

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS *Campus*
DE CAMPO GRANDE

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

GUSTAVO GONÇALVES

***Atividade anti *Trypanosoma cruzi* de *Pogonopus tubulosus* e
*Ocotea lancifolia****

Campo Grande – MS

Janeiro – 2017

GUSTAVO GONÇALVES

**Atividade anti *Trypanosoma cruzi* de *Pogonopus tubulosus* e
*Ocotea lancifolia***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Alda Maria Teixeira Ferreira

Co-orientadora: Ângela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Campo Grande – MS

Janeiro – 2017

TERMO DE APROVAÇÃO

GUSTAVO GONÇALVES

Atividade anti *Trypanosoma cruzi* de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2017

Comissão Examinadora:

Alda Maria Teixeira Ferreira

UFMS

Maria Carolina Silva Marques

UFMS

Fernanda Rodrigues Garcez

UFMS

*Ao meu grupo de pesquisa, laboratório e ciência do país,
minha humilde contribuição...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, pai, irmã e vó pelo imenso apoio e incentivo que recebi durante os dois anos de mestrado, assim como durante toda minha vida. Todas as dificuldades ficam menores com vocês do meu lado. Vocês são meu ar e meu chão. Amo muito vocês, obrigado!

Agradeço ao meu amor, por estar sempre do meu lado nos momentos mais difíceis e nunca desistir de mim, compartilhando minhas tristezas e alegrias. Sempre que as coisas ficavam ruins era para você que eu corria e tudo ficava bem. Obrigado por ser esse namorado e amigo incrível. Te amo muito.

Agradeço aos meus amigos, minha segunda família que a vida me deu de presente. Adriana e Alyne, da escola para o resto da vida, não tenho palavras para agradecer tudo o que já fizeram por mim, amo vocês com todo meu coração. Cynthia, uma das melhores coisas que a faculdade me deu foi sua amizade, sempre presente e com um coração imenso para todos meus problemas, te amo muito amiga. Dylan e Mel, sem vocês “a trindade” nunca vai estar completa, meus irmãos do coração, quando tudo ficava difícil, lembrava de vocês e meu dia ficava um pouco mais leve. Olga, Bianca, Johnny, Japa, Dario, vocês fazem minha vida mais bonita e alegre, muito obrigado por sua amizade! Amo vocês!

Agradeço os professores e alunos do laboratório de imunologia e ensaios biológicos da UFMS. Professoras Inês e Cacilda muito obrigado por todo o apoio durante esses seis anos em que tive a honra de trabalhar no laboratório. Vocês são uma inspiração para mim como profissionais e o aprendizado que tive com vocês vou levar para toda minha vida.

Muito obrigado a todos os atuais e ex alunos do grupo “HPVetis”. Ana, Thiago, Mari, Camilinha, Karla, Andrielli, Larissa, obrigado pela ajuda e amizade durante todos esses anos, eles foram mais bonitos e alegres com vocês ao meu lado.

Obrigado a todos os ex e atuais alunos do grupo “Cruzissomos”. Carol, Júlio, Cynthia, Tiago, Fabíola, Leandro e todos estagiários e ICs que passaram por lá, meu muito obrigado! Toda troca de experiência, companheirismo e amizade sincera fizeram desse grupo um grande sucesso, que vou levar para o resto da minha vida comigo.

Agradeço especialmente a minha orientadora Alda por todo o auxílio e amizade durante esses seis anos de orientação. Assim que entrei na faculdade tive a sorte de ter você como orientadora. Boa parte do que sou hoje devo a senhora. Ao longo desse período minha admiração pelo seu profissionalismo, respeito e ética só aumentaram. Você é uma inspiração para mim como professora, pesquisadora e pessoa. Muitíssimo obrigado por tudo!

Agradeço a todos os professores e professoras que me ajudaram de alguma forma para a realização deste estudo, em especial as professoras Alessandra

(Parasitologia), Ana Paula (Microbiologia), Fabiana (Bioquímica) e Carol (Microbiologia) pelas excelentes colocações no exame de qualificação.

Agradeço ao CNPq e a FUNDECT pelo financiamento do presente projeto, além de projetos correlacionados. Agradeço a Capes pela bolsa de mestrado recebida durante os últimos um ano e meio. E por fim, agradeço a UFMS pelo apoio e por proporcionar a realização do presente estudo.

Resumo: *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas nas Américas. É responsável por milhares de óbitos a cada ano e incapacita milhares de indivíduos ao trabalho, gerando assim, um grande ônus para o governo com o tratamento dos doentes. Os tratamentos atualmente utilizados são eficazes em 50% dos casos em fase aguda, porém são ineficazes no estágio crônico da doença. Nesse contexto, a utilização de bioensaios permite a detecção da atividade biológica de um extrato vegetal de maneira simples e aponta para estudos em busca de novos compostos com propriedades terapêuticas, além da elucidação de aspectos da biologia básica do parasita. O presente trabalho tem como objetivo a determinação da atividade anti *T. cruzi* de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia*. Foram avaliadas a ação de diversos extratos, frações e alcaloides isolados de ambas as plantas frente às formas epimastigotas e amastigotas do parasita, por meio do ensaio do MTS, além da citotoxicidade frente as células Vero, por meio do ensaio do MTT. Além da atividade biológica, foram também elucidados alguns mecanismos de ação de alcaloides de *P. tubulosus* por meio de ensaios de curva de recuperação, influência no perfil proteico, exposição de Fosfatidilserina, degradação do DNA e ciclo celular. Os resultados indicam a potente ação de *P. tubulosus* frente as formas epimastigotas e amastigotas do parasita (com valores de IC₅₀ inferiores à da droga controle Benznidazol) além de índices moderados de seletividade. O ensaio de curva de recuperação demonstrou a atividade tripanostática dos alcaloides isolados de *P. tubulosus* frente ao parasita, sendo corroborados pelos ensaios de exposição de fosfatidilserina e degradação do DNA (indicando ausência de eventos de morte celular), além de uma diminuição geral na síntese proteica. *P. tubulosus* representa uma promissora fonte de alcaloides com atividade biológica anti *T. cruzi*. A ausência de morte celular nos tratamentos com os isolados possibilita uma maior facilidade no estudo da biologia básica do parasita, que é de suma importância para o aumento das chances e possibilidades no tratamento da doença.

Palavras-chave: Alcaloides, bioensaios, curva de recuperação, fosfatidilserina, ciclo celular.

Abstract: *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease. It is responsible for thousands of deaths each year and disables thousands of individuals to work, generating a great onus for the government with the treatment of patients. The treatments used today are effective in 50% of the cases in acute phase, but are ineffective in the chronic stage of the disease. The use of bioassays allows detection of the biological activity of a plant extract in a simple way and points to studies searching for new compounds with therapeutic properties. Besides the elucidation in aspects of the basic biology of the parasite. This work aims to determine the anti *T. cruzi* activity of *Pogonopus tubulosus* and *Ocotea lancifolia*. The action of several extracts, fractions and alkaloids isolated from both plants against the epimastigote and amastigote forms of the parasite were evaluated by MTS assay, in addition to cytotoxicity against Vero cells. Besides the biological activity, some mechanisms of action of *P. tubulosus* alkaloids were also investigated by recovery curve, influence on protein profile, phosphatidylserine exposure, DNA degradation and cell cycle assays. The results indicated that *P. tubulosus* has a powerful action on epimastigote and amastigote forms of the parasite (with IC₅₀ values lower than the control drug Benznidazole) in addition to moderate selectivity indexes. The recovery curve showed the tripanostatic activity of alkaloids isolated from *P. tubulosus* against the parasite, corroborated by phosphatidylserine exposure and DNA degradation tests (indicating absence of cell death events), as well as a general decrease in the synthesis protein *P. tubulosus*, represents a promising source of alkaloids with anti *T. cruzi* biological activity. The absence of cell death in the treatments with the isolates makes it easier to study the parasite's basic biology, which is extremely important for increasing the chances and possibilities in the treatment of the disease.

Key-words: Alkaloids, bioassays, recovery curve, Phosphatidylserine, cell cycle.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA A - Número de pessoas infectadas nas áreas de incidência da doença de Chagas no mundo.....	1
FIGURA B - Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro humano e no inseto vetor.....	4
FIGURA C - Benznidazol e Nifurtimox, drogas existentes para o tratamento da doença de Chagas.....	6
FIGURA D – A: <i>Pogonopus tubulosus</i> ; B: <i>Ocotea lancifolia</i>	9
FIGURA E – Curva de recuperação de formas epimastigotas do parasita após contato com as substâncias ativas por 2 horas (DL ₁₀₀).....	20
FIGURA F – Perfil proteico (SDS-PAGE) dos parasitas tratados por 72 horas com a IC ₅₀ dos AIA. C: Controle não tratado; A: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTF 10-19; B: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTC 453-24; C: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTC 4-17; M: Marcados de massa molecular (kDa).....	21
FIGURA G – Exposição de fosfatidilserina e integridade de membrana por formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c tratadas com IC ₅₀ /72h de extratos etanólicos ativos analisados por citometria de fluxo. C: Controle negativo (parasitas não marcados); A: Parasitas tratados com PTF 10-19; B: Parasitas tratados com PTC 453-24; C: Parasitas tratados com PTC 4-17.....	22
FIGURA H – Eletroforese em gel de agarose 1,5% de DNA genômico obtido dos parasitas tratados por 24 horas com a IC ₅₀ dos AIA. M: Marcador de massa molecular (pb); C: Controle positivo (parasitas não tratados); A: PTF 10-19; B: PTC 453-24; C: PTC 4-17.....	23
FIGURA I – Análise da progressão do ciclo celular em citometria de fluxo por meio de permeabilização e marcação dos parasitas com iodeto de propídio. P2: parasitas em G1; P5: Parasitas em S; P6: Parasitas em G2; C: Parasitas não tratados; A: Parasitas tratados por 72 h (IC ₅₀) com PTF 10-19; B: Parasitas tratados por 72 h (IC ₅₀) com PTF 453-24; C: Parasitas tratados por 72 h (IC ₅₀) com PTF 4-17; D: Parasitas tratados por 72 h (IC ₅₀) com droga controle Benznidazol.....	24

LISTA DE TABELAS

TABELA A - Valores de IC_{50} de extratos e frações obtidos de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia* frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tratados durante 72 horas..... **19**

TABELA B - Valores de IC_{50} de alcalóides de *Pogonopus tubulosus* frente a formas epimastigotas (tratadas durante 72h) e amastigotas (tratadas durante 24h) de *Trypanosoma cruzi* e frente a células Vero (citotoxicidade), tratadas durante 24h e 72 h. I.S.: Índice de seletividade das substâncias em relação à atividade em células Vero..... **19**

LISTA DE ABREVIATURAS E SILGAS

% - Porcentagem

°C – Graus Celcius

µg/mL – Micrograma/Mililitro

µL – Microlitro

µM – Micromolar

AI – Alcaloide isolado

AIA – Alcaloide isolado ativo

CO₂ – Dióxido de carbono

DEAE – Dietilaminoetil celulose

DL₁₀₀ – Dose letal de 100%

Dm28c – Cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada de *Didelphis marsupialis*

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FS – Fosfatidilserina

h – Hora

IC₅₀ – Índice inibitório de 50%

IP – Iodeto de propídio

IS – Índice de seletividade

kDa – Quilo Daltons

LIT – Meio *Liver Infusion Triptose*

mA – Miliampere

min – Minuto

mL– Mililitro

mM – Milimolar

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

nm – Nanometros

NP40 – *Nonyl Phenoxyethoxyethanol*

pb – Pares de base

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Porcentagem de inibição

PTC – *Pogonopus tubulosus* caule

PTF – *Pogonopus tubulosus* folha

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida em solução de SDS

TAU – *Triatomine Artificial Urine*

TAU 3AAG – *Triatomine Artificial Urine* suplementado com ácido L-aspártico, ácido

L-glutâmico, L- prolina e D-glucose

Tris – Tris aminometano

U/L – Unidade/litro

UI/mL – Unidades internacionais/mililitro

Vero – Linhagem celular de rim de macaco verde africano (ATCC).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GERAL	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909) é um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. É o agente etiológico da doença de Chagas. Ao longo do seu ciclo de vida, *T.cruzi* apresenta três principais formas evolutivas distintas (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas), que se diferenciam morfologicamente (PRATA, 2001).

