affected intracellular amastigotes forms in Balb/c mice peritoneal macrophages infection assays. Treatment of infected macrophages with 2.5 and 5 μM of the biflavonoid for 120h led to association index (percentage of infected macrophages multiplied by the mean number of amastigotes per macrophage) reduction of 72% and 85%, respectively. Nonetheless, these drugs concentrations were harmless to mice enriched population of lymphocytes as demonstrated by Trypan Blue exclusion test assay and mice peritoneal macrophages as demonstrated by Trypan Blue and XTT assays after 120h of treatment. These results indicate that 2'', 3''- dihydrochonaflavone exhibits the potential to become a new treatment proposal against Chagas' disease by presenting a low IC₅₀ and for not being toxic to host cells. The mechanisms of action of this compound are not totally clarified, being a new field to be explored. Our data, together with other works of chemotherapy using natural products open up new possibilities for developing novel treatments with fewer side effects and less toxicity, but effective against the parasite.

Key words: Chagas disease, *Luxemburgia nobilis*, biflavonoid.

LISTA DE ABREVIACOES

OMS	Organização Mundial da Saúde
DNA	cido Desoxirribonucleico
pH	Potencial Hidrogeninico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alpha
IL-12	Interleucina-12
IFN- γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
Célula NK:	Célula Natural Killer
BHI:	Brain Heart Infusion
SBF:	Soro Bovino Fetal
DMSO:	Dimetilsulfóxido
RPM:	Rotação por minuto
ACK:	Ammonium-Chloride Lysing
XTT:	XTT Sodium Salt
PMN:	Phenazina methosulfato
DAPI:	4',6-diamidino 2- fenil-indol
TAU:	Triatomine Artificial Urine
MSF	Médicos sem Fronteiras
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Chagoma de inoculação e sinal de Romaña	2
Figura 2. Cardiomiopatia Chagásica e Megacólon	3
Figura 3. Carlos Chagas	4
Figura 4. Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 5. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 6. 2'',3''-di-idroocnaflavona	10
Figura 7. Efeito de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre a curva de crescimento de <i>T. cruzi</i> , cepa Y.....	15
Figura 8. Efeito de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre a inibição do crescimento de <i>T. cruzi</i> , cepa Y.....	16
Figura 9. Efeito tripanocida x tripanostático de 2'',3''-di-idroocnaflavona	16
Figura 10. MET Controle	17
Figura 11. MET 2,5µM por 4 dias	18
Figura 12. MET 7,5 µM por 2 dias	19
Figura 13. MET 7,5 µM por 4 dias	20
Figura 14. Efeito de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre o acúmulo de lipídios em <i>T. cruzi</i>	21
Figura 15. Microscopia de fluorescência	22
Figura 16. Efeito de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	23
Figura 17. Efeito de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre a metaciclo gênese <i>in vitro</i>	24
Figura 18. Avaliação do número médio de amastigotas por célula	25
Figura 19. Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados	26
Figura 20. Avaliação do índice de associação	26
Figura 21. Microscopia óptica de macrófagos infectados com amastigotas de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 22. Citotoxicidade de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre população enriquecida de linfócitos por azul de Trypan.....	28
Figura 23. Citotoxicidade de 2'',3''-di-idroocnaflavona sobre macrófagos peritoneais por azul de Trypan.....	29
Figura 24. Efeito de 2'',3'' di-idroocnaflavona na viabilidade de macrófagos murinos por XTT	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 Doenças Negligenciadas	1
2.2 Doença de Chagas.....	2
2.3 O Protozoário.....	4
2.4 Ciclo de Vida.....	5
2.5 Transmissão.....	6
2.6 Imunidade e patologia na doença de Chagas.....	7
2.7 Tratamentos	8
2.8 Pesquisa com fármacos e produtos naturais	9
2.9 2'',3''-di-idroochnaflavona.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Comitê de Ética	11
3.2 Isolamento de 2'',3''-di-idroochnaflavona	11
3.3 Parasitas	11
3.4 Tratamento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com o bi flavonoide 2'',3''-di-idroochnaflavona	11
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	11
3.6 Quantificação de corpos lipídicos por Fluorimetria.....	12
3.7 Microscopia de Fluorescência	12
3.8 Ciclo celular	12
3.9 Metaciclogênese	12
3.10 Efeito do composto sobre a metaciclogênese <i>in vitro</i>	13
3.11 Tratamento de macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> com o biflavonoide 2'',3''-di-idroochnaflavona	13
3.12 Citotoxicidade por Azul de Trypan.....	13
3.13 Citotoxicidade por XTT	14
3.14. Análises Estatísticas	14
3. RESULTADOS	15
4.1. Efeito do biflavonoide 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
4.1.1. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre a curva de crescimento de <i>T. cruzi</i> , cepa Y.	15
4.1.2. Efeito do composto sobre a morfologia de <i>T. cruzi</i>	17
4.1.3. Efeito do biflavonóide sobre acúmulo de lipídios, a partir de quantificação de fluorescência, em <i>T. cruzi</i>	21
4.1.4. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre o acúmulo de lipídios, a partir de microscopia de fluorescência, em <i>T. cruzi</i>	22
4.1.5. Efeito do biflavonoide sobre o ciclo celular do parasita	23
4.1.6. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre a metaciclogênese <i>in vitro</i>	24
4.2 Efeito do biflavonoide 2'',3''-dihidroochnaflavona sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
4.2.1. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação do número médio de amastigotas por célula.....	26
4.2.2. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados.....	26
4.2.3. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação do índice de associação	27

4.2.4. Efeito de 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Microscopia óptica	28
4.3 Efeito do biflavonóide 2'',3''-di-idroochnaflavona sobre células murinas	28
4.3.1. Efeito de 2'',3'' di-idroochnaflavona na viabilidade de população enriquecida de linfócitos, por Azul de Trypan.....	28
4.3.2. Efeito de 2'',3'' di-idroochnaflavona na viabilidade de macrófagos murinos por Azul de Trypan.....	29
4.3.2. Efeito de 2'',3'' di-idroochnaflavona na viabilidade de macrófagos murinos por XTT.....	29
4. DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Segundo a OMS, as doenças parasitárias ainda são causas de óbitos em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, se caracterizando um sério problema de saúde pública. Dados indicam que mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, que podem vir a causar até 500 mil mortes anualmente. O crescimento desordenado das cidades e precárias condições de vida e higiene são alguns dos fatores que contribuem para o aumento dessa estimativa.

A Doença de Chagas é uma doença parasitária, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, os últimos dados epidemiológicos estimam que cerca de 16 a 18 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com esse parasito, sendo 5 milhões apenas no Brasil. Em países endêmicos estima-se que a doença de Chagas cause até 11 mil mortes por anos. Os tratamentos atuais disponíveis contra o parasito não são satisfatórios, apresentando cura somente na fase aguda, e muitos efeitos colaterais. Pelo fato de ser uma doença que atinge pessoas de um nível econômico menos favorecido poucas são as pesquisas no sentido de propor novos tratamentos para essa doença, de forma que ela está incluída no grupo de Doenças Negligenciadas.

Pelo grande número de pessoas infectadas e pelos grandes danos que essa doença causa aos seus portadores é muito importante o desenvolvimento de novas terapias, mais eficazes e com menos efeitos tóxicos aos pacientes. Uma fonte de recursos para esse tipo de pesquisa são compostos de origem natural, extraídos de plantas ou animais.

Nesse sentido o presente trabalho busca investigar o efeito do biflavonóide 2'',3''- diidrochnaflavona, extraído da planta *Luxemburgia nobilis*, sobre a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Negligenciadas

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças negligenciadas agrupam diversas doenças com características distintas que acometem normalmente populações pobres e regiões com infraestrutura e saneamento básico precários ou inexistentes. Muitas dessas doenças causam deformidades e incapacidades, agravando as condições de vida e se tornando um obstáculo ainda maior para a melhora da qualidade de vida de seus portadores. Podem ter como agentes causais protozoários, helmintos, bactérias, fungos e vírus. (WHO, 2010)

Cerca de 149 países são afetados por pelo menos uma doença negligenciada, somando mais de 1 bilhão de pessoas infectadas com alguma dessas doenças e um número estimado em 534 mil óbitos por ano. (CDC, 2013). No Brasil, as doenças negligenciadas parasitárias mais relevantes por apresentarem um considerável número de casos por ano são a doença de Chagas, a leishmaniose e a filariose (WHO, 2010). O investimento dos governos em estudos para melhorias nos tratamentos e diagnósticos vem crescendo, mas ainda não é suficiente para sanar esse grande problema de saúde pública. Um agravante é o fato desse grupo de doenças despertarem pouco atrativo financeiro da indústria farmacêutica, uma vez que não atingem o grande mercado consumidor. Com baixo poder aquisitivo e sem interesse político, os pacientes e sistemas de saúde mais pobres não conseguem gerar o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas. Um estudo recente sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas (G-Finder2) revelou que menos de 5% dos financiamentos foram investidos no grupo das doenças extremamente negligenciadas, ou seja, doença do Sono, Leishmaniose Visceral e doença de Chagas, ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas por estas três doenças parasitárias no mundo. Em 2003 foi criada pela organização

Médicos Sem Fronteiras (MSF) a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas, DNDi, uma parceria para o desenvolvimento de produtos sem fins lucrativos, que trabalha para pesquisar e desenvolver novos tratamentos no combate às doenças negligenciadas. (WHO, 2010)

2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma zoonose infecciosa, potencialmente fatal, que está incluída no grupo de doenças Negligenciadas. É causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que pode infectar diversos tipos de células, em tecidos diferentes. É transmitido, usualmente, nas fezes de insetos da subfamília Triatominae, embora outras formas de transmissão como a congênita, oral, transfusional, venham ganhando importância (STEVERDING, 2014).

A infecção pode apresentar dois estágios identificados, a fase aguda, que pode se manifestar de 6 a 10 dias após a infecção e durar de 4 a 8 semanas (MYLES, 2009). Muitas vezes, a fase aguda é assintomática ou apresenta sintomas não específicos como febre, mal estar e aumento dos gânglios linfáticos (BARRET, et al., 2003). Os pacientes picados podem apresentar no local da picada um chagoma, ou sinal de Romaña, quando a picada ocorre na região dos olhos (Figura 1). Miocardite e meningoencefalite podem ocorrer na fase aguda em crianças infectadas e na maior parte dos casos é fatal. Durante a fase aguda, a parasitemia é alta e parasitas são facilmente encontrados em sangue periférico. Após a fase aguda, os pacientes podem evoluir para a fase crônica, que pode ser sintomática ou não. Muitos pacientes se mantêm numa fase conhecida como indeterminada ou latente, assintomática, por muitos anos e podem nunca apresentar sintomas ou complicações pela doença. Porém de 15 a 30% dos pacientes infectados irão desenvolver a fase crônica sintomática, que está associada a manifestações de dilatação do coração e/ou trato digestório (Figura 2). As manifestações de megacólon, megaesôfago e patologias cardíacas são condições extremamente debilitantes. Na fase crônica, a parasitemia cai consideravelmente, sendo muito difícil encontrar parasitas no sangue (MYLES, 2009).

A patologia na doença é atribuída tanto a presença do parasita no organismo quanto a respostas do sistema imune, sendo algumas vezes considerada uma doença autoimune.



Figura 1. Chagoma de inoculação e sinal de Romaña. Retirado de cpqqr.fiocruz.br

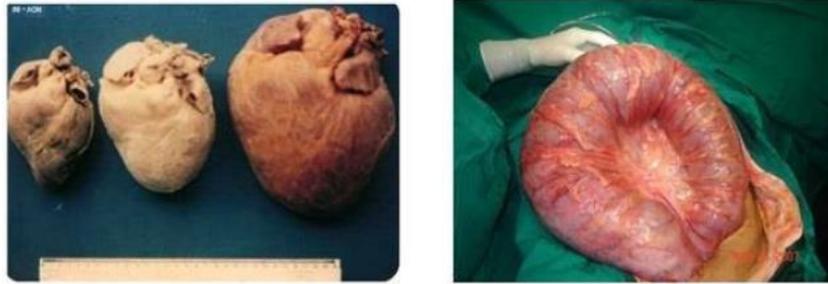


Figura 2. Cardiomiopatia Chagásica e Megacólon. Retirado de fiocruz.br

As diferentes patologias apresentadas na doença de Chagas são causadas por seis genótipos diferentes de *T. cruzi* (TcI - TcVI), com distribuições geográficas distintas e grande diversidade genética (ZINGALES et al., 2012)

Há evidências de material genético de *T. cruzi* em múmias de 9.000 anos atrás. O levantamento realizado em múmias de diferentes populações da América Latina mostra uma prevalência de 41% de infecções por *T. cruzi* sem diferença significativa entre as populações, o que sugere que a doença de Chagas já estava amplamente distribuída em comunidades do período pré-colombiano (AUFDERHEIDE et al., 2004). Baseados em dados de paleoparasitologia, acredita-se que a doença de Chagas tenha surgido nas regiões Andinas na população de Chinchorro, que foram os primeiros a adotar um estilo de vida não nômade, momento importante para a transferência de um ciclo silvestre para um ciclo doméstico da doença (FERREIRA, JANSEN & ARAÚJO, 2011). O desenvolvimento do ciclo doméstico se deu, principalmente, pela capacidade de alguns triatomíneos se adaptarem a ambientes de vegetação aberta. Nesse sentido é importante notar a relação que existe entre o aumento de casos de doença de Chagas e o crescimento do desmatamento (WALSH, MOLYNEUX & BIRLEY, 1993). Essa informação também está baseada no fato de populações indígenas da região amazônica, que não desmatam as suas regiões não apresentarem infecções por *T. cruzi*, nem seus animais domésticos (BRICEÑO-LEÓN, 2007).

O primeiro registro de um caso, muito possivelmente, de doença de Chagas ocorreu em 1735 pelo médico português Luís Gomes Ferreira. O paciente em questão apresentava síndrome megavisceral. Há também registros dos vetores da doença de Chagas, muitos anos antes de eles serem identificados como transmissores dessa doença. O caso mais famoso é o registro que Charles Darwin fez em 25 de março de 1835, onde ele escreveu sobre ter sido picado por um inseto do gênero *Reduvius*. Baseados nesse registro e, posteriormente, nos sintomas gástricos que Charles Darwin apresentou ao longo da vida, acredita-se que ele possa ter sido infectado por *T. cruzi* e morrido de doença de Chagas (MILES, 2014).

Em 1908, durante uma campanha contra malária no estado de Minas Gerais, o médico Carlos Chagas (Figura 3) se interessou por um inseto hematófago que picava as pessoas durante a noite, preferencialmente no rosto. Ao dissecar esses insetos, Chagas encontrou inúmeros tripanossomas, que nomeou como *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. Chagas enviou alguns insetos para Cruz, que os colocou para se alimentar em macacos sagui, após 20-30 dias os saguis estavam infectados e apresentavam os tripanossomas na corrente sanguínea. Chagas logo descobriu que o parasita era capaz de infectar diversos animais. Ao examinar uma menina de dois anos, Chagas observou em seu sangue parasitas com a mesma morfologia dos que foram encontrados nos saguis infectados (CHAGAS, 1909). Chagas descreveu detalhes da fase aguda e da fase crônica, assim como o parasito e os vetores da doença (PRATA, 1999).

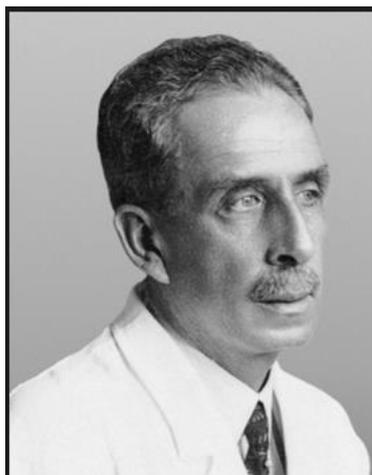


Figura 3. Carlos Chagas. retirado de scielo.br

Atualmente estima-se que 7-8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi*, a maioria na América Latina e que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de contrair a doença (WHO, 2014).

2.3 O protozoário

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado que pertence à família Trypanosomatidae, classificada na ordem Kinetoplastida, no subfilo Mastigophora e filo Sarcomastigophora. Esses organismos apresentam cinetoplasto, organela bastante singular, onde se encontra o kDNA, que pode representar até 30% do DNA total da célula. Essa célula apresenta um núcleo único e apenas um flagelo, que nasce do corpúsculo basal junto ao cinetoplasto. Esse protozoário apresenta muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade. Ao longo da vida do protozoário ele pode apresentar morfologia diferente. Ainda que possua basicamente a mesma organização, as mudanças morfológicas estão condicionadas ao hospedeiro no qual o parasito se encontra. As principais formas morfológicas apresentadas são: epimastigota caracterizada por uma forma alongada, cinetoplasto discoide próximo ao núcleo, a bolsa flagelar abre-se lateralmente, o flagelo permanece preso ao corpo celular, é encontrada no tubo digestório do hospedeiro invertebrado e é também a forma, normalmente, mantida em laboratório em meio de cultura; tripomastigota apresenta um corpo celular longo e bem achatado, o cinetoplasto e bolsa flagelar são deslocados para a região entre o núcleo e porção posterior do corpo, o flagelo percorre toda a porção do corpo, aderido pela membrana ondulante, é a forma infectiva para mamíferos; amastigota possui corpo celular achatado e de pequenas dimensões, pouca área de citoplasma, núcleo grande e redondo, o cinetoplasto é bem visível em forma discoide, porém o flagelo é muito curto e está dentro da bolsa flagelar, o amastigota possui mobilidade muito limitada, é a forma intracelular do parasita (Figura 4) (REY, 2008).

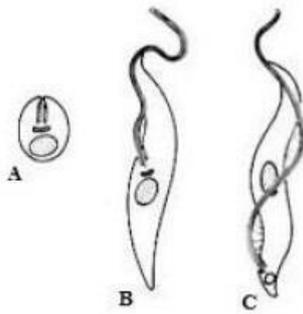


Figura 4: Formas evolutivas do *T. cruzi*. Em A forma amastigota, em B forma epimastigota e em C forma tripomastigota. Adaptado de Rey, 2008.

Análises moleculares a partir da sequência 18S indicam que tripanossomas que deram origem ao *T. cruzi* e os tripanossomas salivares divergiram há 100 milhões de anos. As descobertas mais recentes apontam que *T. cruzi* se originou a partir de *Trypanosoma* de morcego conhecido com TcBat que é intimamente relacionado com TcI e que está associado a insetos do gênero *Rhodnius*, que têm hábitos arbóreos (HAMILTON, TEIXEIRA & STEVENS, 2012). Acredita-se que a diversidade dentro de *T. cruzi* nas linhagens atuais ocorreu há 1-3 milhões de anos atrás (FLORES-LÓPEZ & MACHADO, 2011).

2.4 Ciclo de Vida

Quando o inseto vetor se alimenta de um vertebrado infectado ingere junto com o sangue *T. cruzi* na forma tripomastigota sanguínea, forma não replicativa. No estômago do inseto, a maior parte dos parasitas morre (NAGAJYOTHI et al., 2012), porém os que sobrevivem se diferenciam na forma epimastigota, uma forma replicativa. Então os parasitas migram através do intestino e aderem à membrana perimicrovilar anterior, onde se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica, não replicativa. Na porção final do intestino e no reto os tripomastigotas metacíclicos livres se misturam com a urina e fezes do inseto que serão liberados durante a próxima alimentação do inseto (SILVA-NETO et al, 2010). A infecção ao vertebrado pode ocorrer a partir de penetração do parasita por mucosa ou lesão causada pela picada do inseto vetor. Os tripomastigotas metacíclicos, no hospedeiro vertebrado, invadem macrófagos, fibroblastos e células epiteliais no local da inoculação e, inicialmente são contidos pelo vacúolo parasitóforo. Após escapar do vacúolo parasitóforo, os parasitas se diferenciam na forma replicativa intracelular amastigota, e sofrem vários ciclos de replicação no citosol, quando então se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, forma não replicativa. As formas tripomastigotas sanguíneas rompem a célula hospedeira e caem na corrente sanguínea, podendo infectar e se multiplicar em outros tecidos do corpo, estabelecendo uma infecção permanente. No momento em que um inseto não infectado se alimentar de um hospedeiro infectado e ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas o ciclo será fechado (Figura 5) (JIMENEZ, 2014).

Ao longo do ciclo de vida *T. cruzi* sofre diversas influências externas como mudança de temperatura, osmolaridade, condições nutricionais, pH, respostas imunes dos hospedeiros vertebrados e invertebrados. A adaptação a todas essas modificações ao longo da evolução permitiu o sucesso na transmissão do parasita entre os diferentes tipos de hospedeiros. Essas

influências externas também são importantes na sinalização para diferenciação das formas do parasita ao longo do ciclo (GARCIA, 2007).

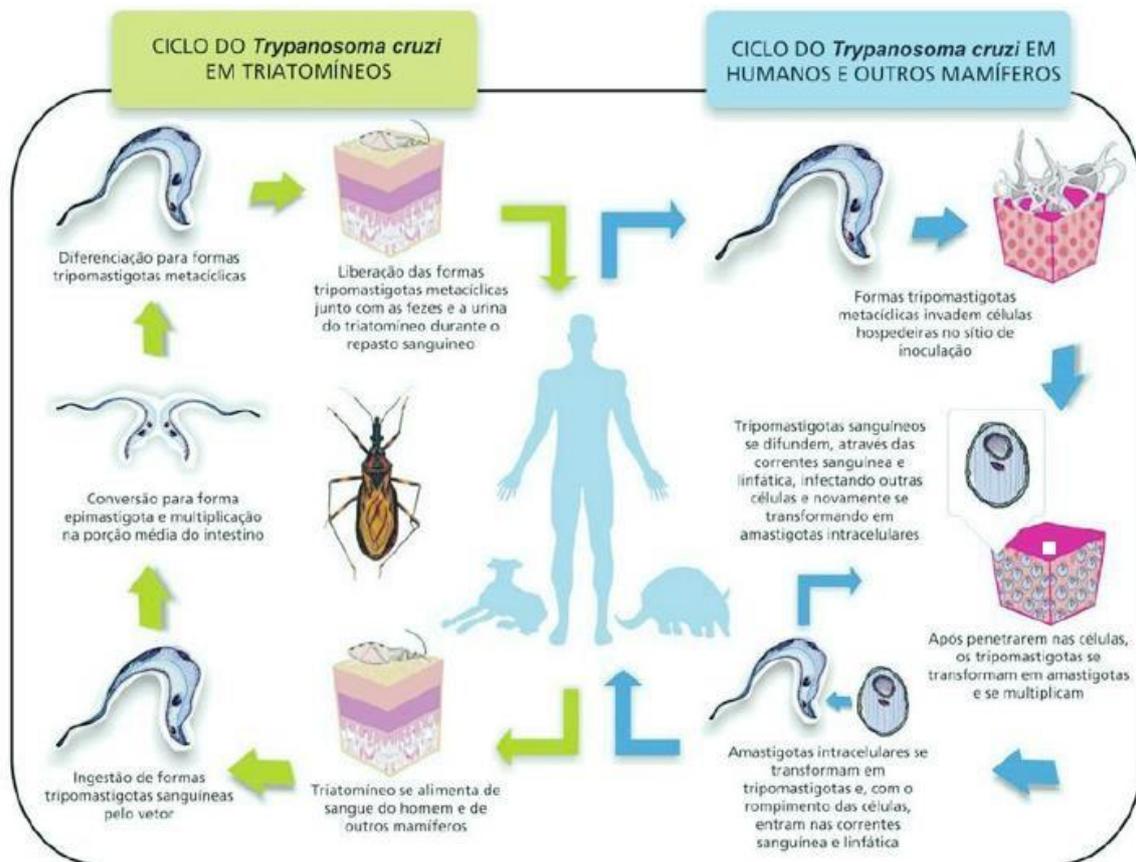


Figura 5 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

2.5 Transmissão

Os mecanismos de transmissão da doença de Chagas para humanos podem ser divididos em dois tipos, principais ou primários e secundários. Os mecanismos principais ou primários são as transmissões vetoriais, transfusão de sangue, transmissões orais e congênitas. Os mecanismos secundários são acidentes laboratoriais, manipulação de animais infectados, consumo de carne crua de animais infectados, transmissão pelo ato sexual (COURA, 2007). Outras possibilidades de transmissão incluem infecção criminosa, transmissão a partir de transplante de órgãos e até mesmo transmissão de parasitas liberados nas glândulas odoríferas de marsupiais, que podem infectar humanos e outros animais (LENZI, JANSEN & DEANE, 1984).

Com o avanço do desmatamento e a adaptação de triatomíneos para áreas peridomésticas, se formaram áreas endêmicas de transmissão na América do Sul e Central. Mais recentemente as atenções começam a se voltar também para a América do Norte e Europa, pela migração de muitos pacientes chagásicos para essas regiões (COURA, 2009).

Há, na natureza, mais de 100 mamíferos que podem atuar como reservatórios do parasita que causa a doença de Chagas. A história natural da transmissão de *T. cruzi* se encaixa nas seguintes formas: enzootia, antroponose, zoonose e zoonose antropozoonose (COURA, 2015).

O inseto reconhecido como principal vetor da doença de Chagas é o *Triatoma infestans* que a partir da Iniciativa do Cone do Sul foi eliminado do Uruguai (1997), do Chile (1999) e do Brasil (2006) com certificação da Organização Pan-Americana da Saúde (COURA, 2009). *Panstrongylus megistus* pode ser considerado atualmente o principal vetor no Brasil, é distribuído do Sul até o Nordeste com maiores concentrações em Minas Gerais e na Bahia. *Triatoma brasiliensis* é o principal vetor nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro em associação com *Triatoma pseudomaculata*. *Triatoma sordida* ocupou o nicho vago pela eliminação de *T. infestans*, principalmente em ambientes peridomésticos e associados a galinheiros. Outra espécie associada a regiões peridomésticas e galinheiros é *Triatoma maculata*. *Rhodnius brethesi* é considerado um importante vetor silvestre na região do Rio Negro, no Amazonas (SHERLOCK, 2000).

A transmissão a partir de transfusão sanguínea é provavelmente a segunda forma mais importante de transmissão da doença e até recentemente foi uma questão só levantada e trabalhada na América Latina (COURA, 2010). Com a imigração de pacientes chagásicos para países não endêmicos surgiram novos cenários para esse mecanismo de transmissão. Na década de 1970 aconteciam até 100 mil casos de transmissão da doença de Chagas por ano a partir da transmissão por transfusão sanguínea (DIAS & SCHOFIELD, 1999). Atualmente o número de casos de transmissão a partir de transfusão sanguínea caiu muito, pelos métodos de controle do sangue dos doadores que foram implementados. Entretanto nem todos os países endêmicos adotaram mecanismos de controle de sangue dos doadores. É preocupante também o fato de países não endêmicos, que recebem milhares de imigrantes, não utilizem testes de controle para doença de Chagas em seus doadores de sangue (COURA, 2010).

A transmissão oral é, provavelmente, o principal mecanismo de transmissão em ciclos silvestres, levando em consideração o grande número de mamíferos que servem como hospedeiros de *T. cruzi* e podem se alimentar de insetos infectados e também por conta de predação entre mamíferos. A transmissão a partir da amamentação humana foi descrita em 1936. O primeiro surto de doença de Chagas por transmissão oral no Brasil foi descrito em 1968, no Rio Grande do Sul, tendo sido 18 casos com seis óbitos (COURA, 2015).

A transmissão congênita em países endêmicos ocorre em 5% das mulheres infectadas. Não se sabe ainda quais são as rotas específicas da transmissão congênita, porém muitas rotas vêm sendo estudadas. É bem aceito atualmente que a invasão ocorra através do trofoblasto, porém análises histopatológicas da placenta de mulheres infectadas não forneceram informações que confirmem essa hipótese. Ainda deve-se considerar a possibilidade de transmissão através a amamentação (GEBREKRISTOS & BUEKENS, 2014).

2.6 Imunidade e Patologia na doença de Chagas

Sabe-se que, de forma geral, que durante a infecção por *T. cruzi*, o sistema imune dos hospedeiros induzem processos que controlam o crescimento do parasita. A resposta imune é essencial para lutar contra o estabelecimento da doença. Tanto a resposta humoral quanto a celular são importantes no combate ao *T. cruzi*. Acredita-se que na fase aguda da infecção o parasita induza uma forte ativação do sistema imune e que os diferentes mecanismos imunes desencadeados na forma indeterminada inicial da infecção representem componentes importantes da atividade imune durante a fase crônica da doença. Nos momentos iniciais da infecção macrófagos infectados mobilizam resposta do sistema imune inato a partir da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12. Essas citocinas ativam células NK que produzem IFN- γ que age diretamente nos macrófagos, levando-os a produzir óxido nítrico, que é potencialmente fatal para *T. cruzi*. As citocinas regulatórias IL-4, IL-10 e TGF- β inibem a produção de óxido nítrico. A ativação descontrolada de macrófagos e células NK pode levar a danos nos tecidos dos hospedeiros (AYO *et al.*, 2014).

Normalmente a cardiopatia chagásica crônica surge após um período indeterminado longo. Exames post mortem de pacientes nas fases indeterminadas e crônica parecem ser livres de parasitas, por testes histológicos. A cardiomiopatia chagásica aparece principalmente como inflamação do miocárdio, miocitólise, vasculite e fibrose. Também é possível observar um grande número de auto-anticorpos nesses pacientes, incluindo anticorpos específicos para antígenos cardíacos. Mesmo em infecções assintomáticas pode-se encontrar altos títulos de anticorpos contra o parasita (KIERSZENBAUM, 1999). Alguns mecanismos foram propostos para explicar a autoimunidade como ativação de espectador, mimetismo molecular, ativação policlonal, epítomos crípticos entre outros (LEON & ENGMAN, 2003).

Baseados nas interações entre parasita e hospedeiro, os mecanismos patológicos na doença de Chagas são divididos em duas hipóteses: a primeira defende que a presença e persistência do parasita no organismo do hospedeiro é responsável pelo desenvolvimento da patologia, enquanto a segunda hipótese acredita que os danos apresentados nos órgãos afetados dos pacientes são consequência de respostas imunes contra antígenos próprios. Além dessas duas hipóteses principais, ainda deve ser levado em consideração componentes genéticos do hospedeiro que podem torná-lo mais ou menos suscetível ao desenvolvimento de uma patologia durante a infecção (AYO *et al.*, 2014).

2.7. Tratamentos

Mesmo após mais de 100 anos da descoberta e caracterização da doença de Chagas, ainda não existe um tratamento satisfatório no mercado, de modo que o controle da doença se estabelece principalmente no combate ao inseto vetor. Apesar de todos os avanços alcançados nessa área, ainda é preocupante a falta de um tratamento específico que elimine o parasito na fase crônica da doença e, além disso, não apresente muitos efeitos colaterais (URBINA, 2010).

Durante muitos anos o questionamento sobre a patologia da doença, que ainda não foi totalmente esclarecido, não permitia que os pesquisadores direcionassem o tratamento para eliminação do parasito ou como uma doença autoimune. Atualmente, apesar da falta de total esclarecimento, já foi demonstrado que independente da causa da patologia, a presença do parasito no organismo é fundamental para que as respostas inflamatórias características ocorram (MARIN-NETO *et al.* 2010). Dessa forma ficou evidente a importância da busca por um tratamento que elimine o parasita do organismo como pré-requisito para uma evolução na cura do quadro da doença de Chagas (URBINA, 1999).