O parasita assume grande relevância médica, econômica e social, por ser o agente etiológico da doença de Chagas, que representa um problema de saúde pública principalmente em países da América Latina, ocasionando milhares de óbitos a cada ano ou incapacitando milhares de indivíduos para o trabalho, gerando com isso imenso ônus para os governos com o tratamento dos doentes. Estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas em todo mundo estejam sob risco de infecção e que 6 a 7 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo *T. cruzi* principalmente na América Latina (Figura A), ocasionando cerca de 10.000 mortes por ano em todo o mundo (WHO, 2017).

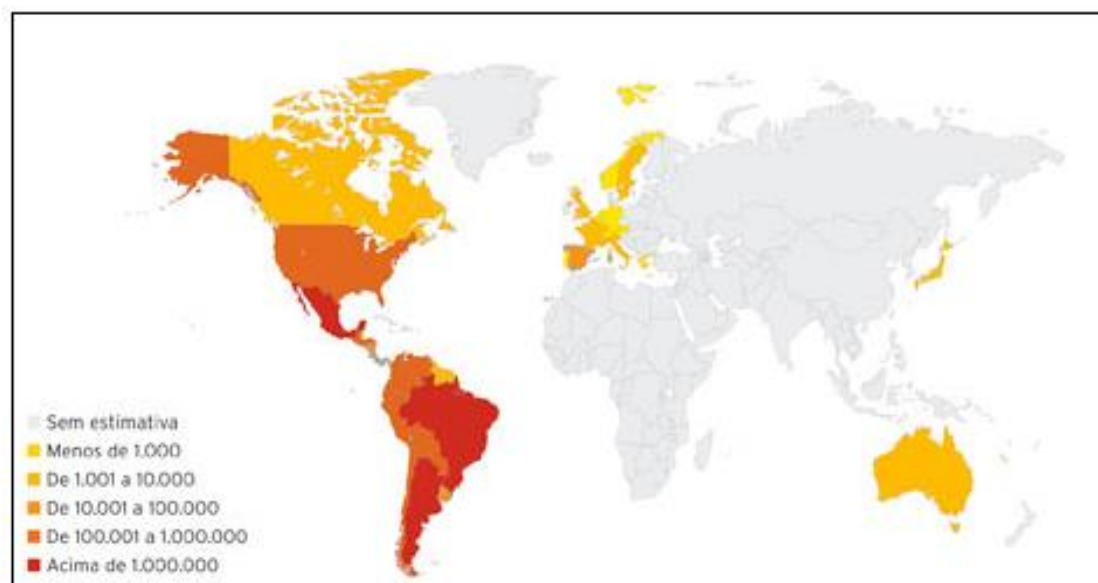


Figura A - Número de pessoas infectadas nas áreas de incidência da doença de Chagas no mundo. (COURA, 2009).

Nos últimos anos, o número de novos casos tem sido reduzido no Brasil graças a um maior controle da transmissão vetorial e transfusional (COURA & VIÑAS, 2010), no entanto, tem se observado o aumento de casos de transmissão oral, principalmente na região Norte do país (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015). Estima-se que entre 1,9 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas com a doença no país (MARTINS-MELO, 2014), além de 46 novos casos ao ano e mais de 25 mil pessoas em risco de infecção (WER, 2015). A doença de Chagas é considerada pelo Ministério da Saúde uma Doença Relacionada ao Saneamento Ambiental Inadequado (DRSAI), sendo assim as ações para o seu controle tem envolvido grandes investimentos com obras de saneamento básico, abastecimento de água e melhorias habitacionais. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Nesse contexto, mostra-se urgente a prospecção e desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas. Os produtos naturais ainda representam a principal fonte de inovação de agentes terapêuticos e os bioensaios constituem uma ótima ferramenta no *screening* e determinação da atividade biológica de extratos vegetais e substâncias isoladas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a ação anti *Trypanosoma cruzi* de extratos e isolados de *P. tubulosus* e *O. lancifolia* frente as formas epimastigotas e amastigotas do parasita, além da citotoxicidade frente as células Vero e investigação dos mecanismos de ação de alcaloides isolados de *P. tubulosus* (influência no perfil proteico, curva de recuperação, fragmentação do DNA, exposição de fosfatidilserina e progressão do ciclo celular do parasita), com vista a contribuir com o conhecimento da biologia básica do parasita e o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ciclo biológico de *T. cruzi* foi descrito por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) no início do século XX, durante a investigação de um quadro endêmico que apresentava alterações patológicas graves e que posteriormente foi denominado de

Doença de Chagas. Os estudos de Carlos Chagas não se restringiram somente à descrição da etiopatogenia da doença, mas também a estudos sobre os vetores e reservatórios, sobre o diagnóstico parasitológico e sorológico. Hoje se sabe que além da transmissão vetorial, o parasita pode ser transmitido por via sanguínea, congênita, através de transplante de órgãos e por via oral, através da ingestão de parasitas (DIAS, 2006).

A infecção no hospedeiro vertebrado se inicia quando formas infectantes do parasita (tripomastigotas metacíclicas), presentes nos dejetos (fezes e urina) do vetor (hemípteros da família Reduviidae) são eliminados durante ou logo após o repasto sanguíneo, infectando células da pele ou mucosas do mamífero que apresentem descontinuidade. Essa etapa da interação envolve uma série de moléculas, entre elas glicoproteínas de superfície, fortemente associadas à capacidade invasiva das formas tripomastigotas do parasita (SCHENKMAN *et al.*, 1993; PEREIRA *et al.*, 1996). Ao aderir à célula hospedeira, uma série de modificações ocorre em ambas as células, do hospedeiro e do parasita, podendo ocorrer o recrutamento de lisossomos no sítio de entrada do protozoário, a fusão dos mesmos, envolvendo o parasita e formando o vacúolo parasitóforo (ou fagolisossomo).

No interior das células, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, (CARVALHO & DE SOUZA, 1989; ANDREWS *et al.*, 1990) uma forma arredondada e com flagelo extremamente curto. Após intensa divisão binária, ocorre a diferenciação em tripomastigotas sanguíneos, que com o movimento intenso dos flagelos rompem as células hospedeiras, sendo liberadas na corrente sanguínea, podendo ser ingeridas pelo vetor durante o repasto sanguíneo. Após a ingestão das formas tripomastigotas pelo vetor, as mesmas se diferenciam para formas epimastigotas no intestino do inseto. Depois de sucessivas divisões as formas epimastigotas se diferenciam novamente em formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas juntamente com os dejetos do animal, dando continuidade ao ciclo (Figura B).

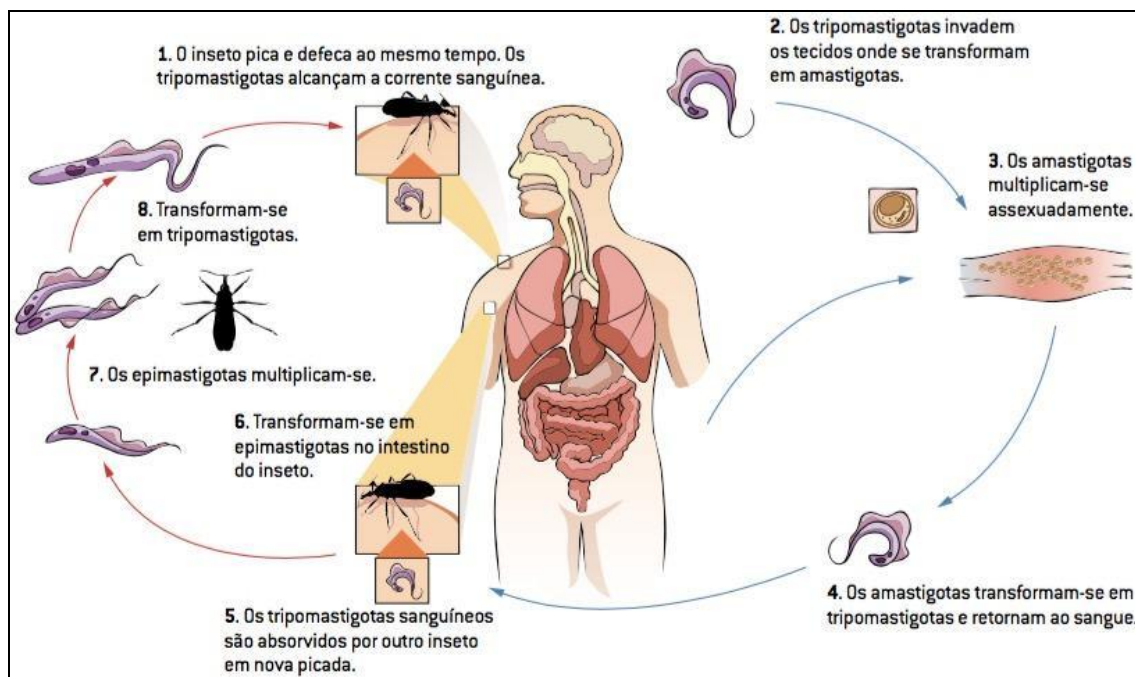


Figura B - Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro humano e no inseto vetor (<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

A adaptação do protozoário a diferentes temperaturas, disponibilidade de nutrientes e aos ambientes intra e extracelulares explica as diferentes formas evolutivas observadas no ciclo de vida do parasita, com marcantes diferenças morfológicas, ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas (BRENER, 1973; ZELEDON, 1999; DE SOUZA, 2002).

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: Aguda e crônica. O período de incubação é de aproximadamente 800 dias da transmissão vetorial e de cerca de 20 a 40 dias nos casos de transmissão por transfusão sanguínea (RASSI *et al.*, 2012). Após o período de incubação geralmente inicia-se uma fase aguda, com abundante parasitemia, facilmente reconhecida pelo exame direto de sangue e acompanhada pela presença de sintomas inespecíficos. Nesta fase, grande parte dos pacientes apresentam-se assintomáticos, podendo uma pequena parcela apresentar sintomas e sinais como febre, mal-estar, aumento do fígado, baço e nódulos linfáticos, edema subcutâneo e sinais de entrada do parasita na pele (Chagoma) e membrana da mucosa ocular (Sinal de Romana), além de outros que desaparecem espontaneamente. Menos de 5% dos pacientes morrem na fase aguda da doença (RASSI *et al.*, 2010).

Na fase crônica, aproximadamente 65% dos pacientes desenvolve sorologia positiva para o *T. cruzi* e um longo período de latência clínica que pode perdurar por 30 anos, caracterizando os casos indeterminados da doença (MACEDO, 1999; RASSI *et al.*, 2010). Cerca de 40% dos pacientes em fase crônica indeterminada evoluem para a fase crônica determinada da doença, com sintomas cardíacos e/ou digestivos além de alterações laboratoriais características da doença (PRATA, 2001; RASSI *et al.*, 2012). Esta fase se caracteriza por baixa parasitemia (CASTRO *et al.*, 2005), altos níveis plasmáticos de anticorpos circulantes e manifestações clínicas em consequência do parasitismo intracelular (FIOCRUZ, 2012). Dentre as formas mais graves da fase crônica, a cardíaca acomete cerca 30% dos pacientes, podendo conduzir a complicações tais como bradiarritmias, taquiarritmias, aneurisma apical, falência cardíaca, tromboembolismo, culminando com morte súbita (MARIN-NETO *et al.*, 2007; RASSI *et al.*, 2000). A segunda forma mais comum é a digestiva, acometendo de 10 a 15% dos pacientes e levando a complicações relacionadas à passagem do parasita pelo tecido nervoso entérico (alterações nas funções motora, secretória e absorptiva do esôfago e do trato digestório, com presença de dilatação intestinal conhecida como megaesôfago e megacólon) (RASSI *et al.*, 2012).