A partir dos anos 60 duas drogas foram introduzidas para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox [Lampit®, Bayer; 5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide] e benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche; N-benzil-2-nitroimidazol acetamida). Estudos clínicos mostram que os dois compostos apresentam bons resultados na fase aguda da doença, entretanto a eficiência das drogas varia de acordo com a área geográfica do paciente, o que está relacionado principalmente com a cepa de *T. cruzi* que infectou o paciente. A principal limitação desses compostos acontece na fase crônica da doença, onde a atividade antiparasitária cai consideravelmente. As razões pelas quais os compostos não são tão eficientes durante a fase crônica ainda não foram totalmente esclarecidas, mas acredita-se que esteja envolvido com a meia vida dos compostos e a limitação de penetração nos tecidos dos hospedeiros. A ação antiparasitária de nifurtimox é associada à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). No caso de benznidazol acredita-se que ocorram modificações covalentes em macromoléculas, que levam à morte do parasito. Infelizmente, muitas vezes o tratamento com esses compostos tem que ser interrompido por conta dos efeitos colaterais que apresentam (URBINA, 2002).

2.8 Pesquisa com fármacos e produtos naturais

Na busca por novos tratamentos eficientes contra a doença de Chagas o uso de produtos naturais com baixa toxicidade e atividade não tóxica para o hospedeiro podem ser apropriados, se a sua atividade tripanocida contra forma infectiva de *T. cruzi* for adequada (CAMPOS *et al.*, 2005).

Levando-se em consideração que o parasita possui moléculas e vias metabólicas altamente específicas, um bom candidato para o tratamento da doença de Chagas deve ter como alvo moléculas e vias específicas do parasito, de forma que as chances de desenvolvimento de efeitos colaterais diminuam. Nesse sentido, muitas drogas têm sido testadas buscando esses alvos, como inibidores do metabolismo tripanotona. Esse metabolismo ocorre por meio de duas enzimas que repõem glutadiona e glutadiona redutase, enzimas antioxidantes essenciais para a sobrevivência do parasito (KELLY *et al.*, 1993, Bond *et al.*, 1999). Uma droga que inibisse o mecanismo responsável por retirar a purina do hospedeiro seria muito interessante. Um fármaco já utilizado em tratamentos para reumatismo é o allopurinol-hidroxi-pirazol-pirimidina, que pode ser utilizado como um inibidor de hipoxantina-guanina-fosfobiosil transferase (HGPRT), a enzima envolvida na retirada da purina. Já foi demonstrado que esse tratamento é eficiente na fase aguda em modelos murinos, mas apresenta diferentes respostas dependendo da cepa do parasito (AVILA, 1981).

Desde sempre, produtos de origem natural têm sido usados, na medicina popular, para o tratamento de doenças, com efeitos satisfatórios. Substâncias de origem natural podem agir sobre sistemas biológicos, levando a uma resposta farmacológica. Nesse sentido um outro ponto interessante em propostas de tratamentos contra a doença de Chagas são os que se baseiam em compostos derivados de produtos naturais (TEMPONE *et al.*, 2007).

Dentro desse cenário, inúmeras possibilidades podem ser exploradas. Testes com metabólitos secundários de plantas, como óleos essenciais, de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris* (SANTORO *et al.*, 2006) e compostos derivados de *Piper sp.*, como a piperina (Freire-de-Lima *et al.*, 2008) apresentaram resultados interessantes. O tratamento com eupomatenóide-5, extraído de *Piper regnellii*, causa diminuição em tripomastigotas viáveis, além de não apresentar citotoxicidade para células de linhagem LLCMK2 (PELIZZARO-ROCHA *et al.*, 2011). Testes *in vivo* em camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato de *Senna villosa* demonstraram que os grupos tratados apresentaram uma melhora clínica, além de ninhos de amastigotas menores e menos frequentes, com redução de até 95% quando comparados ao controle não tratado (JIMENEZ-COELLO *et al.*, 2011). Trabalhos com extratos brutos de plantas herbais demonstram que *Ageratum conyzoides* induz elevada mortalidade de formas tripomastigota de *T. cruzi* assim como quando tratados com *Handroantus impetiginosus* e *Ruta graveolens*. O extrato de *A. conyzoides* apresentou toxicidade para macrófagos murinos de linhagem J774G8 e peritoneais, *H. impetiginosus* mostrou baixa toxicidade enquanto *R. graveolens* não demonstrou toxicidade, revelando sua potencial utilização em ensaios clínicos (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Resultados promissores foram obtidos após a exposição do parasita a extratos aquosos de *Polygala sabulosa* e de *Polygala cyparissias* com inibição de 50% de crescimento em epimastigotas após 72 h de tratamento (PIZZOLATI *et al.*, 2002). Para tripomastigotas, o extrato metanólico de *Piptadenia africana* levou a morte de 50% dos parasitas tratados após 96 h (MESIA *et al.*, 2008). O extrato de *Gardenia lutea* também apresentou o mesmo efeito (ALI *et al.*, 2002). Em formas amastigotas foi observado inibição de 50% após 7 dias de tratamento com extratos de *Hypoestes forskalii*, *Kleinia odora*, *Psiadia punctulata*, *Capparis spinosa*, *Euphorbia schimperiana*, *Ricinus communis*, *Marrubium vulgare* e *Solanum villosum* (ABDEL-SATTAR, MAES & SALAMA, 2010)

Alcaloides isolados de algas marinhas como lepadin E apresentam resultados muito promissores, com IC₅₀ baixos. Os mesmo alcaloides parecem não demonstrar toxicidade contra células do hospedeiro, sendo considerados candidatos interessantes para testes clínicos (GARZON, LORGA & JACOB, 1979) Outros dois compostos, citarabina e vidarabina, ambos isolados também de algas marinhas apresentam forte ação anti *T. cruzi*. Acredita-se que o mecanismo de ação desses compostos esteja relacionado com a inibição da DNA polimerase (JONES *et al.*, 2013).

Já foram realizados também ensaios com substâncias derivadas de venenos de animais, como abelhas e cobras. Os tratamentos levaram a sérias alterações ultraestruturais nos parasitas tratados (ADADE *et al.*, 2010, 2012). O inibidor de serino peptidase (ShPI-I) do organismo marinho *Stichodactyla heliantos* reduziu a viabilidade dos parasitas tratados de forma dose-dependente, além de levar a alterações estruturais nos parasitas. (NOGUEIRA *et al.*, 2013). Também foi descrito que uma classe de peptídeos presentes em pererecas do gênero *Phyllomedusa* demonstrou atividade anti-tripanososoma (BRAND *et al.*, 2002).

Os resultados acima mencionados evidenciam o grande potencial dos produtos de origem natural contra diversas formas evolutivas de *T. cruzi*, e abrem a real possibilidade de que um tratamento eficiente contra a doença de Chagas surja a partir de pesquisas com compostos naturais.

2.9 2'',3''-dihidrochnaflavona

Espécies da família Ochnaceae são frequentes no Brasil e vêm sendo caracterizadas como uma importante fonte de biflavonóides. Dentre essas moléculas está 2'',3''-diidrochnaflavona, isolada das folhas e dos ramos de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Alguns trabalhos avaliaram possíveis atividades biológicas desse biflavonóide e mostraram que 2'',3''-diidrochnaflavona é tóxica para células da linhagem do carcinoma de Ehrlich e células da linhagem K562, agindo de forma dose-dependente nos dois casos, com IC₅₀ de 67 e 82 µM respectivamente. Também foi demonstrado que o mesmo composto é capaz de inibir atividade de Topoisomerase I e Topoisomerase II-α (OLIVEIRA *et al.*, 2007)

O grupo do Dr. Mario Geraldo de Carvalho, professor do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ, em trabalhos recentes, atribuiu efeitos farmacológicos a biflavonóides isolados de representantes vegetais pertencentes à família Ochnaceae. Estes produtos naturais apresentam versatilidade estrutural podendo ser facilmente modificados. (DANIEL *et al.*, 2007).

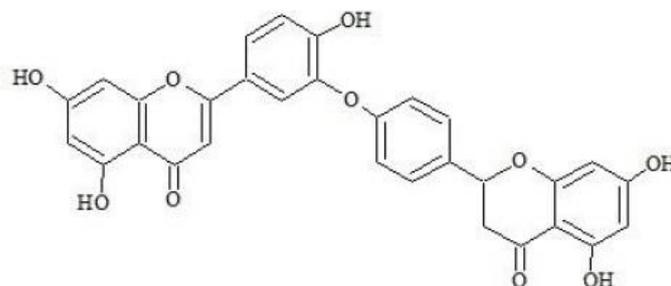


Figura 6. Estrutura molecular de 2'',3''-diidrochnaflavona.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O atual projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da UFRRJ pelo protocolo de número 069/2014 em 14 de julho de 2014.

3.2 Isolamento de 2'',3''-diidrochnaflavona

O processamento do material de *Luxemburgia nobilis* foi feita de acordo com Ribeiro *et al.* (2012) e o composto 2'',3''-diidrochnaflavona foi gentilmente cedido pela equipe do Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho – Instituto de Ciências Exatas, Depto. Química – UFRRJ. O sólido amarelo foi solubilizado em DMSO.

3.3 Parasitas

Parasitas *Trypanosoma cruzi*, cepa Y foram cedidos pela Coleção de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Y foram mantidos, através de passagens semanais, em meio de cultura BHI (BD) suplementado com 10% de SBF (Gibco) inativado, 1% de hemina (Sigma-Aldrich) e 1% de ácido fólico Sigma-Aldrich) a 27°C.

3.4 Tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona

Epimastigotas de *T. cruzi* (2×10^5 /poço) crescidos em placas de 96 poços com meio BHI suplementado como descrito acima foram mantidos a 27°C na presença ou não de 7,5; 15; 22,5 e 30 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona adicionados no primeiro dia de cultivo. A viabilidade dos parasitos foi estimada por contagem diária em câmara de Neubauer por quatro dias seguidos. Para verificar se o efeito do composto sobre o crescimento era reversível ou não, realizamos o mesmo ensaio como descrito acima, onde epimastigotas de *T. cruzi* (2×10^5 /poço) foram incubados na presença ou não de 7,5; 30 e 50 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona. Após quatro dias de tratamento os parasitos foram lavados, 2x com PBS, para a retirada do composto e reincubados (2×10^5 /poço) somente na presença de meio BHI suplementado e mantidos a 27°C. A viabilidade dos parasitos foi estimada por contagem diária em câmara de Neubauer durante quatro dias.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Formas epimastigotas (2×10^7 /mL) foram mantidas em meio BHI suplementado e tratadas ou não com 2,5 e 7,5 μM . Após 48 ou 96 horas de tratamento, os parasitos foram centrifugados a 500 xg por 5 minutos e lavados 2x com PBS para retirada de resíduos da droga e fixados em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 com 2,5% de glutaraldeído por uma hora. Posteriormente, foram lavadas e pós-fixadas em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e ósmio 1% diluídos em cacodilato de sódio, por 45 minutos. Foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas em uma bateria de acetona em concentrações crescentes, com intervalos de 10 minutos entre cada desidratação (de 50% até 100%). As células foram então infiltradas por 18h com uma mistura 1:1 de acetona 100% e resina epóxi (Polybed) e infiltradas em resina pura. Após 5 horas, foram emblocadas, e os blocos mantidos a 60°C por 48 horas, até que fossem polimerizados.

Cortes ultrafinos foram obtidos através de ultramicrotomia em aparelho Reichert (Leica) e contrastados em acetato de uranila a 5% por 45 minutos e em citrato de chumbo por 5 minutos. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 e Jeol 1200.

3.6 Quantificação de Corpos Lipídicos por Fluorimetria

Formas epimastigotas foram crescidas em meio BHI suplementado, na presença ou não de 2,5 e 7,5 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona, mantidos a 27°C por 96 horas. As células foram centrifugadas e lavadas em PBS (pH 7.2) 2x e cerca de 1×10^7 células foram incubadas por 20 minutos com o Nile Red na ausência de luz. Posteriormente as células foram lavadas novamente em PBS e incubadas em uma placa de 96 poços e lidas em fluorímetro Molecular Devices Microplate Reader (Spectra Max Molecular Devices M2e), nos comprimentos de onda de 485 e 538 nm.

3.7 Microscopia de Fluorescência

Formas epimastigotas ($2 \times 10^7/\text{mL}$) foram mantidas em meio BHI suplementado e tratadas ou não com 2,5 e 7,5 μM do biflavonóide. Após 48 ou 96 horas de tratamento, os parasitos foram centrifugados a 500xg por 5 minutos e lavados 2x com PBS para retirada de resíduos da droga. As células foram então incubadas por 20 minutos com Nile Red diluído em 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acetona, lavadas em PBS, pH 7,2 e fixadas em paraformaldeído 4%, diluído em PBS. Depois foram aderidas a lamínulas previamente recobertas com poli-L-lisina 0,1% em PBS por 10 minutos. As células foram novamente lavadas e incubadas com DAPI (1: 500) por 5 minutos para marcar o material genético. As lamínulas contendo as células foram montadas sobre lâminas usando N-propil-galato 0,2 M em glicerol diluído 9:1 em PBS ou Prolong Gold e em seguida foram seladas com esmalte. As amostras foram visualizadas em microscópio óptico de fluorescência Zeiss Axioplan.

3.8 Ciclo Celular

Formas epimastigotas (1×10^7) foram tratadas ou não com 2,5; 5 ou 10 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona por 96 h e mantidas a 27°C. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em metanol a 70%. As células fixadas foram lavadas em PBS e ressuspendidas em 1 ml de PBS contendo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodeto de propídio e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase A e incubadas a 37°C por 45 minutos. Análises foram realizadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson usando FL2-A (detectando emissão entre 585 e 642 nm). A cada amostra, 10.000 células foram adquiridas e analisadas. Os dados foram interpretados utilizando o software CellQuestPro.

3.9 Metaciclogênese

Para diferenciação dos parasitos da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico *in vitro* 1 mL de cultura de formas epimastigotas ($8 \times 10^7/\text{mL}$) foi acrescentado a 9 mL de meio Grace's Insect Cell Culture Medium (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA). Os parasitos foram então mantidos em estufa a 27°C por 10 dias. Após esse tempo, o sobrenadante contendo parasitos na forma tripomastigota foi retirado, centrifugado 1.500 RPM por 10 minutos e lavado 2x com PBS em temperatura ambiente. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspendido em meio TAU (Contreras *et al.*, 1985) e mantido a 27°C por 24 horas.

3.10 Efeito do composto sobre a metaciclogênese *in vitro*

Para diferenciação dos parasitas da forma epimastigota para tripomastigota metacíclico *in vitro*, 1 mL de cultura de formas epimastigotas (8×10^7 /mL) foi acrescentado a 9 mL de meio Grace's Insect Cell Culture Medium. Os parasitas foram tratados ou não com 1 e 2,5 μ M de 2'',3''-diidrochnaflavona e mantidos a 27°C. Nos dias 7 e 9 pós tratamento, os parasitas foram contados, utilizando uma câmara de Neubauer. Para cada condição foram contados no mínimo 100 células, classificadas morfológicamente entre epimastigotas, tripomastigotas ou formas intermediárias.

3.11 Tratamento de macrófagos infectados com formas amastigotas de *T. cruzi* com 2'',3''-diidrochnaflavona

Para avaliar o efeito do biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona sobre formas amastigotas foi realizada a infecção de macrófagos murinos. Para tal procedimento, os macrófagos foram obtidos de camundongos Balb/c previamente estimulados com 3% tioglicolato por lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI (Sigma-Aldrich) a 4°C. O meio contendo células em suspensão foi centrifugado a 500 x.g., por 10 minutos e 4°C. As células foram incubadas ($2,5 \times 10^5$ /poço) com meio RPMI suplementado em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas no fundo dos poços a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, os poços foram lavados 2x com meio RPMI a 37°C para retirada das células não aderentes. Após a última lavagem, foram adicionados aos poços, parasitas na forma tripomastigota metacíclicos na proporção de 10:1. Foi mantida interação durante 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de interação, os poços foram lavados 2x com meio RPMI a 37°C para retirada dos parasitos que não aderiram às células e nesse momento foi adicionado ou não aos poços 2,5 ou 5 μ M de 2'',3''-diidrochnaflavona, sendo mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas de tratamento, os poços foram lavados com RPMI a 37°C para a retirada da droga e as células incubadas com RPMI suplementado e mantidas por mais 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após 120 horas do início do tratamento, as lamínulas contendo as células aderidas e infectadas foram fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa (Sigma-Aldrich) para avaliação do número de formas amastigotas dentro dos macrófagos. O efeito foi estimado pela contagem de no mínimo 200 células aleatórias por poço, obtendo-se assim a % de células infectadas e o número médio de parasito/célula. O índice de associação foi calculado a partir dos dois parâmetros anteriores. O experimento foi conduzido em triplicatas.

3.12 Citotoxicidade por Azul de Trypan

Macrófagos foram obtidos conforme descrito acima. As células (1×10^6 /poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio RPMI suplementado a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com meio RPMI a 37°C para retirada das células não aderentes e tratadas ou não com 7,5; 15; 25 e 50 μ M de 2'',3''- diidrochnaflavona e mantidas em meio RPMI suplementado a 37° C com 5% CO₂. A viabilidade celular foi estimada após 48 horas de tratamento pelo método do Azul de Trypan (marca) a 0,03%. O número de células viáveis foi determinado pela contagem de 100 células aleatórias por poço em triplicata. Macrófagos tratados com azida a 2% por 2 h foram utilizados como controle morto.

População enriquecida de linfócitos foi obtida de camundongos BALB/c através de maceração do baço com meio RPMI. Após maceração, o conteúdo foi centrifugado a 1.500

RPM por 10 minutos a 4°C (marca da centrífuga) e o pellet foi ressuspensionado em ACK para lisar as hemácias. Passados 3 minutos, o efeito do ACK foi neutralizado por adição de meio RPMI suplementado, novamente centrifugado e ressuspensionado em meio RPMI e mantidas a 37°C e 5% com CO₂. Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas. As células remanescentes (1x10⁵/poço) foram incubadas em placas de 24 poços com meio RPMI, suplementado com 10% SBF e tratadas ou não com 7,5; 15; 25 e 50µM de 2'',3''-diidrochnaflavona e mantidas em meio RPMI suplementado a 37°C com 5% CO₂. A viabilidade celular foi estimada após 48 horas de tratamento, com o método do Azul de Trypan, a 0,03%. O número de células viáveis foi determinado pela contagem de 100 células aleatórias por poço em câmara de Neubauer em triplicata. Células tratadas com azida a 2% por 2 h foram utilizadas como controle morto.

3.13 Citotoxicidade por XTT

Macrófagos foram obtidos de camundongos BALB/c conforme previamente descrito. As células (2x10⁵/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C com 5% de CO₂. 24 horas depois, as células foram lavadas com meio RPMI a 37°C para retirada das células não aderentes e as remanescentes foram incubadas com meio RPMI suplementado na presença ou não de 5 e 15 µM de 2'',3''-diidrochnaflavona e mantidos a 37°C com 5% de CO₂. Após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com RPMI a 37°C para retirada do composto e incubados com RPMI suplementados e mantidos a 37°C com 5% de CO₂ por mais 72 horas. Após 120 horas do início do tratamento, as células foram lavadas e incubadas com PBS a 37°C. A cada poço foram adicionados 50µL de XTT (Sigma-Aldrich) com 10% de PMN (Sigma-Aldrich) a 500µM e incubados por 2 e 4 horas. Macrófagos tratados com azida 2% por 2 h foram utilizados como controle morto. Após os tempos de incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Bio-Rad 680) no comprimento de onda de 450 nm.

3.14. Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas a partir do programa Graph Pad Prism 6.

4. Resultados

4.1. Efeito do biflavonoide 2'',3''-dihidrochnaflavona sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

4.1.1. Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre a curva de crescimento de *T. cruzi*, cepa Y.

Nossos resultados demonstram que o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona é eficiente contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* inibindo o crescimento dos parasitas nas concentrações de 7,5; 15; 22,5 e 30 μ M de forma semelhante independentemente da concentração, mostrando que o tratamento não apresentou resposta dose-dependente. O IC₅₀ apresentado para 96 h de tratamento foi de 2.5 μ M. Quantidade de DMSO utilizada foi equivalente a da maior concentração de droga para parasitas.

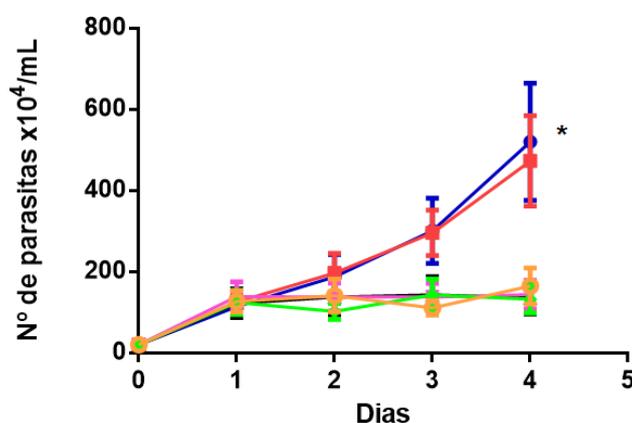


Figura 7: Efeito do biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona sobre o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Epimastigotas foram cultivados em BHI suplementado na ausência ou presença de 7,5; 15; 22,5 e 30 μ M de 2'',3''- diidrochnaflavona ou DMSO. Círculo azul representa o controle; quadrado vermelho representa o controle DMSO; círculo vazado laranja representa a concentração de 7,5 μ M; quadrado verde representa a concentração de 15 μ M; pirâmide invertida rosa representa a concentração de 22,5 μ M; pirâmide preta representa a concentração de 30 μ M. O número de parasitas foi determinado por contagem diária em câmara de Neubauer durante quatro dias. Resultados representam quatro experimentos independentes e realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

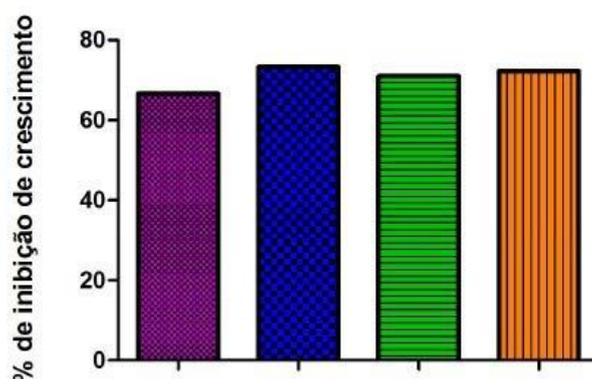


Figura 8: Efeito de 2'',3''-diidrochalcona sobre a inibição do crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* após 96h de tratamento. Em roxo a concentração de 7,5 μM com inibição de 66,64%; em azul a concentração de 15μM com inibição de 73,3%; em verde a concentração de 22,5 μM com inibição de 71,0%; em amarelo a concentração de 30 μM que mostrou inibição de 72,37%.

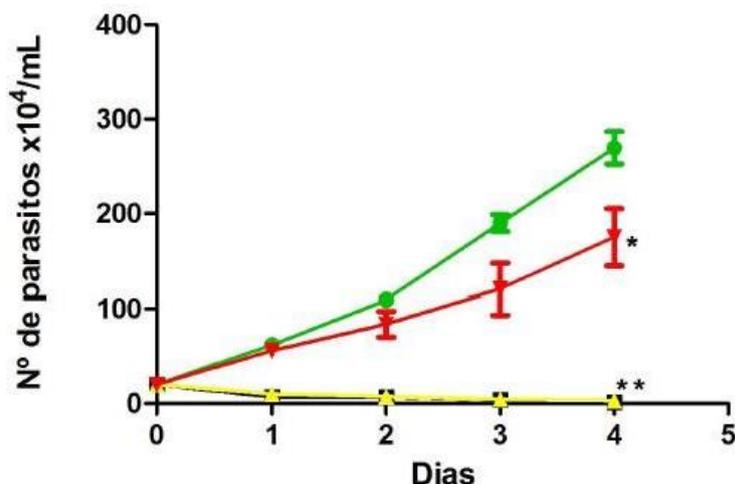


Figura 9: Efeito de 2'',3''-diidrochalcona sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* após quatro dias de tratamento na ausência ou presença de 7,5; 30 e 50 μM de 2'',3''-diidrochalcona e posterior retirada da droga para observação da recuperação do parasito em meio novo na ausência de droga, e assim atribuir efeito tripanocida ou tripanostático ao biflavonóide. Círculos verdes representam o controle não tratado; Triângulos invertidos vermelhos representam a concentração de 7,5 μM; Triângulos amarelos representam a concentração de 30μM; Quadrados pretos representam a concentração de 50 μM. Podemos observar que dependendo da concentração de droga utilizada para o tratamento pode ser atribuído efeito tripanocida ou tripanostático. Resultados representam três experimentos independentes e realizados em triplicatas. ** p<0,05 em relação ao controle.

4.1.2. Efeito da 2'',3''-diidrochnaflavona sobre morfologia de *T. cruzi*.

As alterações ultraestruturais apresentadas nos grupos tratados foram evidentes quando comparados ao controle não tratado (Figura 13 A, B, C, e D).

No grupo tratado com 2,5 μM da droga por 4 dias, observou-se inchaço mitocondrial, principalmente no cinetoplasto (Figura 14 B, C e D) e uma elevação do número de corpos lipídicos (Figura 14 A). No grupo tratado com 7,5 μM por 2 dias, também observou-se inchaço mitocondrial (Figura 15 A, B e C) e uma organização atípica do kDNA (Figura 15 B). Além de inchadas, as mitocôndrias também apresentavam a matriz extraída (Figura 15 B). Finalmente no grupo tratado com 7,5 μM da droga por mais tempo, ou seja, 4 dias, observou-se inchaço mitocondrial (Figura 16 A, B e C) mais evidenciado do que nos outros tratamentos, bem como maior número de corpos lipídicos acumulados em algumas células (Figura 16 B).

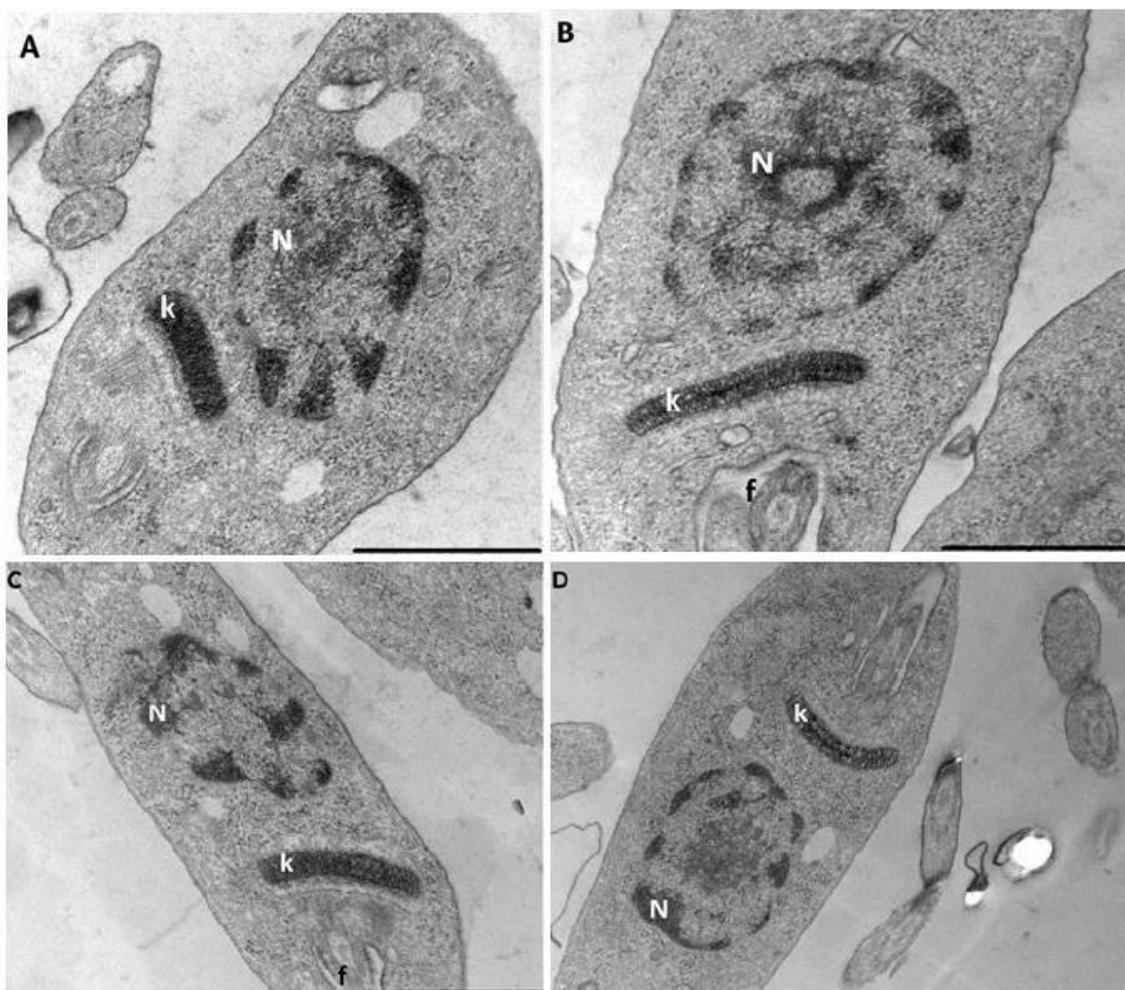


Figura 10: Controle com células não tratadas apresentando organelas com aspectos normais (A, B, C e D). N – núcleo, k – cinetoplasto, f – flagelo. Barra = 1 μm (A e B), 2 μm (C e D).