Adicionalmente, outro aspecto que deve ser levado em consideração é a grande variabilidade genética do parasita, que possibilitou sua divisão em seis grandes grupos (Tc I, Tc II, Tc III, Tc IV, Tc V e Tc VI). Tais grupos apresentam grandes diferenças na distribuição geográfica dentro da América Latina, propriedades biológicas e susceptibilidade à drogas e tratamentos (ZINGALES *et al.*, 2012).

Desde sua descoberta, a doença foi tratada com diversas classes de medicamentos, porém um tratamento realmente significativo surgiu apenas na década de 60, com o Nifurtimox e Benznidazol (Figura C) (CLEITON, 2010; DIAS *et al.* 2009). O Nifurtimox (Lampit® Bayer, 4[(5-nitrofurfurilideno)amino]3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido) atua via redução do grupo nitro, gerando o radical nitro-ânion instável, o qual torna a reagir para produzir metabólitos de oxigênio reduzidos altamente tóxicos (ex: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio). O mecanismo de detoxificação de *T. cruzi* para metabólitos de oxigênio é deficiente, particularmente para peróxido de hidrogênio, sendo então mais sensível ao estresse oxidativo que as células de mamíferos. No entanto, este medicamento apresenta sérios

efeitos colaterais como anorexia, náuseas, vômito e vertigem, entre outros, levando frequentemente ao abandono do tratamento. A partir da década de 80 o Nifurtimox deixou de ser empregado como forma de tratamento para a tripanosomíase no Brasil e posteriormente em outros países na América do Sul (COURA, 2002). A única droga utilizada atualmente no tratamento da doença é o Benznidazol, um derivado nitroimidazólico que não atua através de ciclo redox, mas através da formação de ligações covalentes entre radicais nitro produzidos e macromoléculas do parasita (REVELLI, S. 1999; RAJÃO *et al.* 2014).

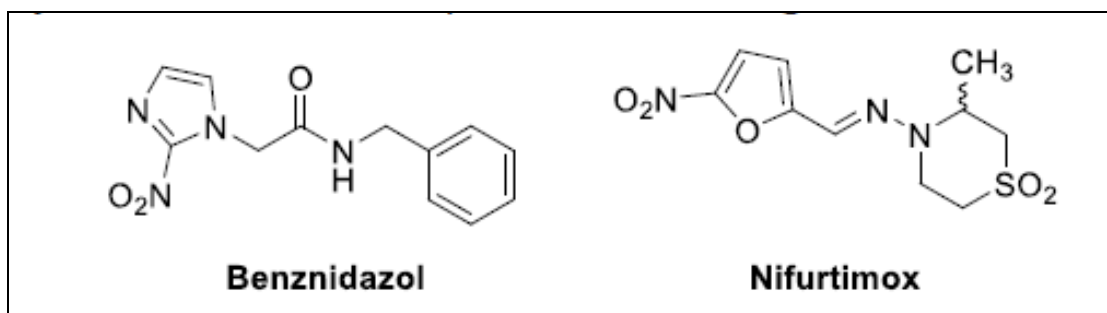


Figura C -Benznidazol e Nifurtimox, drogas existentes para o tratamento da doença de Chagas.

O Benznidazol apresenta atividade significativa na fase aguda, com cura parasitológica em mais de 80% dos pacientes tratados (CANÇADO, 1999). Entretanto, a eficácia do tratamento varia de acordo com a região geográfica, provavelmente devido à diferença na susceptibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* às drogas (ZINGALES, 2012). Também já foi demonstrado que Benznidazol é eficaz na fase crônica inicial (SOSA ESTANI *et al.*, 1998), mas com limitada eficácia na fase crônica tardia. Assim como o Nifurtimox, o Benznidazol também causa toxicidade sistêmica e efeitos adversos que incluem anorexia, náusea, vômito, febre, dermatites, dores musculares, polineuropatia periférica, além de relatos de mutagênese e dano ao DNA (ZAHOOR *et al.*, 1987; KIRCHHOFF, 1999). A administração deste fármaco durante a fase crônica da doença é discutida, pelo fato da dificuldade de monitoramento de sua eficácia terapêutica (COURA, 1996).

Além da relevância médica e econômica, os tripanosomatídeos despertam grande interesse de estudo devido ao seu caráter ancestral na escala evolutiva, apresentando estruturas e propriedades biológicas singulares, como a presença de mitocôndria única e ramificada que se estende por toda a extensão da célula, com uma

região (cinetoplasto ou kinetoplasto) localizada logo abaixo do corpúsculo basal, onde se concentra o material genético mitocondrial (SHAPIRO & ENGLUND, 1995; DE SOUZA, 2002); o núcleo esférico, com um nucléolo grande e envelope nuclear que permanece intacto durante toda a divisão celular do parasita (SOLARI, 1995); os glicossomos, um tipo especializado de peroxissomo, delimitados por membrana, onde se acumulam algumas enzimas da via glicolítica e da beta-oxidação de ácidos graxos (MICHELS & OPPERDOES, 1991; MICHELS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000) os acidocalcissomos, provavelmente envolvidos em diversos processos biológicos, tais como o armazenamento de cálcio e polifosfatos, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (DO CAMPO & MORENO, 1999; revisto por DO CAMPO et al., 2005); flagelo único, com axonema e uma complexa estrutura paraxial e único aparelho de Golgi, localizado entre o núcleo e o cinetoplasto (DE SOUZA, 1984; SOUZA, 1988; revisado DE SOUZA, 2002). Ao longo das últimas duas décadas, os novos avanços na compreensão da biologia e bioquímica de *T. cruzi* tem permitido a identificação de múltiplos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas. Inúmeras vias metabólicas e estruturas celulares têm sido estudadas com vistas à identificação de alvos promissores: vias metabólicas de biossíntese de esteróis e isoprenoides, metabolismo redox tiol-dependente, vias de transporte e metabolismo de poliaminas, vias de salvamento de purinas, dentre outros, além de organelas e estruturas importantes para o parasita, como núcleo, cinetoplasto e acidocalcissomos (revisado por DUSCHAK & COUTO, 2007). Tais mecanismos são constantes alvo de estudos envolvendo produtos naturais e/ou seus derivados.

A utilização de bioensaios além de permitir a detecção da atividade biológica de um extrato vegetal, substância isolada ou substância sintética sobre um organismo vivo, é uma abordagem para a busca de novos compostos com propriedades terapêuticas a serem estudados e explorados. Os produtos naturais ainda representam a principal fonte de inovação de agentes terapêuticos. Muitos são os exemplos de drogas obtidas de plantas e que se encontram até hoje na terapêutica, como atropina de *Atropa belladonna*, morfina e codeína de *Papaver somniferum*, a digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* ou Taxol de *Taxus brevifolia* (SHU, 1998) (WANI, 1971).

A ação de diversas plantas como potentes agentes antiprotozoários (SALEM & WERBOVETZ, 2006) têm sido evidenciada por diversas pesquisas, assim como a atividade anti *T. cruzi* de extratos vegetais brutos (CACERES *et al.*, 1998; MAFEZOLI *et al.*, 2000; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2001) bem como de compostos isolados dos mesmos, como alcalóides (MORELLO *et al.*, 1995), taxóides (BAUM *et al.*, 1981), lignanas (BASTOS *et al.*, 1999), terpenos (NEIRA *et al.*, 1998) e quinonas (DE CASTRO *et al.*, 1994).

Ocupando cerca de 20% do território nacional o Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em tamanho apenas pela Amazônia, além de ser considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002). Apresenta uma altíssima riqueza de flora com mais de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas da área (IBAMA, 2007). Dessa forma, representando sozinho 5% da biodiversidade do planeta, sendo considerado a savana mais biodiversa do mundo (MMA, 2009).

Apesar da rica flora, esta se apresenta pouco explorada como fonte de novos compostos biologicamente ativos. Estima-se que apenas 1% das plantas encontradas nesse bioma sejam registradas como fonte de compostos ativos com potencialidade para utilização na síntese de medicamentos, valor bem abaixo do encontrado em demais sistemas florestais similares (RODRIGUES, 2010). Nos últimos 35 anos cerca de 60% dos dois milhões de Km² do Cerrado foram desmatados e substituídos principalmente por pastagens e culturas anuais. Devido a suas altas taxas de endemismo, rica biodiversidade e intenso desmatamento o Cerrado tornou-se um *hotspot* de conservação de nível mundial (KLINK & MACHADO, 2005), salientando a urgência da implementação de medidas de conservação deste bioma, assim como sua exploração como fonte de novos compostos com atividades biológicas.

Dentre as plantas de alto interesse farmacológico encontradas no cerrado podemos destacar o *Pogonopus tubulosus* (A. Rich.) K. Schum (Rubiaceae) (Figura D). Trata-se de um arbusto que cresce em florestas subtropicais da América do Sul (bem como no Cerrado) conhecido pela alta produção de alcaloides (SAUVAIN, 1996) e que fornecem drogas chamadas "Falsas quinas". A família a qual pertence é conhecida pela grande variedade de metabólitos secundários como Iridóides (MOURA, *et al.*, 2006), alcalóides (HENRIQUES *et al.*, 2000), Antraquinonas

(LING, *et al.*, 2002), Flavonóides, derivados fenólicos, Triterpenos, Diterpenos, Cumarinas (LUCIANO, *et al.*, 2004), todos apresentando alto potencial biológico. Tratando-se da espécie em questão é importante ressaltar a ausência de dados anteriores em relação a sua ação frente ao *T. cruzi*, além do isolamento de diversos compostos químicos com atividade frente ao *Plasmodium falciparum*. Entre os compostos mais ativos encontram-se a Psicotrina, Cephaelina e Tubulosina, a última merecendo destaque especial, pois na concentração de 0,006 e 0,011 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir em 50% os parasitas de cepas resistentes deste protozoário (FRANÇOIS, 1996). Além disso, estudos com Tubulosinas revelaram atividade anti-proliferativa em células tumorais (PERDOMO, 2011), ressaltando ainda mais a potencial fonte de substâncias biologicamente ativas dessa espécie vegetal.

Ocotea lancifolia (Shott) Mez é uma planta da família Lauraceae popularmente conhecida como canela pilosa e usada na medicina popular devido a suas características anti-reumática, depurativa, tônica, estomáquicas, anti-inflamatória e antiparasitária (MARQUES, 2001) que ocorre naturalmente no cerrado e Pantanal sul-mato-grossense (BAITELLO, 2001) (Figura D). Está bem estabelecida a grande variedade de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Ocotea*, tais como alcaloides aporfínicos e benziltetraidroisoquinolínicos, lignanas e neolignanas, benzopiranos, monoterpênos, sesquiterpênos e fenilpropanóides (GARCEZ, 1995, 2010, 2011; LORDELLO, 1997). Inúmeros são os relatos sobre a ação anti *T. cruzi* de certas espécies do gênero *Ocotea*, como *O. paranapiacabensis* (ALVES, 2011), extrato etanólico de *O. ceanothifolia* e *O. guianensis* (FERNANDES, 2016) e de alcaloides de *O. lancifolia* (FOURNET, 2007), o que demonstra o grande potencial da planta para isolamento de novos compostos com atividade biológica contra o *T. cruzi*.



Figura D - A: *Pogonopus tubulosus*; B: *Ocotea lancifolia*. (<http://www.latinwife.com/blog/colombia/pogonopustubulosus/>; <http://lauraceae.myspecies.info/nontaxonomy/term/46?page=19>).

Nesse contexto, ressalta-se a importância de explorar espécies vegetais do cerrado Sul-Mato-Grossense, visando contribuir com o conhecimento da biologia básica do parasita e com a busca de novos compostos com potencial ação sobre o agente etiológico da doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a atividade anti *Trypanosoma cruzi* de extratos e alcaloides isolados a partir de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia*.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar a IC₅₀ de extratos, frações e alcaloides isolados a partir de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Determinar a citotoxicidade dos alcaloides isolados ativos frente às células Vero.
- Realizar ensaio de recuperação do crescimento das formas epimastigotas do parasita após o tratamento com os alcaloides isolados ativos.
- Determinar a IC₅₀ dos alcaloides isolados ativos frente as formas amastigotas do parasita.