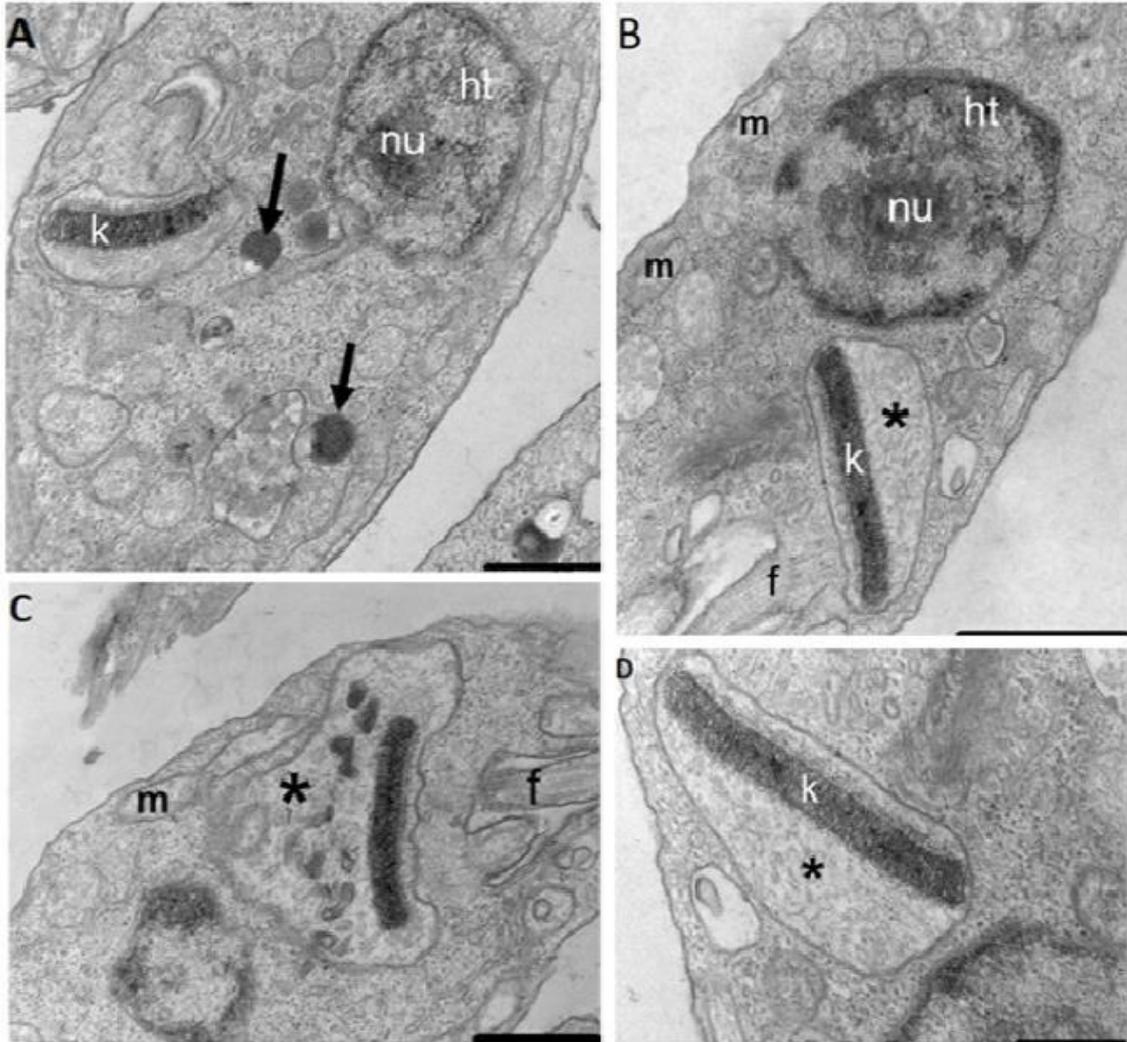


Figura 11: Parasitas tratados com 2,5 μM durante 4 dias. Observou-se inchaço mitocondrial (asteriscos) e grande número de corpos lipídicos (setas pretas). k = cinetoplasto, m = mitocôndria, nu = nucléolo, ht = heterocromatina, f = flagelo. Barra: 1 μm (A, B e C), 0,5 μm (D).

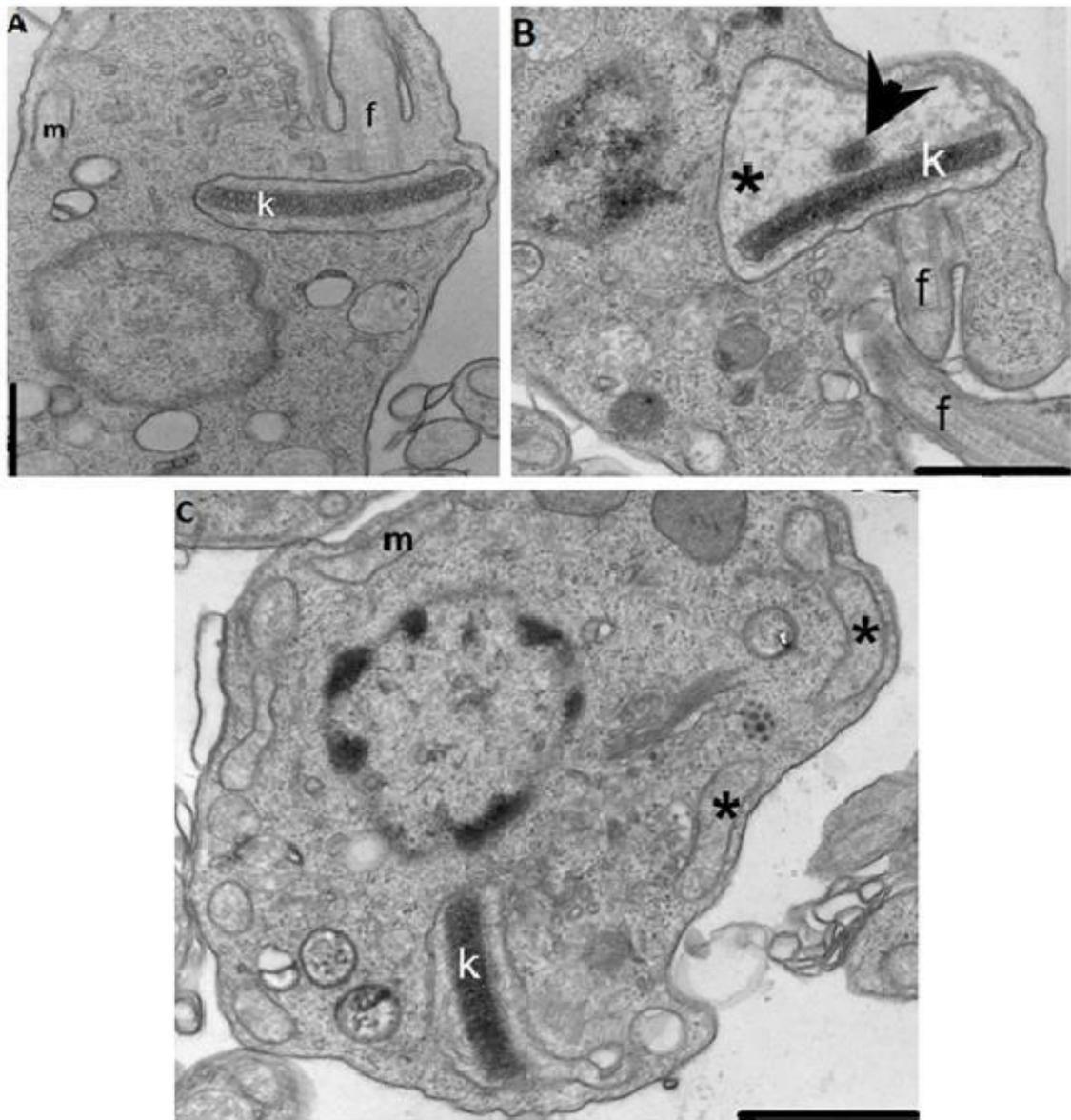


Figura 12: Parasitas tratados com 7,5 μM por 2 dias. Observou-se inchaço mitocondrial (asteriscos) e organização atípica do kDNA (Cabeça da seta). m - mitocôndria, k - cinetoplasto, f - flagelo. Barra : 1 μm (A e C), 0,5 μm (B).

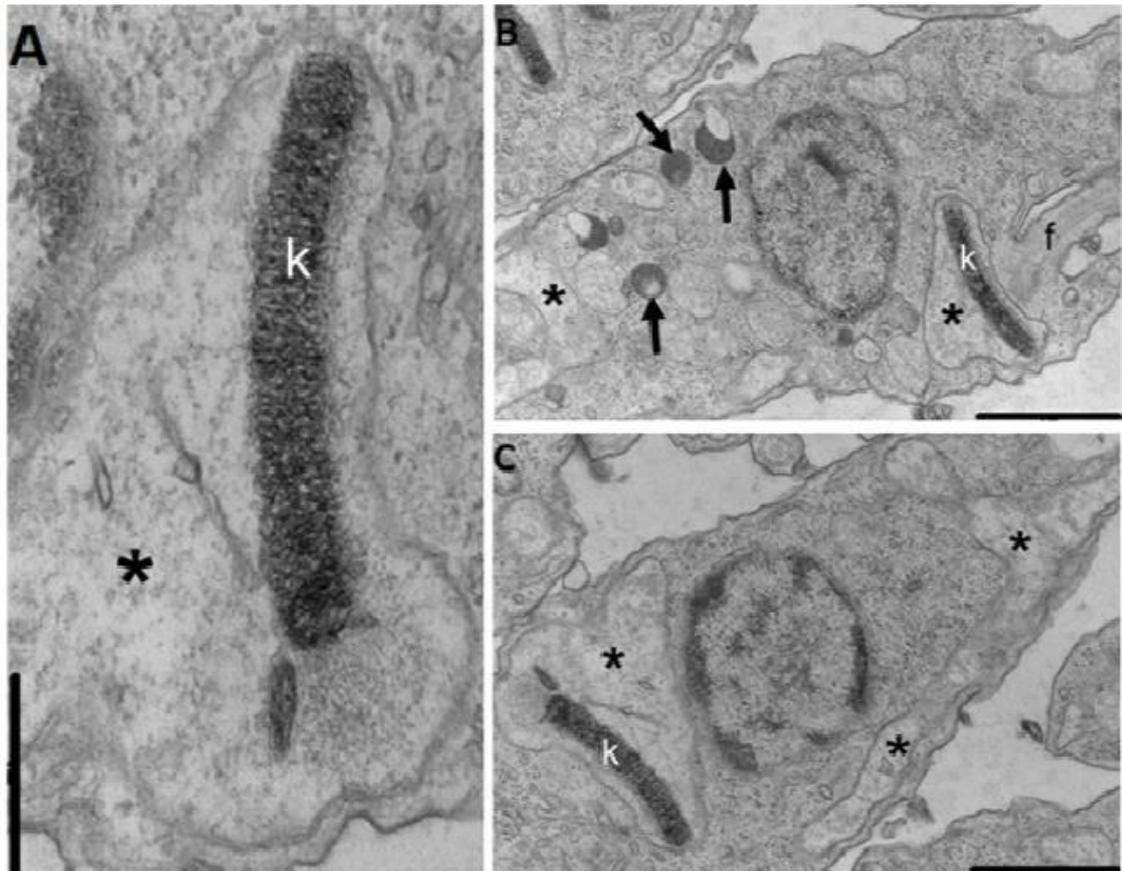


Figura 13: Parasitas tratados com 7,5 μM por 4 dias. Observou-se inchaço mitocondrial bem evidente (asteriscos) e acúmulo de corpos lipídicos (setas pretas). k - cinetoplasto, f - flagelo. Barra: 0,5 μm (A), 1 μm (B e C).

4.1.3. Efeito do biflavonóide sobre acúmulo de lipídios, a partir de quantificação de fluorescência, em *T. cruzi*.

Nossos resultados não demonstram diferença significativa no acúmulo de lipídios em *T. cruzi* tratados com o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona nas concentrações de 2,5 e 7,5 μM por marcação com Nile Red.

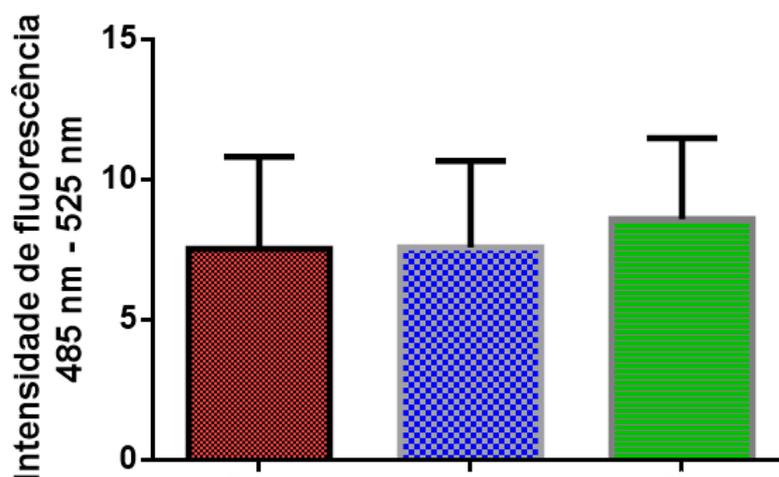


Figura 14: Efeito do biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona sobre o acúmulo de lipídios em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Epimastigotas foram cultivados em BHI suplementado na ausência ou presença de 7,5 ou 15 μM de 2'',3''- diidrochnaflavona. Barra vermelha representa o controle; barra azul representa a concentração de 2,5 μM ; barra verde representa a concentração de 7,5 μM . A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorímetro Molecular Devices Microplate Reader (Spectra Max Molecular Devices M2e), nos comprimentos de onda de 485 e 538 nm. Resultados representam três experimentos independentes.

4.1.4. Efeito de 2'',3''-dihidrochnaflavona sobre o acúmulo de lipídios, a partir de microscopia de fluorescência, em *T. cruzi*.

A microscopia de fluorescência não evidenciou diferença entre o grupo tratado e o controle no acúmulo de lipídios no parasita.

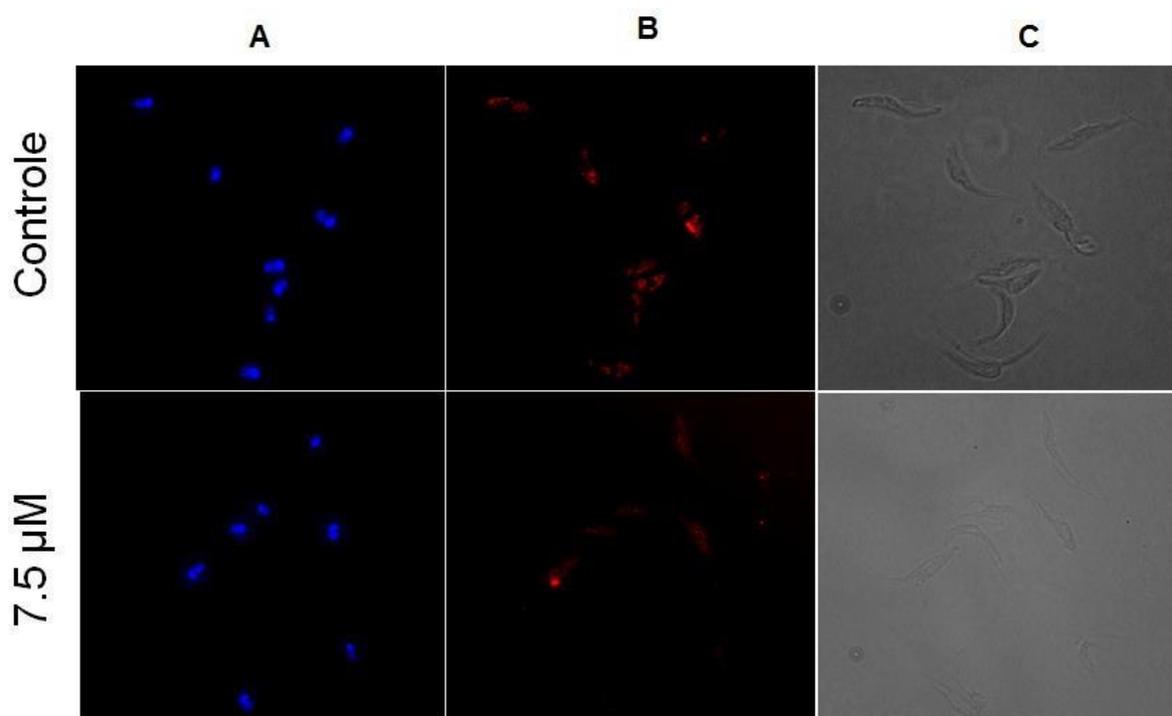


Figura 15: Epimastigotas tratados ou não com 7,5 μM de 2'',3''-dihidrochnaflavona foram incubados com Nile Red (A) e posteriormente com DAPI (B). Contraste de fase (C).

4.1.5 Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre o ciclo celular de *T. cruzi*.

Para avaliar se o tratamento com o composto leva a alterações no ciclo celular do parasita, um ensaio com marcador de material genético foi realizado, para determinar em que fase da mitose as células se encontravam. A princípio não foram observadas alterações no ciclo celular de parasitas tratados, quando comparados ao controle.

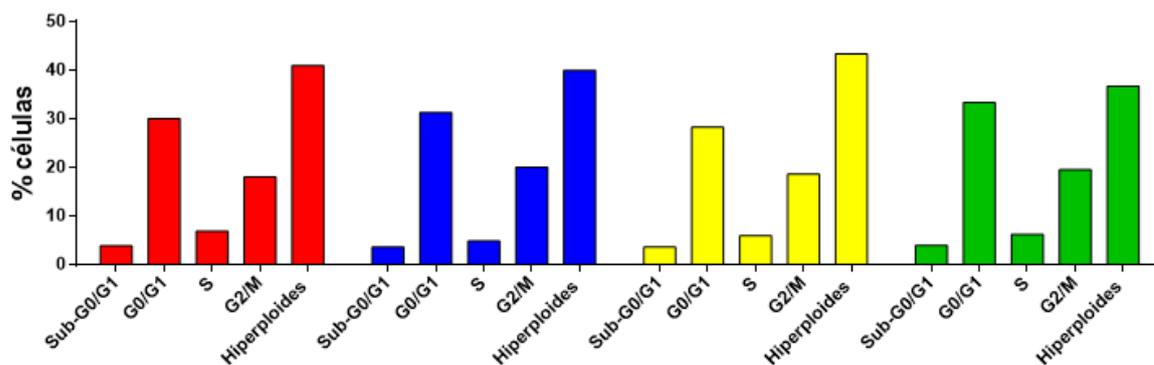


Figura 16: Formas epimastigotas foram tratadas na ausência (vermelho) ou presença de 2,5 (azul), 5 (amarelo) e 10 (verde) μM de 2'',3''-diidrochnaflavona por 96 horas. Após o tratamento as células foram marcadas e submetidas a citometria de fluxo para análise das células. Para cada condição 10.000 células foram analisadas. O resultado representa um experimento preliminar.

4.1.6 Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre a metaciclogênese, *in vitro*, de *T. cruzi*.

Para verificar se a metaciclogênese é afetada na presença do composto, foi realizado um experimento de metaciclogênese *in vitro* com diferentes concentrações de 2'',3''-diidrochnaflavona. Os parasitas foram contados nos dias 7 e 9 após o início da diferenciação.

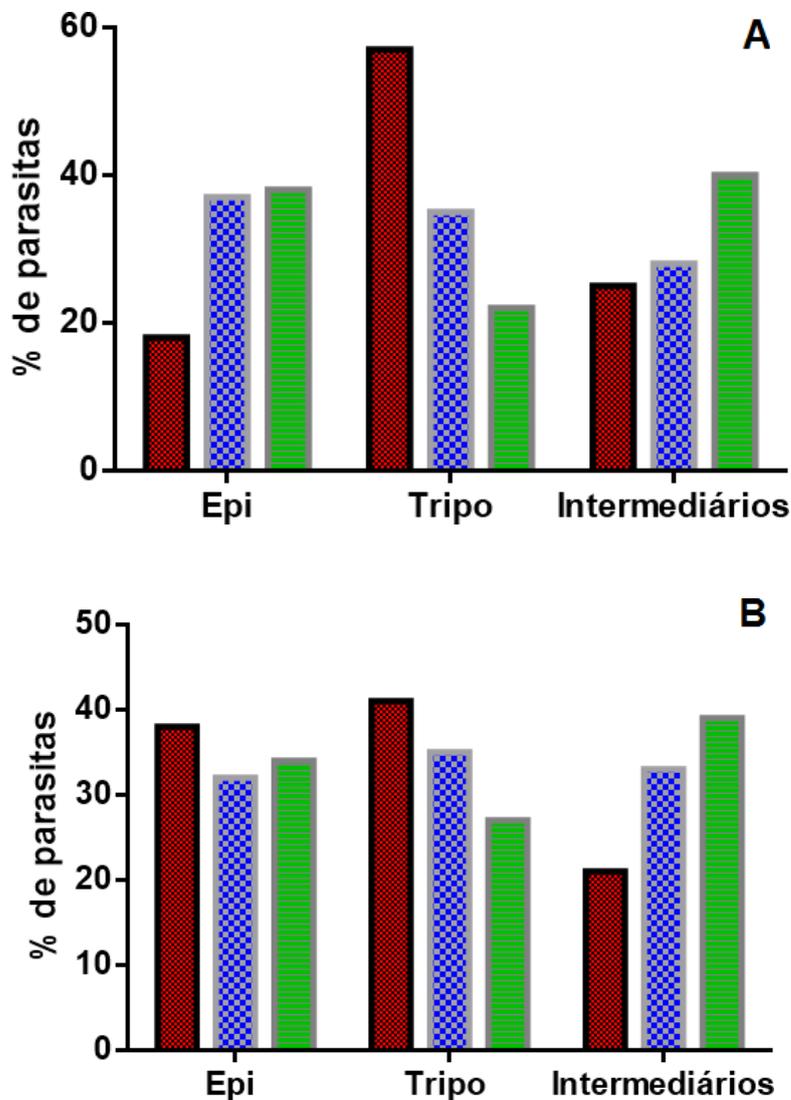


Figura 17: Efeito do biflavonoide 2'',3''-diidrochnaflavona sobre a metaciclogênese *in vitro*, de *T. cruzi*. Formas epimastigotas (2×10^5 /ml) foram incubadas em meio Grace na ausência (vermelha) ou presença de 1 (azul) ou 2,5 (verde) μ M de 2'',3''-diidrochnaflavona e mantidas a 27°C. No sétimo (A) e nono (B) dias as células foram contadas e agrupadas em epimastigotas, tripomastigotas e formas intermediárias. Para cada condição foram contadas no mínimo 100 células. Resultado representa um experimento preliminar.

4.2 Efeito do biflavonoide 2'',3''-dihidrochnaflavona sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

4.2.1. Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação do número médio de amastigotas por célula.

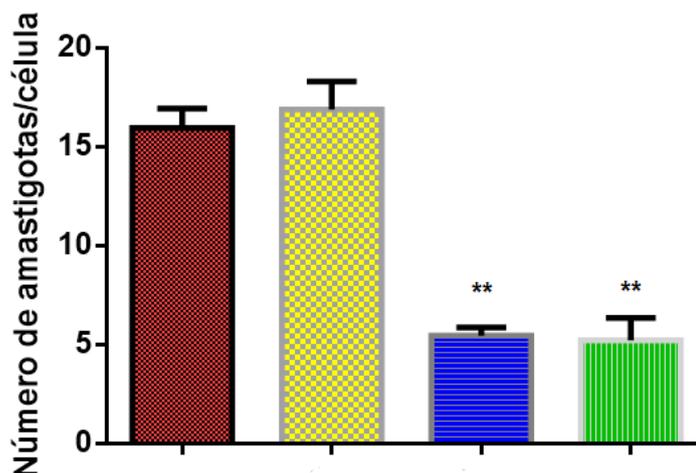


Figura 18: Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre formas amastigotas intracelulares. Macrófagos murinos foram cultivados em meio RPMI e infectados com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, cepa Y. Após 24 horas de interação, as células foram lavadas e tratadas ou não com 2,5 ou 7,5 µM de 2'',3''-diidrochnaflavona ou DMSO. Após 48 horas, as células foram novamente lavadas para retirada da droga. Após 120 horas no total, a infecção foi avaliada. A barra vermelha representa o controle; a barra amarela o controle DMSO; a barra azul representa a concentração de 2,5 µM; a barra verde representa a concentração de 7,5 µM. Os valores representam a contagem de 600 células para cada condição. Quantidade de DMSO utilizada foi equivalente a da maior concentração de droga para parasitas. ** p<0,05 em relação ao controle.

4.2.2. Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados.

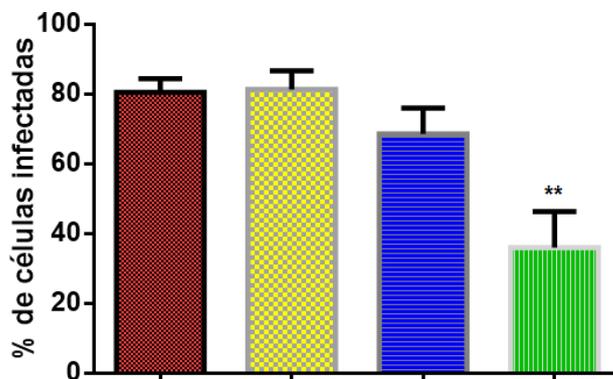


Figura 19: Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre a porcentagem de macrófagos infectados. As células receberam os mesmos tratamentos descritos acima. Barra vermelha representa o controle; a barra amarela o controle DMSO; a barra azul a concentração de 2,5 μM; a barra verde a concentração de 7,5 μM. Os valores representam a contagem de 600 células para cada condição. Quantidade de DMSO utilizada foi equivalente a da maior concentração de droga para parasitas. ** p<0,05 em relação ao controle.

4.2.3. Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Avaliação do índice de associação.

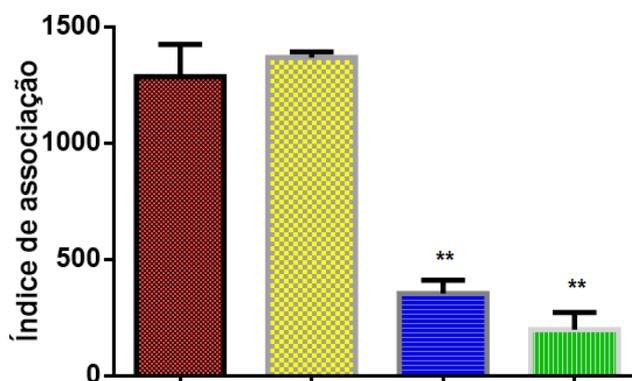


Figura 20: Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre o índice de associação entre *T. cruzi* e macrófagos tratados ou não com 2,5 ou 7,5 μM do composto ou DMSO. As células receberam os mesmos tratamentos descritos acima. Barra vermelha representa o controle; a barra amarela o controle DMSO; a barra azul a concentração de 2,5 μM; a barra verde a concentração de 7,5 μM. Os valores representam a contagem de 600 células para cada condição. Quantidade de DMSO utilizada foi equivalente a da maior concentração de droga para parasitas. ** p<0,05 em relação ao controle.

4.2.4. Efeito de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre amastigotas intracelulares. Microscopia óptica.

Macrófagos murinos foram cultivados em meio RPMI e infectados com *T. cruzi* na forma tripomastigota metacíclica, após 24 horas de interação as células foram lavadas com PBS e tratadas ou não com 2,5 ou 7,5 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona. Após 48 horas de tratamento, as células foram lavadas novamente para retirada da droga e mantidas em estufa por mais 72 horas. Após 120 horas do início da infecção, as células foram fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa. As células foram observadas em microscópio (Niikon Eclipse E200)

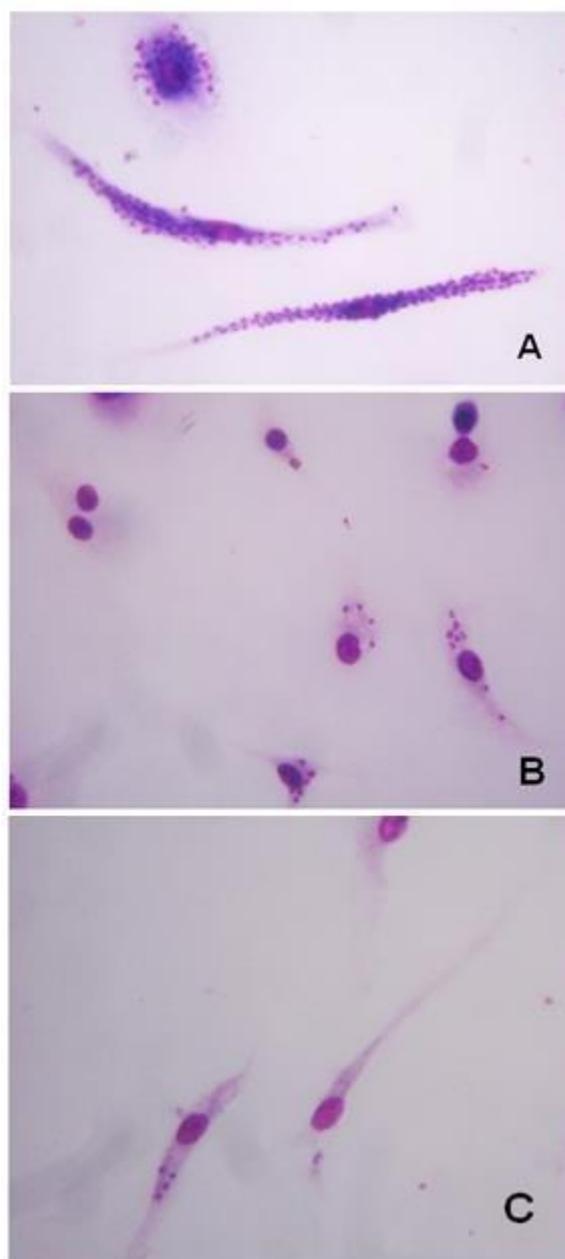


Figura 21: Microscopia óptica de macrófagos infectados com amastigotas de *T. cruzi* corados com Giemsa. A: Controle; B: 2,5 μM ; C: 7,5 μM de 2'',3''-diidrochnaflavona. Aumento de 400 x.

4.3 Efeito do biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona sobre células murinas.

Com a finalidade de avaliar a atividade citotóxica do composto para células do hospedeiro foram realizados ensaios com população enriquecida de linfócitos extraídos do baço de camundongo e macrófagos peritoneais murinos. A viabilidade foi avaliada pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan, que permite verificar a viabilidade celular através de danos à membrana citoplasmática e pelo teste do XTT que verifica a atividade de uma desidrogenase mitocondrial. Nossos resultados demonstraram que tanto população enriquecida de linfócitos quanto macrófagos tratados com 2'',3''diidrochnaflavona continuam apresentando considerável viabilidade. O diluente do biflavonóide, DMSO, também não apresentou efeito sobre viabilidade das células quando comparado ao controle.