- Avaliar a influência dos alcaloides isolados ativos no ciclo celular do parasita.
- Avaliar a influência dos alcaloides isolados ativos no perfil proteico de formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar a influência dos alcaloides isolados ativos na integridade do DNA genômico de formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar a exposição de fosfatidilserina nos parasitas tratados com os alcaloides isolados ativos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos vegetais e substâncias isoladas:

Os extratos e alcaloides isolados (AI) de *Pogonopus tubulosus* (Rubiaceae) (A. Rich. ex DC.) e *Ocotea lancifolia* (Lauraceae) (Schott) utilizados nesse estudo foram produzidos e disponibilizados pelos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos do Instituto de Química – UFMS. De *P. tubulosus* foram testados os extratos etanólico do caule, etanólico dos frutos, etanólico das folhas, fração alcaloídica do caule, não alcaloídica das folhas e alcaloídica das folhas. Além dos extratos e frações foram também testados os alcaloides isolados, aqui denominados PTC 7, PTC 45p3, PTC 453-24, PTC 4.1-6, PTC 4-17 (provenientes da fração alcaloídica do caule) além de PTF 41-43 e PTF 10-19 (provenientes da fração alcaloídica dos frutos). De *O. lancifolia* foram testadas as frações diclorometânica, hexânica, etanólica, diclorometânica/acetato de etila, acetato de etila e água/metanólica. Todos os extratos, frações e AI foram diluídos em DMSO 100% e armazenados a 4°C.

4.2 Delineamento experimental

De modo a elucidar a atividade biológica dos extratos e frações de ambas as plantas, além dos mecanismos de ação dos AI de *P. tubulosus* frente ao parasita, determinou-se o seguinte delineamento experimental. Os extratos e frações de *P. tubulosus* e *O. lancifolia*, além dos AI de *P. tubulosus*, foram testados frente as formas epimastigotas do parasita para determinação de sua IC₅₀. Os AI que se mostraram ativos (IC₅₀ < 50 µg/mL) foram selecionados para o teste frente as células Vero (citotoxicidade) e as formas amastigotas do parasita. Por fim, os alcaloides isolados ativos (AIA) que apresentavam índice de seletividade (IS) maiores que 1 foram selecionados para a investigação de seu mecanismo de ação (Curva de recuperação, Perfil proteico, exposição de FS, fragmentação de DNA e ciclo celular).

4.3 Cultivos das formas epimastigotas de *T. cruzi*:

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28 foram mantidas a 28 °C em meio LIT (*LiverInfusionTryptose*) (CAMARGO, 1964; CONTRERAS et al., 1988) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em crescimento exponencial por meio de repiques periódicos. Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas em fase exponencial de crescimento.

4.4 Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas *in vitro*:

As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* cepa Dm28c foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro*, sob condições quimicamente definidas (CONTRERAS et al., 1985; BONALDO et al., 1988). Os parasitas em fase estacionária na curva de crescimento foram coletados e incubados em TAU (*Triatomine Artificial Urine*) por 2 h a 28 °C. Decorrido esse período de estresse nutricional, os parasitas foram então transferidos para garrafas de cultura contendo o mesmo meio, suplementado de glicose e os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato de sódio (TAU3AAG). Após 96 h de incubação as formas tripomastigotas metacíclicas foram recolhidas do sobrenadante do meio de cultura e purificadas por cromatografia em DEAE-51 celulose (CONTRERAS et al., 1985).

4.5 Obtenção das formas amastigotas:

Para os ensaios contra formas amastigotas intracelulares, foram utilizadas células Vero (CCL-81) como células hospedeiras. Estas foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (pH 7,4; suplementado com 2,5% de SFB acrescido de 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina) e mantidas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C. Após avaliação da viabilidade celular, por meio do corante vital Azul de Tripan, aproximadamente 10⁶ células/mL foram então semeadas e mantidas em placas de 24 poços nas mesmas condições acima. Após 24 horas, as células foram infectadas com formas tripomastigotas do parasita, provenientes da metaciclogênese *in vitro*, na proporção de dez parasitas para cada célula Vero. Após quatro horas, os parasitas não interiorizados foram removidos e as culturas mantidas por 12 horas, para obtenção das formas amastigotas.

4.6 Potencial anti *Trypanosoma cruzi* dos extratos, frações e AI de *P. tubulosus* e *O. lancifolia* frente às formas epimastigotas do parasita:

O efeito dos extratos, frações e AI sobre a viabilidade das formas epimastigotas do parasita foi determinado pelo ensaio do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio). Células em fase exponencial foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 1x10⁶ parasitas/mL e transferidas para placas de 96 poços. As células foram então incubadas por 72h na presença de várias concentrações dos extratos e substâncias isoladas, em triplicata, e mantidas a 28 °C. Após a incubação foram adicionados 20 uL de solução de MTS (2 mg/mL) a cada poço e as placas incubadas a 28 °C por 3h. Em seguida a densidade óptica foi lida a 490 nm em um leitor µQuant®. Os compostos testados foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfoxido) e diluídos no próprio meio de cultura, de modo que a concentração de DMSO não ultrapassasse 1% (v/v) por poço, concentração que não afeta o crescimento dos parasitas. Os resultados foram expressos como a concentração de composto capaz de inibir a viabilidade do parasita em 50%

(IC₅₀). A concentração de partida para a seleção foi de 50 µg/mL. Apenas compostos com IC₅₀ ≤ 50 µg /mL foram considerados ativos (MOSMANN, 1983). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.7 Curva de crescimento dos parasitas na presença dos compostos

biologicamente ativos:

Para este ensaio foi utilizado 1 mL de cultura contendo 1.10⁶ parasitas/mL (formas epimastigotas) em fase exponencial de crescimento. A cultura foi distribuída em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio LIT e as substâncias biologicamente ativas em diversas concentrações. Após adição das substâncias, as placas foram incubadas a 28 °C e as contagens realizadas em câmara de Neubauer após 24h (para determinação da DL₁₀₀/24h) e 72h (para a determinação da IC₅₀/72h). Como controle do ensaio utilizou-se parasitas em meio LIT, na ausência das substâncias. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.8 Ensaio de recuperação dos parasitas após tratamento com compostos

biologicamente ativos:

Um mililitro de cultura contendo 6.10⁶ parasitas/mL foram tratados com elevadas concentrações (DL₁₀₀) dos AIA por 2 horas. Cerca de 5.10⁶ células foram coletadas por centrifugação a 2000xg/5min, lavadas 3 vezes em PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X e transferidas para meio de cultura (na ausência dos alcaloides) na concentração de 2.10⁶ parasitas/mL. O crescimento da cultura foi monitorado diariamente, durante 3 dias, por meio de contagem em câmara de Neubauer (KESSLER, 2013). Como controle do ensaio foram utilizados parasitas que não entraram em contato com os AIA. Tal análise permitiu avaliar o tipo de ação do composto sobre o parasita (tripanocida ou tripanostático).

4.9 Potencial anti *Trypanosoma cruzi* dos AIA frente às formas amastigotas do parasita:

Aproximadamente 5.10^4 células Vero foram mantidas na presença de formas tripomastigotas metacíclicas ($2,5.10^6$ parasitas/poço), durante 24 horas em placa de 24 poços, com meio RPMI (suplementado com SBF 10%), na temperatura de 37 °C. Após o período de infecção os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos por meio de duas lavagens com PBS. As células foram então incubadas por 24 horas com diferentes concentrações das substâncias biologicamente ativas, em meio RPMI. Em seguida as placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol 100% por 2 minutos e coradas com corante Dapi por 10 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata. A avaliação da atividade foi realizada por meio de contagem de 2.000 células em imagens capturadas a partir de microscópio confocal de fluorescência. Para o cálculo do PI (usado para estimar os valores da IC_{50}) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$PI = A \times B - 100\%$$

Onde: PI (porcentagem de inibição), A (nº de células totais/ nº de células infectadas) e B (nº total de amastigotas/ nº total de células) (DA SILVA JR, 2014).

4.10 Citotoxicidade dos AIA:

A toxicidade dos compostos biologicamente ativos em células de mamíferos foi avaliada incubando células Vero (5.10^5 células por poço) em placa de 24 poços em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado com SBF 10%, Penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, L-Glutamina 2 mM), na presença dos compostos biologicamente ativos em diversas concentrações. As placas foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 72 horas de incubação utilizando-se o método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). As células foram lavadas duas vezes em PBS e adicionados em cada poço 300 µL de PBS e 60 µL de MTT (5mg/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C durante 3 horas. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de SDS 10% e a leitura realizada em

espectrofotômetro a 570 nm. Os valores obtidos foram expressos como percentual de inibição (PI), o qual foi utilizado para estimar os valores da IC_{50} por meio de regressão não linear no programa GraphPadPrism®. Em paralelo foram realizados os controles, contendo Benznidazol, DMSO 1% ou na ausência das substâncias, validando assim o ensaio. Todo experimento foi realizado em quintuplicata. Os índices de seletividade (IS) foram calculados dividindo os valores de IC_{50} dos AI frente as células Vero (citotoxicidade) pelos valores de IC_{50} frente ao parasita (formas epimastigotas e amastigotas).

4.11 Avaliação da influência dos AIA no ciclo celular do parasita:

Foram utilizadas formas epimastigotas dos parasitas incubadas por 72 horas em meio LIT na presença dos compostos ativos (nas concentrações de IC_{50} pré-determinadas pelo ensaio com MTS). Após o período de incubação os parasitas foram lavados 1 vez com PBS, permeabilizados, marcados através da adição do tampão de marcação (3,4 mM Tris-HCl, 0,1% NP40, 700 U/L RNase A, 10mM NaCl e 0,0075 mM iodeto de propídeo) e imediatamente analisados em citometro de fluxo FACS Canto II Becton-Dickinson (San Jose, CA, USA), com a aquisição de 10.000 eventos nas regiões previamente estabelecidas como correspondentes à epimastigotas de *T. cruzi* (KESSLER, 2013). Para a análise dos dados utilizou-se o software Diva, considerando somente células dentro da área determinada (*gate*).

4.12 Análise estatística:

No ensaio de viabilidade do MTS a diferença de densidade óptica entre os grupos tratados e o controle foi feita pela análise de variância (teste t). A diferença da contagem parasitária entre os diferentes tempos foi feita pelo teste t pareado. Os valores de IC_{50} e $DL_{100}/24h$ foram definidos por meio de correlação não linear no programa GraphPadPrism®.

4.13 Influência dos compostos biologicamente ativos no perfil proteico dos parasitas:

Foram utilizadas formas epimastigotas dos parasitas incubadas por 72 horas em meio LIT na presença dos compostos ativos (nas concentrações de IC_{50} pré-determinadas pelo ensaio com MTS). Após 72h, formas epimastigotas de *T. cruzi*, tratadas ou não com a IC_{50} dos extratos vegetais e de compostos sintéticos ativos foram coletadas por centrifugação a $4.000 \times g$, durante 10 min e lavadas duas vezes em PBS. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS de forma a se obter uma concentração de 1.10^8 parasitas/mL e foi adicionado o tampão de amostra 4x concentrado (Tris-HCl, SDS1%, β -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol) de forma a se obter o extrato proteico total dos parasitas. Os extratos foram submetidos à incubação a uma temperatura de $95^\circ C$ por 5 minutos e armazenados a $-20^\circ C$ até o momento do uso. Alíquotas dos extratos proteicos de *T. cruzi* foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (LAEMMLI, 1970). O gel de empacotamento foi preparado na concentração de 5% e o gel de separação na concentração de 15% de acrilamida. Em cada corrida eletroforética foi adicionado um marcador de massa molecular, e esta foi procedida sob corrente constante de 25mA, durante aproximadamente 4 horas. Após a separação os peptídeos foram revelados através de banhos de coloração em solução de Azul de Coomassie e descoloração em solução de Ácido Acético-Metanol (durante 12 a 24 horas).

4.14 Influência dos compostos biologicamente ativos na integridade do DNA genômico dos parasitas:

Foram utilizadas formas epimastigotas dos parasitas incubadas por 24 horas em meio LIT na presença dos compostos ativos (nas concentrações de DL_{100} pré-determinadas por meio de contagem). Após o período de incubação os parasitas foram submetidos à extração de DNA genômico por meio do método Fenol-Clorofórmio-Alcoolisoamílico (MEDINA, 1993). As amostras de DNA genômico resultantes foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose 1,5%, sob corrente constante. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em banho de Brometo de Etídio e fotografado, a

fim de verificar a integridade do DNA genômico. Em paralelo foram realizados os controles contendo DMSO 1% ou parasitas na ausência das substâncias, validando assim o ensaio.

4.15 Avaliação de exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática por citometria de fluxo:

A possível exposição de fosfatidilserina, fosfolípídeo característico de células em apoptose, será avaliada através da utilização do kit comercial BD PharmingenAnnexin V-FITC ApoptosisDetection®, seguindo as instruções do fabricante.

5. RESULTADOS

Todas as frações, extratos e quatro, dos sete, AI de *P. tubulosus* se mostraram ativos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Todos os extratos e frações de *O. lancifolia* apresentaram IC₅₀ maiores que 50 µg/mL, sendo considerados inativos. Os resultados de citotoxicidade das substâncias ativas frente às células Vero demonstraram bons IS. Dentre os quatro AIA testados, apenas um foi excluído dos demais testes por ser mais ativo contra as células animais do que contra o parasita (IS<1). Desta forma, os AIA PTF 10-19, PTC 453-24 e PTC 4-17 foram os selecionados para os demais testes de determinação dos mecanismos de ação, por serem ativos contra as formas epimastigotas e apresentarem IS moderados. Os resultados dos AIA frente as formas amastigotas intracelulares do parasita demonstram bons resultados, com valores de IC₅₀ inferiores aos da droga utilizada atualmente no tratamento da doença (Benznidazol), além de bons níveis de seletividade (Tabelas A e B).

Tabela A - Valores de IC₅₀ de extratos e frações obtidos de *Pogonopus tubulosus* e *Ocotea lancifolia* frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tratados durante 72 horas.

Espécie vegetal	Extrato/Fração	Parte da planta	IC ₅₀ (µg/mL) / R ²
<i>Pogonopus tubulosus</i>			
	Alcaloídico	Caule	3,41 / 0,87
	Etanólico	Caule	4,58 / 0,88
	Etanólico	Frutos	5,77 / 0,94
	Etanólico	Folhas	1,06 / 0,87
	Alcaloídico	Folhas	0,65 / 0,81
	Não alcaloídico	Folhas	0,93 / 0,84
<i>Ocotea lancifolia</i>			
	Diclorometano	Casca do caule	> 50
	Hexânico	Casca do caule	> 50
	Etanólico	Casca do caule	> 50
	Diclorometano/acetato de etila	Casca do caule	> 50
	Acetato de etila	Casca do caule	> 50
	Hidrometanólico	Casca do caule	> 50
Benznidazol			14,61/0,85

Nota: R² = coeficiente de determinação.

Tabela B - Valores de IC₅₀ de alcaloides de *Pogonopus tubulosus* frente a formas epimastigotas (tratadas durante 72h) e amastigotas (tratadas durante 24h) de *Trypanosoma cruzi* e frente a células Vero (citotoxicidade), tratadas durante 24h e 72 h. I.S.: Índice de seletividade das substâncias em relação à atividade em células Vero.

Alcaloide	Epimastigota	Amastigota	Vero (Citotoxicidade)		I.S.	
	IC ₅₀ (µg/mL)/R ²	IC ₅₀ (µg/mL)/R ²	IC ₅₀ (µg/mL)/R ²		Epimastigota	Amastigota
	72 h	24 h	24 h	72 h	72 h	24 h
PTC 4.1-6	8,5 / 0,83			4,49 / 0,81	0,52	

PTF 10-19	0,21 / 0,89	0,43 / 0,98	0,74 / 0,86	0,81 / 0,93	3,86	1,72
PTC 453-24	0,18 / 0,81	0,51 / 0,92	1,72 / 0,81	0,34 / 0,91	1,88	3,37
PTC 4-17	0,33 / 0,91			2,17 / 0,87	6,57	
PTC 7	> 50					
PTC 45p3	> 50					
PTF 41-43	> 50					
Benznidazol	14,61/0,85	11,1 / 0,98				

Nota: I.S.= IC_{50} Vero/ IC_{50} epimastigotas em 72h de tratamento; IC_{50} Vero/ IC_{50} amastigotas em 24 h de tratamento. R^2 =coeficiente de determinação. PTC: Alcaloide isolado do caule de *P.tubulosus*; PTF: Alcaloide isolado dos frutos de *P.tubulosus*.

O ensaio de recuperação indicou a atividade tripanostática dos AIA testados frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura E). Estatisticamente não houve diminuição do número de parasitas após o contato com os AIA por 2 horas, no entanto, após a retirada dos mesmos, as populações voltaram a crescer em uma taxa menor, em comparação ao controle.

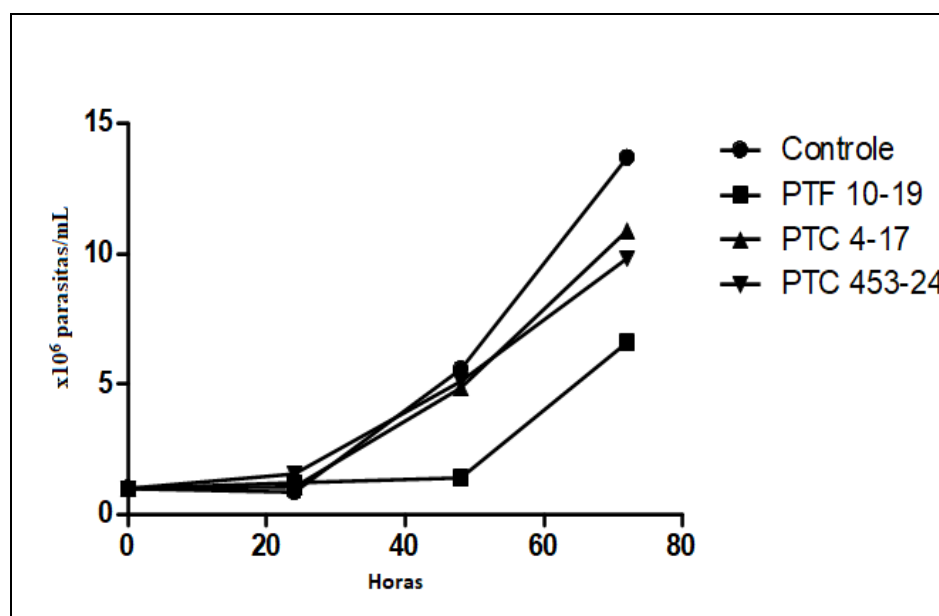


Figura E - Curva de recuperação de formas epimastigotas do parasita após contato com as substâncias ativas por 2 horas (DL₁₀₀).

A análise do perfil proteico indicou uma redução geral na expressão de proteínas dos parasitas tratados com os AIA selecionados (Figura F). Uma vez que o número de parasitas foi normalizado entre os tratamentos e o controle, a alteração na concentração de peptídeos no gel pode ser atribuída exclusivamente ao tratamento.

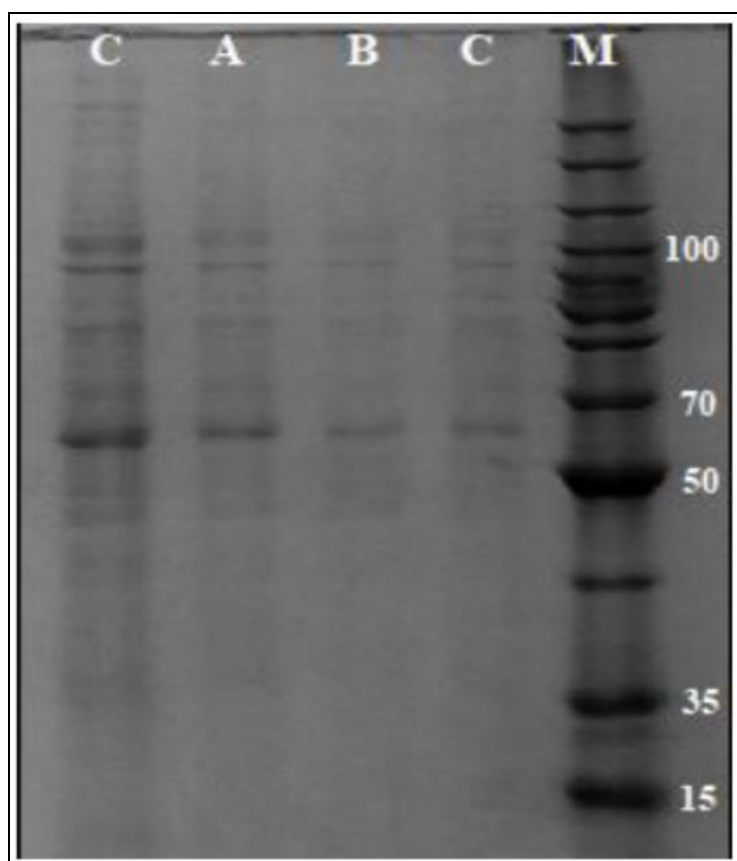


Figura F - Perfil proteico (SDS-PAGE) dos parasitas tratados por 72 horas com a IC_{50} dos AIA. C: Controle não tratado; A: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTF 10-19; B: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTC 453-24; C: Extrato proteico de parasitas tratados com o alcaloide PTC 4-17; M: Marcados de massa molecular (kDa).

A análise por citometria de fluxo dos parasitas tratados com os AIA demonstrou que não houve exposição de PS ou marcação do DNA por IP (Figura G) todas as populações se localizaram na área correspondente ao duplo negativo do gráfico, indicando a integridade da membrana plasmática e ausência de eventos de morte celular por apoptose ou necrose. Tal resultado foi corroborado pela integridade do DNA genômico dos parasitas após o tratamento com os AIA (Figura H).

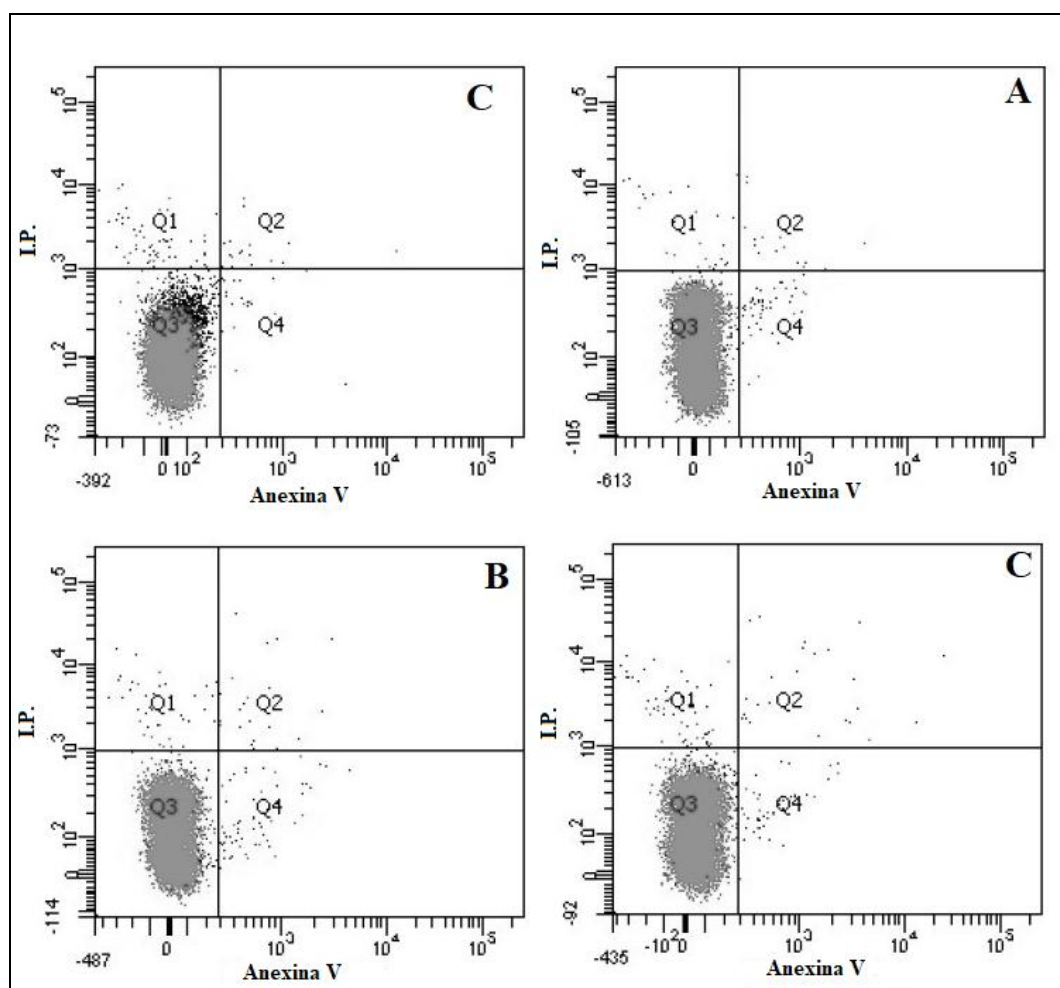


Figura G - Exposição de fosfatidilserina e integridade de membrana por formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c tratadas com IC₅₀/72h de extratos etanólicos ativos analisados por citometria de fluxo. **C:** Controle (parasitas não marcados); **A:** Parasitas tratados com PTF 10-19; **B:** Parasitas tratados com PTC 453-24; **C:** Parasitas tratados com PTC 4-17.