4.3.1. Efeito de 2'',3'' diidrochnaflavona na viabilidade de população enriquecida de linfócitos por Azul de Trypan.

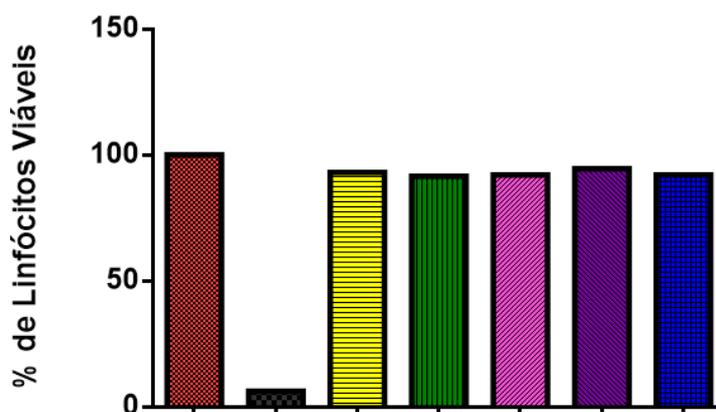


Figura 22: Citotoxicidade de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre população enriquecida de linfócitos isolados do baço de camundongo *in vitro*. As células foram incubadas em meio RPMI suplementado na presença ou ausência (vermelho) de 50 (verde), 25 (rosa), 15 (roxo) e 7,5 µM (azul) de 2'',3''-diidrochnaflavona por 48h. Quantidade de DMSO (amarelo) utilizada foi equivalente à da maior concentração de droga para células. A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os resultados representam dois experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

4.3.2. Efeito de 2'',3'' diidrochnaflavona na viabilidade de macrófagos murinos por Azul de Trypan.

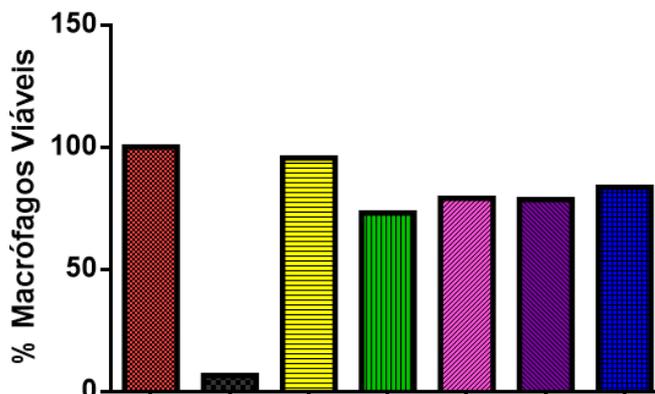


Figura 23: Citotoxicidade de 2'',3''-diidrochnaflavona sobre macrófagos peritoneais de camundongo *in vitro*. As células foram incubadas em meio RPMI suplementado na presença ou ausência (vermelho) de 50 (verde), 25 (rosa), 15 (roxo) e 7,5 µM (azul) de 2'',3''-diidrochnaflavona por 48h. Quantidade de DMSO (amarelo) utilizada foi equivalente à da maior concentração de droga para células. A viabilidade celular foi avaliada por meio do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os resultados representam dois experimentos independentes realizados em triplicatas e expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

4.3.2. Efeito de 2'',3'' diidrochnaflavona na viabilidade de macrófagos murinos por XTT.

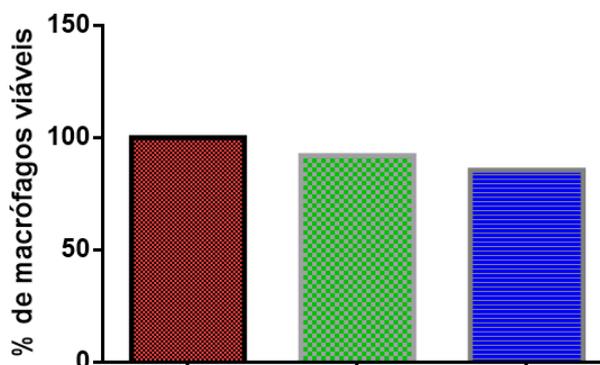


Figura 24: Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em RPMI e tratados ou não (vermelho) com ou 5 (verde) ou 15 (azul) µM de 2'',3''-diidrochnaflavona. Após 48 horas, as células foram lavadas e mantidas em estufa por mais 72 horas. Após 120 horas no início do tratamento, a viabilidade celular foi estimada pelo método de XTT. Os resultados representam dois experimentos independentes realizados em triplicata e expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

5. DISCUSSÃO

Mesmo após mais de 100 anos da descoberta e caracterização da doença de Chagas ainda não existe uma terapêutica que seja considerada totalmente eficiente e satisfatória para esse mal. Os tratamentos atuais só conferem cura na fase aguda da doença e não são capazes de diminuir a carga parasitária conforme a doença avança para a fase crônica. Sua eficácia depende ainda da cepa do parasita. Além disso, os fármacos atualmente utilizados no tratamento, Nifurtimox e Benznidazol, levam ao desenvolvimento de inúmeros efeitos colaterais para seus usuários. Levando em consideração o número de pessoas infectadas, o número de pessoas em risco de contrair a doença e as limitações causadas pela doença de Chagas é imprescindível a busca por novas propostas de tratamento, que sejam mais eficientes e apresentem menos efeitos colaterais (URBINA, 1999). Observando ainda a complexidade do quadro patológico na doença de Chagas um medicamento que elimine completamente o parasita do organismo é muito importante, mas não há como saber se apenas a eliminação iria conferir a cura da doença, principalmente na fase crônica, onde danos tanto na cardiomiopatia ou megacólon já se encontram em estado bem avançado, assim como o desencadeamento autoimune provocado pela infecção. Por isso a busca de tratamentos em conjunto, que combatam além do parasita os sintomas e danos causados pela doença é importante.

Produtos de origem natural são uma fonte crescente de possibilidades de novas drogas que possam, no futuro próximo, serem utilizadas em tratamentos de doenças ou até mesmo substituir os atuais medicamentos utilizados que apresentem efeitos colaterais graves. Produtos naturais com ação microbicida, antiprotozoários, antitumoral e anti-HIV vêm sendo identificados nas últimas décadas (IZUMI et al, 2011). Entre 1981 e 2010 produtos de origem natural e pequenas moléculas sintéticas derivadas de produtos naturais ou com base em um produto natural, foram responsáveis por mais de 50% de novas entidades químicas (TEMPONE et al., 2007).

O Brasil é um país com grande riqueza biológica e diversidade tanto de fauna quanto de flora, logo um campo muito vasto e interessante a ser explorado pela farmacologia é o de produtos de origem natural, e dentre os produtos que podem ser utilizados, os compostos derivados de plantas são uma fonte quase inexplorada e infinita de possibilidades. Os compostos secundários originados de plantas são utilizados, primariamente, por elas para sua proteção contra patógenos e herbivoria. Diversas características microbicidas, fungicidas e anti-virais já foram atribuídas a esses compostos (TEIXEIRA et al., 2014).

No trabalho de Ribeiro e colaboradores (2012) foi realizado o isolamento de 9 compostos ou metabólitos secundários de *Luxemburgia nobilis*, uma planta endêmica do sudeste brasileiro, dentre eles 2'',3''- diidrochnaflavona. Já foi atribuída ação antitumoral e inibidora de topoisomerase I e topoisomerase II- α por Daniel e colaboradores (2007) a esse composto.

A especificidade de ação de uma nova terapêutica é um ponto muito importante, e a partir de estudos mais aprofundados do parasita temos a oportunidade de identificar possíveis alvos de ação. Alguns já são bem conhecidos, como a cruzipaina, principal cisteíno-protease de *T. cruzi*, em todas as suas formas evolutivas (URBINA, et al. 1996), um importante fator de virulência para o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência do parasita. Compostos que atuem especificamente inibindo essa protease são ótimos candidatos para o tratamento da doença, já que não devem atingir o hospedeiro. Em testes com alguns compostos como N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinil-sulfonefenil, foi observado o bloqueio da proliferação de formas epimastigotas e amastigotas intracelulares e o impedimento da metaciclologênese in vitro. Em modelos murinos esse composto foi eficiente em prolongar a sobrevivência dos hospedeiros e promover a cura na fase aguda e crônica, porém tratamentos com esse composto requerem doses relativamente altas (ENGEL et al., 1999).

Outro alvo bastante estudado para o tratamento é a biossíntese de esteróis do patógeno, os ergosteróis. Diversas substâncias testadas, como os azóis, demonstram inibir a síntese do esteroil C14 α demetilase dependente de citocromo P- 450 (URBINA et al., 1998). Mevinolin, que inibiu 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (CONCEPCION et al., 1998) e azasterol, que inibiu Δ (24) 25 esteroil metil transferase (URBINA et al., 1998 e CONTRERAS et al., 1997). Todos esses são componentes importantes dos esteróis do parasita, moléculas essenciais para a sobrevivência do mesmo.

Cada vez mais compostos de origem natural estão sendo utilizados em propostas de tratamento. Alguns trabalhos recentes demonstram resultados satisfatórios em formas epimastigotas. O tratamento com óleos essenciais de *Chenopodium ambrosoides*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* apresentam baixo IC50 para formas epimastigotas de *T. cruzi* (BORGES et al., 2012). Quando tratados com óleos de orégano e timo os resultados de inibição do crescimento das formas epimastigotas extracelulares também são promissores, mesmo apresentando IC50 para 24 horas de 175 e 78 $\mu\text{g/ml}$ (SANTORO et al., 2006). Nossos resultados demonstraram que o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona é eficaz contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando um IC50 de 2,5 μM com 96 h de tratamento, o IC50 de benznidazol para 72 h de tratamento é de 15,8 μM .

Nas pesquisas em doença de Chagas e produtos naturais são mais frequentemente encontrados resultados positivos na forma epimastigota do parasita. Esta forma é, aparentemente, mais sensível aos fármacos, e é um modelo fácil para iniciar o rastreamento de novos derivados de plantas devido à facilidade de seu cultivo, apesar de não ser infectiva para o hospedeiro mamífero. Algumas estruturas celulares presentes nesta forma diferem do que se encontra nas formas infectivas tripomastigotas e amastigotas. Muitas vezes não é possível realizar testes nas formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, pois muitos laboratórios não têm os recursos financeiros necessários para manter animais infectados ou até mesmo cultura de células. Como resultado, muitos compostos são testados apenas contra as formas não infectivas do parasita (TEMPONE et al., 2007)

A incubação do composto 2'',3''-diidrochnaflavona sobre formas epimastigotas levou a alterações morfológicas evidentes como inchaço mitocondrial, aumento no número de corpos lipídicos e organização atípica do kDNA. Apesar de os mecanismos de ação do composto em uso ainda não terem sido caracterizados, a partir das estruturas alteradas com o tratamento nos parasitas observadas pela análise ultraestrutural por microscopia eletrônica, podemos especular sobre como o composto age. Medina e colaboradores, 2012 sugerem que quando há alterações mitocondriais nos parasitas, como observadas no presente trabalho, normalmente, também podem ser observadas alterações lipídicas. Observamos além do inchaço mitocondrial, acúmulo de corpos lipídicos.

Adade e colaboradores, 2010 identificam em seu trabalho características estruturais que seriam indícios de apoptose. Dentre as estruturas modificadas que podem indicar célula apoptótica está alteração na mitocôndria. Danos na mitocôndria podem levar à formação de poros na sua membrana, liberando no citoplasma citocromo c, que é um dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória e que aí se associa a uma proteína Apaf-1 que permitirá sua ligação a uma procaspase, formando um complexo molecular conhecido como apoptossomo, que levará a célula à apoptose. No presente trabalho foram identificadas alterações morfológicas importantes na mitocôndria, porém esses indícios não são suficientes para afirmar que são sinais de apoptose. Para os parasitas, a apoptose pode ocorrer de forma natural, como modo de regular o número de parasitas em um vetor e em determinados tecidos. Porém, quando a apoptose é estimulada por um fator externo, como por um tratamento com uma droga o parasita não tem controle sobre o número de células que sofrerão esse processo. Outro processo de morte celular programada onde as alterações estruturais da mitocôndria são importantes é a necrose programada (MENNA-BARRETO, 2009).

Podemos, ainda, comparar as alterações estruturais encontradas em nosso trabalho com outras, obtidas por outros tratamentos. Parasitas tratados com piperina, apresentam, com três dias de tratamentos, alterações mitocondriais semelhantes às encontradas no nosso trabalho, como um inchaço da membrana mitocondrial ao redor do kDNA (FREIRE-DE-LIMA, 2008). A mesma observação foi feita para parasitas tratados com veneno de *Appis melífera*: uma intensa vacuolização indicando formação do autofagossoma, além de inchaço mitocondrial e projeções da membrana plasmática (ADADE, 2012). Quando tratados com veneno de *Crotalus viridis viridis* muitas organelas dos parasitas são danificadas, ocorrendo a perda de material das organelas para o citoplasma. A membrana nuclear também apresenta alterações morfológicas, como expansões e foi constatada a presença de figuras mielínicas na mitocôndria além de formação de reservossomos (ADADE, 2010). Quando tratados com posaconazol, é notável a formação de vacúolos nas membranas citoplasmática e mitocondrial. É possível, ainda, ver a formação de vesículas na membrana na região do flagelo, alterações no complexo de Golgi e perda da compactação do kDNA. Parasitas tratados com amidarona exibiram estruturas tipo mielínicas, inchaço da região do cinetoplasto, inchaço do espaço perinuclear e desorganização do cinetoplasto. É visível também formação de vesículas próximas a bolsa flagelar e a formação de autofagossomas (VEIGA-SANTOS, 2012). De forma geral, alterações mitocondriais parecem ser frequentes em células tratadas, e essa foi umas das mais importantes alterações observadas no presente trabalho.

Outra alteração importante foi observada no kDNA, organela presente nos membros da família Trypanosomatidae e por isso um bom alvo no tratamento contra parasitas dessa família. O kDNA possui mecanismo de replicação próprio, que deve ocorrer durante o ciclo celular e ser segregado entre as células filhas (ZUMA et al, 2014). Um importante componente nesse processo é a topoisomerase-II. Olivera e colaboradores, em 2007 propuseram que 2'',3''-diidrochnaflavona pode inibir a topoisomerase-II α . Como uma das alterações observadas pelo tratamento ocorreu na organização do kDNA podemos acreditar que uma inibição na topoisomerase-II seja responsável por essa alteração. Quando o processo de replicação do kDNA está alterado, podem ser geradas células sem kDNA. É interessante notar que mesmo com uma alteração morfológica nessa organela importante do parasita, o ciclo celular, a princípio, não foi alterado.

Ao investigar mais a fundo as possíveis alterações lipídicas apresentadas pelos parasitas tratados não foi observado alteração nos parasitas marcados com Nile Red, marcador de lipídios neutros, principalmente. Como mencionado anteriormente, um ótimo alvo para uma droga contra *T. cruzi* é o metabolismo de lipídio do parasita, já que apresenta diferenças em relação ao metabolismo de lipídio do hospedeiro. Alguns inibidores de intermediários da via metabólica de lipídios nesses parasitas já foram identificados como E5700 e ER-119884, inibidores de Squalene sintase (SQS) ou posaconazole, inibidor de C14 α -lanosterol demetilase. Apesar de os ensaios utilizados nesse trabalho não terem demonstrado alterações lipídicas, outros ensaios, mais específicos ainda podem ser realizados, como, por exemplo, uma TLC (Thin-layer chromatography), que separa lipídios neutros e polares, para comparar o perfil lipídico de parasitas tratados com parasitas não tratados.

Algumas drogas, como a colchicina (LEUNG et al., 2015), alteram o ciclo celular a partir de diferentes mecanismos de ação, como inibição da polimerização de microtúbulos, impedindo a divisão celular. Com os resultados do experimento realizado, não foi possível detectar alterações no ciclo celular de *T. cruzi* tratados nos levando a entender que o ciclo celular nas formas epimastigotas não é alterado pelo composto.

A forma amastigota intracelular é a mais difícil de ser combatida, pois uma droga efetiva deve atingir o seu habitat natural que é o interior das células hospedeiras, as quais apresentam muitos mecanismos para proteção da própria célula contra agentes citotóxicos. Os compostos devem ser capazes de passar através da membrana plasmática da célula

hospedeira. Por esse motivo, substâncias que aumentam a permeabilidade da membrana ou agem sobre bombas de efluxo podem ser consideradas.

O biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona demonstrou um efeito muito interessante nas formas amastigotas intracelulares. Podemos constatar que a droga é capaz de agir no interior da célula, logo, que o composto penetra no citoplasma. O número de parasitas por célula infectada cai quase três vezes nas células tratadas. Esse é um indício de que a proliferação de amastigotas dentro dos macrófagos infectados é alterada de alguma forma. A porcentagem de células infectadas sofre uma redução significativa quando comparado ao controle, na maior concentração testada de 7,5 µM. Quando multiplicamos esse parâmetro pelo número médio de parasitas por célula e obtemos o índice de associação, a redução é muito evidente, podendo ser notada também nas imagens de microscopia óptica de macrófagos infectados. Em alguns ensaios com outros compostos de origem natural podemos observar resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho como no trabalho de Adade e colaboradores 2010, onde foi determinado IC₅₀ de 0.158 µg/ml após 24 horas de tratamento. Os ensaios com extratos de *Hypoestes forsskalii*, *Kleinia odora*, *Psiadia punctulata*, *Capparis spinosa*, *Euphorbia schimperiana*, *Ricinus communis*, *Marrubium vulgare* e *Solanum villosum*, apresentaram inibição de 50% dos amastigotas com a concentração máxima de 0,25 µg/ml ABDEL-SATTAR, MAES & SALAMA, 2010).