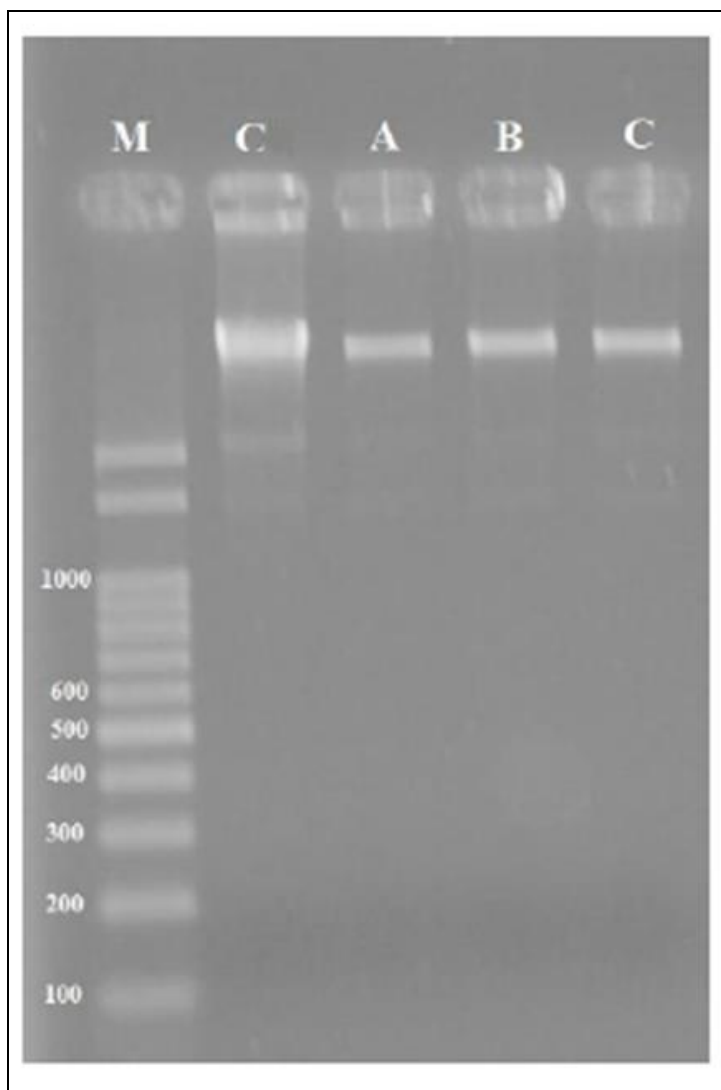


Figura H - Eletroforese em gel de agarose 1,5% de DNA genômico obtido dos parasitas tratados por 24 horas com a IC_{50} dos AIA. M: Marcador de massa molecular (pb); C: Controle (parasitas não tratados); A: PTF 10-19; B: PTC 453-24; C: PTC 4-17.

A análise em citometria de fluxo revelou ainda que o tratamento por 72 h (IC_{50}) com os AIA não influenciou na progressão do ciclo celular dos parasitas. Todos os grupos tratados não apresentaram diferença no número de células em G1, S e G2 em relação ao controle não tratado (Figura I).

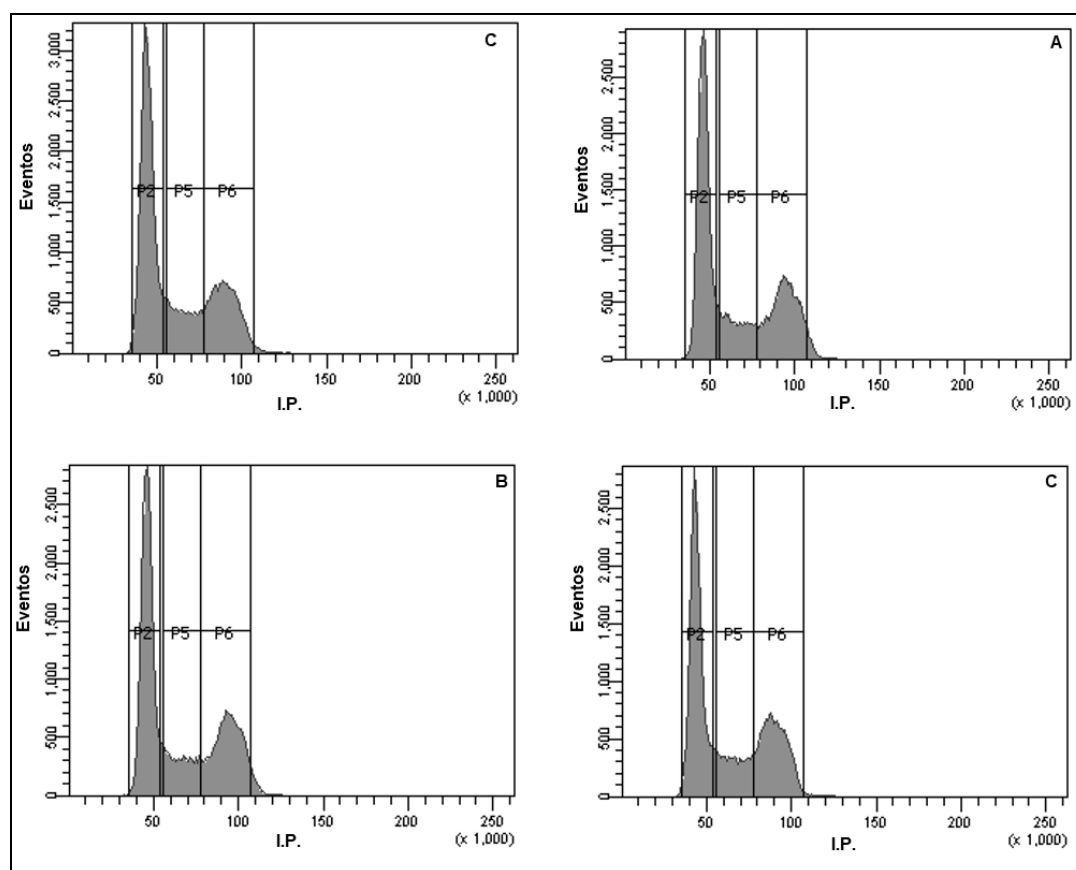


Figura I – Análise da progressão do ciclo celular em citometria de fluxo por meio de permeabilização e marcação dos parasitas com iodeto de propídio. P2: parasitas em G1; P5: Parasitas em S; P6: Parasitas em G2; C+: Parasitas não tratados; A: Parasitas tratados por 72 h (IC₅₀) com PTF 10-19; B: Parasitas tratados por 72 h (IC₅₀) com PTF 453-24; C: Parasitas tratados por 72 h (IC₅₀) com PTF 4-17.

6. DISCUSSÃO

Todos os extratos, frações e alcaloides isolados ativos de *P. tubulosus* apresentaram valores de IC₅₀, frente as formas epimastigotas do parasita, inferiores a droga controle Benznidazol. Em relação aos isolados, quatro dos sete alcaloides testados apresentaram atividade contra as formas epimastigotas, demonstrando a alta variedade de compostos ativos da planta e o potencial de isolamento de novos

alcaloides com atividade biológica. Apesar do relato de atividade de alcaloides isolados da planta frente a *P. falciparum* (FRANÇOIS, 1996) e linhagem de células tumorais (PERDOMO, 2011), não há relatos anteriores da atividade da planta sobre *T. cruzi*. Ainda são poucas as informações em relação a caracterização química desta espécie, no entanto sua alta produção de alcaloides já é conhecida (SAUVAIN, 1996). Os alcaloides constituem a maior classe de metabólitos secundários e são tradicionalmente substâncias com alta atividade biológica e citotoxicidade (WINK, 1998, 1999) WAKSMUNDZKA-HAJNOS *et al.*, 2008), influenciando em diversos mecanismos celulares, tais como interação com DNA, RNA, biossíntese de proteínas, biomembranas, proteínas do citoesqueleto, canais de transporte e diversos sistemas enzimáticos (WINK, 1998, 1993, 2000).

Apesar do relato da atividade biológica de espécies do gênero *Ocotea* frente a *T. cruzi* e *Leishmania* sp. (ALVES *et al.* 2012; FOURNET, 1994, 2007; MONTE NETO, 2007) os extratos e frações isoladas de *O. lancifolia* se mostraram inativas contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Estudos realizados por Sánchez-Soárez e colaboradores (2011) revelaram a atividade de isolados *O. macrophylla* frente a *L. panamensis* e *L. braziliensis*, embora os extratos brutos não tenham demonstrado atividade contra os parasitas. O autor sugere então a possível presença de substâncias com atividade antagônica nos extratos, o que explicaria sua atividade apenas quando as mesmas se encontram isoladas (SÁNCHEZ-SUÁREZ *et al.* 2011).

Os valores de IC₅₀ dos isolados ativos obtidos de *P. tubulosus* frente as formas amastigotas do parasita foram maiores do que em comparação as formas epimastigotas, devido ao tempo de exposição às drogas (24 horas para amastigotas e 72 horas para epimastigotas). As substâncias isoladas se mostraram cerca de 22 vezes mais ativas do que o controle com Benznidazol. Uma vez que as formas amastigotas são as principais responsáveis por boa parte dos sintomas da fase crônica da doença (fase onde o medicamento utilizado atualmente é ineficaz) (SOSA ESTANI *et al.*, 1998), a atividade de novas substâncias contra tais formas é de fundamental importância visando o desenvolvimento de novos fármacos.

Concordando com a conhecida citotoxicidade de alcaloides frente a células animais (WAKSMUNDZKA-HAJNOS *et al.*, 2008), os AIA testados apresentaram valores reduzidos de IC₅₀ (alta citotoxicidade). Por outro lado, a forte atividade frente

as formas epimastigotas e amastigotas do parasita compensaram a alta citotoxicidade, resultando em IS moderados. São diversas as vias metabólicas e/ou enzimas específicas de *T. cruzi* quando comparadas ao hospedeiro humano. Dentre alguns exemplos podemos destacar a enzima GADPH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), envolvida na via glicolítica e que apresenta alta divergência estrutural com a enzima humana (NYASSE *et al*, 2004), síntese de ergosterol (em detrimento a colesterol em humanos) (URBINA, 2010), DNA topoisomerase (SLUNT *et al*, 1996), cisteína proteases (CHAI *et al*, 2005) e o sistema de balanço redox tripanotiona/tripanotionaredutase (em detrimento ao sistema glutational/glutationaredutase em humanos) (MACCARI *et al*, 2011). Desta forma os resultados indicam a provável influência dos compostos em sistemas enzimáticos ou mecanismos de ação específicos do parasita, resultando em sua seletividade.

A curva de recuperação dos parasitas após o contato com as substâncias ativas por 2 horas (DL_{100}) mostrou que não houve diminuição do número de parasitas em relação ao controle sem os compostos, no entanto os parasitas, mesmo após a retirada dos mesmos, tiveram suas taxas de crescimento alteradas. Os parasitas tratados com os compostos PTC 453-24 e PTC 4-17 voltaram a crescer, porém em uma taxa inferior à do controle, resultando ao final das 72 horas uma redução de cerca de 17% do número de parasitas em comparação ao grupo não tratado. Já os parasitas tratados com a substância PTF 10-19 permaneceram com a concentração semelhante ao do inóculo inicial (1.10^6 parasitas/mL) até 48 horas após a retirada das drogas. Ao final das 72 horas apresentaram uma redução de 80% do número de parasitas em relação ao controle. Tais resultados indicam a ação dos compostos sobre mecanismos que influenciam a proliferação celular, impedindo ou reduzindo a multiplicação dos parasitas mesmo após a retirada das drogas, sem, no entanto, provocar a lise das células. São variados os exemplos de alcaloides com atividade sobre a proliferação celular, entre eles podemos destacar a Vimblastina ou Vincristina (cujo o efeito sobre células tumorais se explica pela inibição do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular na metáfase) (CORRÊA, 1995), as Podofilotoxinas (inibição da Topoisomerase II), Camptotecina (inibidor de Topoisomerase I) (GRANADA *et al*, 2007; MANTLE *et al*, 2000).

O perfil eletroforético dos extratos proteicos totais dos parasitas tratados com as substâncias ativas (IC₅₀) por 72 horas revelou uma redução geral na concentração de peptídios nas amostras. Como pode ser observado no apêndice D, não houve sub ou sobre expressão de nenhum grupo de peptídeos, mas sim uma possível redução na taxa de expressão proteica, decorrendo provavelmente da queda do metabolismo e proliferação celular (dado confirmado segundo ensaio com MTS e curva de recuperação) em decorrência da ação dos compostos em uma ou mais vias metabólicas do parasita.

Um dos mais importantes e bem estudados marcadores de apoptose celular é a exposição de fosfatidilserina (PS) ao meio extracelular, em decorrência da perda da assimetria da membrana celular durante o processo de morte celular (TEPPER, 2000; FADOK *et al.* 1992). Além da exposição de PS são diversos os marcadores de morte celular, tanto por apoptose (fragmentação com padrão internucleosomal do DNA genômico com manutenção da integridade de membrana plasmática) quanto por necrose (ausência de padrão de fragmentação do DNA e permeabilização da membrana plasmática) (SARASTE, 2000). Os resultados obtidos por citometria de fluxo com os parasitas tratados com as substâncias ativas por 72 horas revelou que não houve exposição de fosfatidilserina ou permeabilização da membrana plasmática (incorporação de IP) em nenhum dos tratamentos. A análise da integridade do DNA genômico dos parasitas tratados revelou que não houve nenhum tipo de degradação do material genético. Tais resultados indicam a ausência de eventos de morte celular por necrose ou apoptose.

Por meio de permeabilização dos parasitas e posterior marcação com IP e análise em citometria de fluxo é possível se correlacionar a quantidade de DNA por célula e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular no parasita. A análise dos parasitas tratados demonstrou que não houve a influência dos AIA na progressão do ciclo celular dos mesmos, não apresentando diferença do número de células em G1, S e G2 em relação ao controle. Tal resultado indica que os AIA não tem ação sobre nenhum mecanismo específico relacionado a síntese de DNA (ação sobre topoisomerase, DNA polimerase ou outras enzimas do replicossomo do parasita). Desta forma, a ação tripanostática dos AIA observada se deve provavelmente a sua influência em outras rotas metabólicas não ligadas diretamente a síntese de DNA.

Os resultados obtidos após o tratamento das formas epimastigotas do parasita com os AIA indicaram atividade tripanostática, com ausência de marcadores indicativos de morte celular e influência sobre a progressão do ciclo celular, além de diminuição geral da síntese proteica, demonstrando assim uma provável ação de tais substâncias sobre mecanismos do metabolismo do parasita.

São diversas as vias metabólicas fundamentais para o parasita e estudadas como promissores alvos de drogas. Dentre as mais importantes destacam-se as enzimas da via da glicólise, biossíntese de poliaminas, biossíntese de esteróis, metabolismo do Folato, biossíntese de microtúbulos, síntese de purinas, além de enzimas como a DNA topoisomerase, Óxido nítrico sintase, Arginase, Tripanotionaredutase, Cisteína protease, superóxido dismutase, entre outras (NYASSE *et al*, 2004; HEBY *et al*, 2007; ILLANA *et al*, 2006; LAMBIE *et al*, 1985; ARMSON *et al*, 1999; SLUNT *et al*, 1996; MACCARI *et al*, 2011; FREYMANN *et al*, 2000; CHAI *et al*, 2005; TURRENS, 2004). Dentre tais vias metabólicas podemos destacar a via de metabolismo dos Folatos, das Poliaminas e síntese de Purinas como pontos-chave na síntese de proteínas e/ou multiplicação celular (inibidas pelos AIA). A inibição de uma ou mais enzimas de tais rotas pode levar a uma diminuição da síntese proteica além de prejudicar o metabolismo e crescimento do parasita.

O metabolismo dos Folatos está intimamente ligado à síntese de DNA, RNA e proteínas em *T. cruzi* e uma das enzimas chaves na via metabólica é a enzima Di-hidrofolatoredutase, que cataliza a redução do ácido di-hidrofólico em ác. Tetra-hidrofólico, que por sua vez é fundamental na síntese de bases nitrogenadas e dos aminoácidos Serina e Metionina. A inibição desta enzima ou outras desta rota de biossíntese leva a redução ou inibição da síntese proteica e multiplicação do parasita (SOARES-BEZERRA, *et al*. 2004).

As poliaminas são de fundamental importância no balanço redox do parasita, além de serem importantes no processo de empacotamento do DNA durante o processo de multiplicação celular. Fármacos que atuam bloqueando sua biossíntese, ou até mesmo enzimas envolvidas na biossíntese de precursores (como a Arginase no ciclo da Uréia) podem acarretar na inibição de processos de multiplicação e diferenciação celular (FAIRMAMB, 1985; SHIMIZU, *et all*. 2002; SOARES-BEZERRA, *et al*. 2008).

Tripanosomatídeos são auxotróficos para purino-nucleotídeos e convertem bases de purinas em ribonucleotídeos através de uma única enzima (Hipopoxantina-Forforibosiltransferase-HGPRT), sendo totalmente dependentes dessa enzima para a recuperação das purinas durante seu ciclo de vida. Uma vez tal enzima inibida toda a biossíntese de nucleotídeos e proteínas se encontram prejudicadas, sendo um grande promissor como alvo de novas substâncias com alta seletividade contra *T. cruzi* (FREYMANN, *et al.* 2000).

Por fim, são inúmeros os relatos da influência de alcaloides sobre enzimas da cadeia respiratória em diversos modelos biológicos (SEPÚLVEDA-BOZA, 1995; SUZUKI, 1990; SHIMOMURA, 1998; BALLOT, 2010) levando a queda acentuada do metabolismo celular e consequente síntese proteica, o que explicaria a ação tripanostática dos AIA observada.

7. CONCLUSÃO

- Os extratos, frações e substâncias isoladas de *Pogonopus tubulosus* possuem atividade Tripanostática frente ao *T. cruzi*.
- Os isolados apresentaram valores de IC₅₀ frente as formas epimastigotas e amastigotas inferiores à da droga controle (Benznidazol) além de índices de seletividade moderados.
- O tratamento dos parasitas com os isolados reduziu drasticamente a expressão proteica, não ativou mecanismos de morte celular (ausência de permeabilização de membrana, exposição de fosfatidilserina ou degradação do DNA genômico) ou mesmo impediu a progressão do ciclo celular,
- A ação tripanostática foi observada em até 72 horas de tratamento, o que não exclui uma possível ação tripanocida, com queda nos valores de IC₅₀, em tratamentos mais prolongados. Além disso, a ausência de sinais de morte celular nos tratamentos com os AIA possibilita uma maior facilidade no estudo da biologia básica do parasita,

que é de suma importância para o aumento das chances e possibilidades no tratamento da doença.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. T. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 22, n. 3, p. 528–533, 2012.

ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J.B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A.O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 86, p. 624-626, 1992.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell. v. 61, p. 77-87, 1990.

ARMSON, A.; KAMAU, S. W.; GRIMM, F.; REYNOLIDON, J. A.; BEST, W. N.; MACDONALD, L. M.; THOMPSON, R. C. A. Sistemas enzimáticos de tripanosomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. Acta Trop. v. 73, p. 303, 1999.

BALLOT, C., KLUSA, J., LANCEL, S., MARTORIATI, A., HASSOUN, S.M., MORTIER, L., VIENE, J., BRIAND, G., FORMSTECHE, P., BAILLY, C., NEVIÈRE, R., MARCHETTI, P. Apoptosis, v. 15, p. 769-781, 2010.

BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. Planta Med. V. 65, n.6, p. 541, 1999.

BAUM, S.G.; WITTNER, M., NADLER, J.P.; HORWITZ, S.B., DENNIS, J.E.; SCHIFF, P.B.; TANOWITZ, H.B. Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. v.78, p.4571-5, 1981.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T. DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Substrato adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell. Biol. v. 106, p.1349-1358, 1988.

BORLAUG, N.E.; Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA, v. 1, p. 29-60. 2002.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. of Microbiology. v. 27, p. 347-82, 1973.

CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I.; MAKI, J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J. Ethnopharmacol. v. 62(3), p. 195-202, 1998.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origino of metacyclic trypanosomes in liquid media. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 6, p. 93-100, 1964.

CANÇADO, J.R. Criteria of Chagas disease cure. Mem, Inst, Oswaldo Cruz, v. 94 (Suppl 1), p. 331-335, 1999.

CARVALHO, T.M. & DE SOUZA, W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell Struct. Funct. v. 14, p. 383 – 392, 1989.

CASTRO, C.; PRATA, A.; MACÊDO, V. The influence of the parasitemia on de evolution of the chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop. v. 38(1) p. 1-6, 2005.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 1, p.159-218, 1909.

CHAI, Y.; YAN, S.; WONG, I. L. K.; CHOW, L. M. C.; SUN, H. J. Complexation of antimony [Sb(V)] with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphosphate-D-mannose: formation of both mono- and bis-adducts Inorg. Biochem. v. 99, p. 2257, 2005.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. Nature, 456, S4, 2010.

CONTRERAS, V.T. ARAUJO-JORGE, T.C. BONALDO, M.C. THOMAS, N. BARBOSA, H.S. MEIRELLES, M.N.L. GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 83, p. 123-33, 1988.

CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol. v. 16, p. 315-327, 1985.

CORREA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. Quimica Nova, v. 18 n. 5, 1995.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L.; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, n. 3, 2002

COURA, J. R. Presentsituationand new strategies for Chagas diseasechemotherapy – a proposal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 104, n. 4, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. V. 456, p.6-7, 2010.

DA SILVA JR, I; MORATO, C.I.; QUIXABEIRA, V.B.L.; PEREIRA, L.I.A.; DORTA, M.L.; DE OLIVEIRA, M.A.P.; HORTA, M.F.; RIBERIRO-DIAS, F. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. Bio Med Research Intern., v. 15, 2015.

DE BOER, H.J.; KOOL, A.; BROBERG, A.; MZIRA, Y.W.R.; HEDBERG, I.; LEVENFORS, J.J. Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *J. Ethnopharmacol.*, v. 96, p. 461-469, 2005.