Ainda deve ser investigado se o efeito na diminuição de amastigotas intracelulares se deve a uma atividade anti-amastigota e/ou por ativação dos macrófagos, que combateriam então, com mais intensidade os parasitas intracelulares. Para investigar essa possibilidade, ensaios verificando a produção de óxido nítrico (NO) por macrófago em contato com a droga serão realizados. Outro ponto a ser levado em consideração é que esses trabalhos são, normalmente, realizados em monocamadas de células. A atividade dos compostos em modelos com camadas múltiplas de células ainda deve ser investigada, sempre que possível, assim como em modelos animais, já que permitiriam avaliar a atividade dos compostos em condições mais aproximadas as reais.

De modo geral o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona apresentou resultados satisfatórios em relação ao tratamento desses parasitos, apresentando alta inibição dos parasitos na forma epimastigota e também na forma amastigota, além de alterações morfológicas consideráveis, que indicam sérios danos aos parasitas. Um importante ponto muito favorável desse estudo é o fato de o composto não apresentar toxicidade para células hospedeiras testadas, como população enriquecida de linfócitos e macrófagos murinos. Mais estudos devem ser realizados para maior elucidação da ação dessa droga sobre os parasitas e os hospedeiros, porém os resultados apresentado aqui, com auxílio de dados de outros trabalhos já publicados por outros grupos, demonstram que a quimioterapia para doença de Chagas a partir de composto naturais é possível e muito promissora.

6. CONCLUSÕES

O biflavonoide 2'',3''-diidrochnaflavona, extraído de *Luxemburgia nobilis* possui atividade contra *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, inibindo o crescimento de formas epimastigotas.

Dependendo da concentração do composto, o tratamento pode apresentar efeito tripanocida ou tripanostático.

O biflavonoide leva a alterações morfológicas em parasitas epimastigotas tratados com diferentes concentrações como alterações mitocondriais e lipídicas, além do kDNA..

O composto não leva a alterações no ciclo celular do parasita na forma epimastigota.

O biflavonoide 2'',3''-diidrochnaflavona possui atividade contra formas amastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, diminuindo o número médio de parasitas por célula e a porcentagem de macrófagos infectados.

Não foi observada toxicidade para células do hospedeiro, tais como macrófagos e população enriquecida de linfócitos, pelos testes de exclusão por azul de Trypan e XTT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SATTAR, E., MAES, L., SALAMA, M. M. *In Vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease.* Phytotherapeutic Research, v. 24, p. 1322–1328, 2010.
- ADADE, C.M., CONS, B.L., MELO, P.A., SOUTO-PADRÓN, T. *Effect of Crotalus viridis viridis snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of Trypanosoma cruzi.* Parasitology, 138,46–58, 2010.
- ADADE, A.M., CHAGAS, G.S.F., SOUTO-PADRÓN, T. *Apis mellifera venom induces different cell death pathways in Trypanosoma cruzi.* Parasitology, 139,1444– 1461, 2012.
- AVILA, J.L.; AVILA, A. Exp. Parasitol, 51, 204, 1981
- AUFDERHEIDE, A. C., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHL, F., ARRIAZA, B., RENIER, C., WITTMERS JR, L. E., FORNACIARI, G., ALLISON, M.; *A 9,000-year record of Chagas' disease.* Proc Natl Acad Sci, v. 101, p. 2034–2039, 2014.
- AYO, C. M., DALALIO, M. M. O., VISENTAINER, J. E. L, REIS, P. G., SIPPERT, E. A., JARDULI, L. R., ALVES, H. V., SELL, A., M. *Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes.* BioMed Research International ID 284729, 2013.
- BARRETT, M. P., BRUCHMORE, R. J. S., STICH, A., LAZZARI, J. O., FRASH, A. C., CAZZULO, J. J., KRISHNA, S.: *The trypanosomiasis.* Lancet, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BRAND, G. D., LEITE, J. R., SILVA, L. P., ALBUQUERQUE, S., PRATES, M. V., AZEVEDO, R. B., CARREGARO, V., SILVA, J. S., BRANDÃO, R. A., BLOCH, C. *Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. J. Biol. Chem., v. 277, 2002.*
- BRICEÑO-LEÓN, R: *Chagas disease and globalization of the Amazon.* Cad Saude, v. 23, p. 33-40, 2007.
- CAMPOS, F.R., JANUARIO, A.H., ROSAS, L.V., NASCIMENTO, S.K., PEREIRA, P.S., FRANCA, S.C., CORDEIRO, M.S., TOLDO, M.P., ALBUQUERQUE, S. *Trypanocidal activity of extracts and fractions of Bertholletia excelsa.* Fitoterapia 76:26–29, 2005.
- CDC. <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/index.html>, acesso em 2013.
- CHAGAS, C. *Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 1, p. 159–218, 1909.
- CONCEPCION, J.L.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; URBINA, J.A. Arch. Biochem. Biophys., 352, 114, 1998
- CONTRERAS, L.M.; VIVAS, J.; URBINA, J.A. Biochem. Pharmacol., 53, 697, 1997.

COURA, J. R.. *Chagas disease: what is known and what is needed - A background article*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J.R., DIAS, J. C. P. *Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104 (Suppl. I), p. 31-40, 2009

COURA, J. R., VIÑAS, P. A. *Chagas disease: a new worldwide challenge*. Nature, v. 465, 2010.

COURA, J. R. *The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, V. 110(3), p. 277-282, Maio, 2015.

CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., DE MESSIAS, I.. *Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to na immunodominant Trypanosoma cruzi antigen*. Proc Natl Acad Sci, v. 92, p. 3541–3545, 1995.

DANIEL, J.F.S., ALVES, C.C.F., GRIVICICH, I., DA ROCHA, A.B., CARVALHO, M.G. *Antitumor activity of biflavonoids from Ouratea and Luxemburgia on human cancer cell lines*. Indian J. Pharmacol. 39: 184-186, 2007.

DIAS, J. C. P., SCHOFIELD, C. J. *The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 94 (Suppl. I), p. 103-121, 1999.

ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; MCKERROW, J.H. J. Cell. Sci., 111, 597, 1998.

FERREIRA, L. F., JANSEN, A. M., ARAÚJO, A: *Chagas disease in prehistory*. An Acad Bras Cienc, v. 83, p. 1041–1044, 2011.

FLORES-LÓPEZ, C. A., MACHADO, C. A.: *Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among Trypanosoma cruzi lineages and support a single hybridization prior to human contact*. PLoS Trop Negl Dis, v. 5, 2011.

FREIRE-DE-LIMA, L., RIBEIRO, T.S., ROCHA, G.M., BRANDÃO, B.A., ROMEIRO, A., MENDONÇA-PREVIATO, L., PREVIATO, J.O., FREIRE-DE-LIMA, M.E., CARVALHO, T.M.U., HEISE, N.. *The toxic effects of piperine against Trypanosoma cruzi: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms*. Parasitol Res 102:1059–1067, 2008.

GARCIA, E. S., RATCLIFFE, N. A., WHITTEN, M. M., GONZALEZ, M .S., AZAMBUJA, P. *Exploring the role of insect host factors in the dynamics of Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus interactions*. J Insect Physiol, v. 53, p. 11 21, 2007.

GARZON, S. A. C.; LORGA, A. M.; JACOB, J .L. B. *In Anais Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, pp.106-110, 1979.

- GEBREKRISTOS, H. T., BUEKENS, P. Mother-to-Child *Transmission of Trypanosoma cruzi*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society, Vol. 3, Suppl 1, p. 36–40, 2014.
- HAMILTON, P. B., TEIXEIRA, M. M. G., STEVENS, J. R: *The evolution of Trypanosoma cruzi: the ‘bat seeding’ hypothesis*. Trends Parasitol, v. 28, p. 136–141, 2012.
- IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., VEIGA JUNIOR, V., F., NAKAMURA, C. V. *Natural products and Chagas’ disease: a review of plant compounds studied for activity against Trypanosoma cruzi*. Nat. Prod. Rep., V. 28, N. 809, 2011.
- JIMENEZ, V. *Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in Trypanosoma cruzi*. Res Microbiol, v.165(3), p. 155–165, 2013.
- JIMENEZ-COELLO, M., GUZMAN-MARIN, E., PEREZ-GUTIERREZ, S., POLANCO-HERNANDEZ, G. M., ACOSTA-VIANA, K. Y. *Antitrypanosomal activity of Senna villosa in infected balb/c mice with Trypanosoma cruzi during the sub acute phase of infection*. Afr J Tradit Complement Altern Med, v. 8(S), p. 164-169, 2011.
- JONES, A. J., GRKOVIC, T., SYKES, M. L., AVERY, V. M. *Trypanocidal Activity of Marine Natural Products*. Mar. Drugs, v. 11, p. 4058-4082, 2013.
- KELLY, J.M.; TAYLOR, M.C.; SMITH, K.; HUNTER, K.J.; FAIRLAMB, A.H. European Journal of Biochemistry, 218, 29, 1993.
- KRETTLI, A. U., BRENER, Z. *Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies*. J Immunol, v. 128, p. 2009–2012, 1982.
- KIERSZENBAUM, F. *Chagas’ disease and the autoimmunity hypothesis*. Clin Microbiol Rev., v. 12(2), p. 210–223, 1999.
- LENZI, H. L., JANSEN, A. M., DEANE MP. *The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.79, p. 13-18, 1984.
- LEON, J. S., ENGMAN, D. M. *The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease*. Front Biosci. V. 8, p.315–322, 2003.
- LEUNG, Y. Y., HUI, L. L KRAUS, V. B. *Colchicine Update on Mechanisms of Action and Therapeutic Uses*, Seminars in Arthritis and Rheumatism, doi.org/10.1016/j. semarthrit. 2015.
- MARIN-NETO, J. A., RASSI, A.J.R, MACIEL, B.C., SIMOES, M.V., SCMIDT, A. *Chagas heart disease*. In: Yusuf, Cairns JA, Camm AJ, Fallen EL, Gersh BJ, eds. Evidence-based cardiology, 3rd edn. London: BMJ Books, 823-41, 2010.
- MESIA, G. K.,TONA, G. L., NANGA, T. H., CIMANGA, R. K., APERS, S., COS, P., MAES, L., L. PIETERS, L., VLIETINCK, A. J. J. *Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo* Ethnopharmacol, v. 115, p. 409–415, 2008.

MENNA-BARRETO, R. F. S., SALOMÃO, K., DANTAS, A. P., SANTA-RITA, R. M., SOARES, M. J., BARBOSA, H. S., DE CASTRO, S. L. *Different cell death pathways induced by drugs in Trypanosoma cruzi: An ultrastructural study*. *Micron*, v. 40, p.157–168, 2009.

MEDINA, J.M., RODRIGUES, J.C., DE SOUZA, W., ATELLA, G.C., BARRABIN, H. *Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylatedsterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in Leishmania amazonensis promastigotes*. *Parasitology*, 139,1253–1265, 2010.

MILES, M. A: *The discovery of Chagas disease: progress and prejudice*. *Infect Dis Clin North Am*, v. 18, p. 247260, 2004.

MYLES, M. A. American Trypanosomiasis (Chagas' disease). In Manson's Tropical Diseases. 22nd edition. Edited by Cook GC, Zumla AI. London: W.B. Elsevier; 2009:1327–1340.

NAGAJYOTHI, F., MACHADO, F. S., BURLEIGH, B. A., JELICKS, L. A., SCHERER, P. E., MUKHERJEE, S., LISANTI, M. P., WEISS, L. M. *Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease*. *Cell Microbiol*, v. 14, p.14:634–643, 2012.

NOGUEIRA, N. P. A., MORGADO-DÍAZ, J. A., MENNA-BARRETO, R. F. S., PAES, M.C., DA SILVA-LÓPEZ, R. E. *Effects of a marine serine protease inhibitor on viability and morphology of Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas disease*. *Acta Tropica*, v. 128, p. 27–35, 2013.

OLIVEIRA, M.M.C., CARVALHO, M.G., SILVA, C.J., WERLE, A. *A new biflavonoid and others constituents from Luxemburgia nobilis (EUCHL)*, *J. Bras Cham Soc*; 13. 119-23, 2002.

OLIVEIRA, M.M.C., CARVALHO, M.G., GRYNBERG, N.F., BRIOSO, O.S. *A biflavonoid from Luxemburgia nobilis as inhibitor of DNA Topoisomerase*. *Planta Med*; 71:1-3, 2005.

PELIZZARO-ROCHA, K. J., VEIGA-SANTOS, P., LAZARIN-BIDOIA, D., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., XIMENES, V., F., SILVA, S. O., NAKAMURA, C. V. *Trypanocidal action of eupomatenoide-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infections*, v. 13, p. 1018-1024, 2011.

PIZZOLATTI, M. G., KOGA, A. H., GRISARD, E. C., STEINDEL, M *Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species*. *Phytomedicine*, v. 9, p. 422-426, 2002.

PRATA, A: *Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, p. 81-88, 1999.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan, 2008.

SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G.L., SALGADO, A.P.S.P., MENNA-BARRETO, R.F.S., SOARES, M.J. *Effect of oregano (Origanum vulgare L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure*. *Parasitol Res* (2007) 100:783– 790, 2006.

SHERLOCK I. A. Vetores. In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-40, 2000.

STEVERDING, D. *The history of Chagas disease*. Parasites and Vectors, v. 7, n. 317, jul, 2014.

SILVA-NETO, M. A. C., FAMPA, P., CAIAFFA, C. D., CARNEIRO, A. B., ATELLA, G. C. *Cell Signaling During Trypanosoma cruzi Development in Triatominae*. The Open Parasitology Journal, v. 4, p. 188-194, 2010.

TEIXEIRA, T., TEIXEIRA, S. C., DA SILVA, C. V., DE SOUZA, M. A. *Potential therapeutic use of herbal extracts in Trypanosomiasis*. Pathogens and Global Health, v. 108, n. 1, 2014.

TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., MADY, C., FERNANDES, F. *Natural Products to Anti-trypanosomal Drugs: An Overview of New Drug Prototypes for American Trypanosomiasis*. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, v. 5, p. 222-235, 2007.

URBINA, J.A.; VIVAS, J.; LAZARDI, K.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; PIRAS, M.M.; PIRAS, R. *Chemotherapy*, 42, 294, 1996.

URBINA, J.A. *J. Mol. Med.*, 77, 332., 1999.

URBINA J.A. *Chemotherapy of Chagas Disease*. Current Pharmaceutical Design, 8, 287-295, 2002.

URBINA J.A. *Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 311-318, 2009.

URBINA J.A. *New Advances in the Management of a Long-Neglected Disease*. Clinical Infectious Diseases;49:1685-7, 2009.

URBINA J.A. *Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches*. Acta Tropica 115 55-68, 2010.

URBINA, J. A. *Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives*. Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 0, p. 1-8, 2014.

WALSH, J. F., MOLYNEUX, D. H., BIRLEY, M. H: *Deforestation: effects on vector-borne disease*. Parasitology, v. 206, p. 55-75,1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organ Fact Sheet 2014.

ZINGALES, B., MILES, M. A., CAMPBELL, D. A., TIBAYRENC, M., MACEDO, A. M., TEIXEIRA, M. M. G., SCHIJMAN, A. G., LLEWELLYN, M. S., LAGES-SILVA, E., MACHADO, C. R., ANDRADE, S. G., STURM, N. R: *The Revised Trypanosoma cruzi*

subspecies nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol, v.12, p. 12:240–253, 2012.

ZUMA, A. A., CAVALCANTI, D. P., ZOGOVICH, M., MACHADO, A. C. L., MENDES, I. C., THIRY, M., GALINA, A., DE SOUZA, W., MACHADO, C. M., MOTTA, M. C. M. *Unveiling the effects of berenil, a DNA-binding drug, on Trypanosoma cruzi: implications for kDNA ultrastructure and replication.* Parasitol Res, DOI 10.1007/s00436-014-4199-8, out, 2014.