DE CASTRO, S.L.; PINTO, M.C.; PINTO, A.V. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. 1. Establishing a structure/activity relationship. *Microbios.* v. 78, n. 315, p. 83-90, 1994.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, p. 269-285, 2002.

DIAS, J. C. P. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *ver Soc Bras Med Trop.* v. 39, p. 370-375, 2006.

DIAS, L. C.; Dessoy, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Quim. Nova.* v. 32, n. 2444, 2009.

DO CAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes – conserved from bactéria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* v. 3, p. 251-261, 2005.

DO CAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Acidocalcisome: A novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol. Today.* v. 15, p. 443-448, 1999.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S..An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingestes apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-betta, PGE2 and PAF. *J Clin Invest.* V. 101, p. 890-891, 1998.

FAIRMAMB, A.H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids Mol. Biochem. Parasit. V. 2, n. 187, 1985.

FIOCRUZ (2012) (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm/sid=26>. Acesso em: 05/08/2017.

FOURNET, A. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. Fitoterapia, v. 78, p. 382–384, 2007.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, v. 41, p. 19–37, 1994.

FRANÇOIS, G.; TIMPERMAN, G.; HOLENZ, J. Naphthylisoquinoline alkaloids exhibit strong growth-inhibiting activities against *Plasmodium falciparum* and *P. berghei* in vitro-structure-activity relationships of dioncophylline C. Ann. Trop. Med. Parasitol. V. 90, n. 2, p. 115-123, 1996.

FREYMANN, D.M., WENCK, M.A., ENGEL, J.C., FENG, J., FOCIA, P.J., EAKIN, A.E., CRAIG, S.P. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. Chem Biol v. 7, p. 957-968, 2000.

GITHIORI, J.B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. Vet. Parasitol. v. 139 (4), p. 308-20, 2006.

GRANADA, A.; NEMEM, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E.; O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: O exemplo da Camptotecina e seus derivados. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. V. 28, n.2, p. 129-139, 2007.

HEBY, O.; PERSSON, L.; RENTALA, M. Amino Acids. v. 33, n. 359, 2007.

HEISE, N.; RAPER, J.; BUXBAUM, L. U.; PERANOVICH, T. M.; ALMEIDA, M. L. Identification of complete precursors for the glycosylphosphatidylinositol protein anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* v. 271, n. 28, p. 16877-16887, 1996.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H.; Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. V. 2, p. 641-642, 2000.

ILLANA, V. O.; MONTFORT, R. P.; CALAHORRA, F. L. COSTAS, M.; ROMERO, A. R.; PUYOU, M. T. G. *Biochemistry- US*. V. 45, n. 2556, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). *Ecosistemas – Cerrado*. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/>. Acesso em 14/12/20017.

KIRCHHOFF, L.V. Chagas disease (Americam Trypanosomiasis): a tropical disease now emerging in the United States. *In: Emerging Infections 3*, Scheld, WM et al., (Eds), ASM Press. p. 111-134, 1999.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil*. v. 1, n. 1, 2005.

LAMBIE, D. G.; JOHNSON, R. H. *Drugs*. V. 30, n. 145, 1985.

LING, S.K.; LOMORITA, A.; TANAKA, T.; FUGIOKA, T.; MIHASHI, K.; KUONO, I. Irioids and anthraquinones from the Malaysian medicinal plant, *Saprosma schortechinii* (Rubiaceae). *Chem, Farm. Bull.* V. 50, p. 1035-1040, 2002.

LUCIANO, J.H.S.; LIMA, M.A.S.; SOUZA, E.B.; SIVEIRA, E.R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K Schum. *Biochem. System. Ecol.* V. 32, p. 1227-1229, 2004.

MACCARI, G.; JAEGER, TIMO; MORACA, F.; BIAVA, M.; FLOHE, L.; BOTTA, M. *BIORG. Med. Chem. Lett.* V. 21, p. 5255, 2011.

MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas' disease. *Inst Oswaldo Cruz*. V. 94, p. 311-316, 1999.

MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.; DE ALBUQUERQUE, S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* v. 73, p. 1-2, 2000.

MAHADY, G.B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Curr. Pharm. Des.* V. 11, p. 2405-2427, 2005.

MANTLE, D.; LENNARD, T.W.J.; PICKRING, A. A therapeutics applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse drugreact. Toxicol. Rev.* V. 9, n. 3, p. 223-240, 2000.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL. B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* V. 115(9), p. 1109-1123, 2007.

MARTINS-MELO, FR et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* v. 130, p. 167-174, 2014.

MEDINA, E., ACOSTA, G. M.B.P. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. V. 59, p. 327-330, 1993.

MELOS, J.L.R.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. *Rev. Virtual Quim.* V. 4 (4), p. 374-392, 2012.

MICHELS, P.A. & OPPERDOES, F.R. The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitol. Today.* v. 7, p. 150-109, 1991.

MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V.; BRINGAUD F. Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitology Today.* V. 16:11, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA SANEAMENTO BÁSICO / MINISTÉRIO DA SAÚDE. - 48 p.: il. - (Série C. Projetos, Programas e Relatórios; n. 57). Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. Plano de ação para prevenção e controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado- PPCERRADO. Brasília, DF, 2009.

MONTE NETO, R. L. et al. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea ducket* (Lauraceae) show antileishmanial activity. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 62, p. 348–352, 2007.

MORELLO, A.; PAVANI, M.; GARBARINO, J.A.; CHAMY, M.C.; FREY, C.; MANCILLA, J.; GUERRERO, A.; REPETTO, Y.; FERREIRA, J. Effects and mode of action of 1,4naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* V. 112(2):119-28, 1995.

MOURA, V.M.; SANTOS, D.P.; OLIVEIRA S.M.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A.; Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). *Quim. Nova.* v. 29, p. 452-455, 2006.

NEIRA, I.; POBLETE, L.; PORCILLE, P.; SILVA, P.; ARAYA, J.; BÓRQUEZ, J.; MORALES, G.; LOYOLA, L.A.; SAGUA, H. Activity of Dipernoids isolated from *Azorella compacta* (Llareta) on *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Bol. Chil. Parasitol.* V. 53(1-2), p. 9-13, 1998.

NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. *Pharmazie*, v. 59, n. 492, 2004.

OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* v. 80, p. 360-364, 1977.

PERDOMO, R.T. Avaliação da atividade antiproliferativa e da inibição das topoisomerasas por extratos, substâncias puras e semi-sintéticas obtidas de produtos naturais. 2011. 93 f. Tese (doutorado em saúde e desenvolvimento da região centro-oeste) – Universidade federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

PEREIRA, M.E.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E.M.; MING, M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. Infect. Immun. V. 64: 3884-92, 1996.

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

RAJÃO, M. A.; FURTADO, C.; ALVES, C. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; DE MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; KUNRATH-LIMA, M.; ZUMA, A. A.; VIEIRA-DA-ROCHA, J. P.; GARCIA, J. B. F.; MENDES, I. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G. R.; SOUZA-PINTO, N. C.; DE MEDEIROS, M. H. G.; CRUZ, A. K.; MOTTA, M. C. M.; TEIXEIRA, S. M. R.; MACHADO, C. R. Environ. Mol. Mut.v. 55, n. 309, 2014.

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

RASSI, A. Jr.; MARIN-NETO, J. A. Cardiopatia chagásica crônica. ver Soc Cardio Estado de São Paulo. v. 10 (4), p. 6-42, 2000.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A. MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin N Am. V. 26, p. 275-291, 2012.

REVELLI, S. Clinical and Experimental Immunology, v. 118, n. 271, 1999.

RODRIGUES, W. Análise dos determinantes de investimentos privados na produção de medicamentos fitoterápicos nos Cerrados brasileiros- o caso do estado do Tocantins. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Relatório Técnico. Palmas, 2010

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. Curr. Med. Chem., v. 13, p. 2571-2598, 2006.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, J. et al. Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species. Natural product communications, v. 6, n. 2, p. 231–234, 2011.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* V. 45:528-37, 2000.

SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; BRAVO, J.A.; CALLAPA, J.; MUÑOZ, V.; RUIZ, E.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus Tubulosus*. *Phytoterapy research.* V. 10, p. 198-201, 1996.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M.A.J.; HEISE, N.; CARDOSO-DE-ALMEIDA, M.L.; MORTARA, R.A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* p. 59, p. 293-304, 1993.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; ROJAS DE ARIAS, A.; FERREIRA, M.E.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits. *J. Pharm. Pharmacol.* V. 53(4), p. 563-7, 2001.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS - Brasil, 2011: Uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher. Disponível em www.saude.gov.br/svs (acessado em 10/09/2017).

SEPÚLVEDA-BOZA, S., CASSELS, B.K. Plants metabolits activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica.* v. 62, p. 98-105, 1996.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* V. 49, p. 117-143, 1995.

SHIMIZU, H.; PARK, S.Y.; SHIRO, Y.; ADACHI, S. *Acta Crystallogr. Sect.D.* v. 58, n. 81, 2002.

SHIMOMURA, Y., KAWADA, T., SUZUKI, M., Capsaicin and Its Analogs Inhibit the Activity of NADH-Coenzyme Q Oxidoreductase of the Mitochondrial Respiratory Chain. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 270, p. 573-577, 1998.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. of Natural Products.* V. 61(8), n.1053-71, 1998.

SLUNT, K. M.; GRACE, J. M.; MACDONALD, T. L.; PEARSON, R. D. Antimicrob. Agents Ch. V. 40, n. 706, 1996.

SOARES-BEZERRA, R. J.; DA SILVA, E. F.; ECHEVARRIA, A.; DA SILVA, L. G.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MONTEIRO, F. P.; LEON, L. L. GENESTRA, M. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. V. 23, n. 328, 2008.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M.B. J. Pharm. Sci. v. 40, n. 140, 2004.

SOLARI, A. J. Mitosis and genome partition in trypanosomes. Bio cell. v.19, p. 65-84, 1995.

SOSA ESTANI, S., SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.M.; YAMPOTIS, C. EFFICACY OF chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. V. 59, p. 526-529, 1998.

SUZUKI, K., MIZUNO, Y., YOSHIDA, M. Inhibition of Mitochondrial Respiration by 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-Like Endogenous Alkaloids in Mouse Brain. Neurochemical research, V. 15, p. 705-710, 1990.

TEPPER, A. D. Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. J. Cell, Biol. V. 150(1), p. 155-164. 2000.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic Protozoa. Mol. Aspects Med. V. 25, n. 211, 2004.

URBINA, J. A. _Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches Acta Trop. v. 115, n. 55, 2010.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. Cadernos de Saúde Pública. V. 16 (supl 2), p. 7-12, 2000.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. SHERMA, J. KOVALK, T. Thin layer chromatography in phytochemistry. Chromatography Science Series, CRC seri: Taylor Group, V. 9, 2008.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. V. 93 (9), p. 2325–2327, 1971.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. 2015, 6. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>.

WHO, Statistical information System Website. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>> acesso em: 18 de set. 2016.

WINK, M. Allelochemical properties and the raison d'être alkaloids. In: Cordell, G. editor. The alkaloids. V. 43, p. 1-118, 1993.

WINK, M. Interference of alkaloid in neuroreceptors and ion channels. In: Atta-Ur-Rahman editor. Studies in natural products chemistry. V. 21, p. 3-122, 2000.

WINK, M. SCHMELLER, T. LATZ-BRÜNING, B. Modes of action of allelochemical alkaloids: interactions of neuroreceptors, DNA and other molecular targets. Journal of chemical ecology. V. 24, p. 881-937, 1998.

WINK, M., SHIMMER, O., Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink, M. editor. Function of plant secondary metabolites and the exploitation in biotechnology. Annual plant reviews. V. 3, p. 17-133, 1999.

ZAHOOOR, A.; LAFLEUR, M.V.; KNIGHT, R.C.; LOMAN, H.; EDWARDS, D.I. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. Biochem. Pharmacol. V. 36, p. 3299-3304, 1987.

ZELEDON, R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. V. 94, p. 217-218, 1999.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 240-253, 2012.