



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLE KIAN

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ÓLEO DE COPAÍBA
E ÁCIDO CAURENÓICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi* E O EFEITO ANTIMICROBIANO
DA COMBINAÇÃO ENTRE OS PRODUTOS NATURAIS COM
BENZONIDAZOL**

DANIELLE KIAN

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ÓLEO DE COPAÍBA
E ÁCIDO CAURENÓICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS
POR *Trypanosoma cruzi* E O EFEITO ANTIMICROBIANO
DA COMBINAÇÃO ENTRE OS PRODUTOS NATURAIS COM
BENZONIDAZOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi
Yamauchi Lioni

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kian, Danielle.

Atividade imunomoduladora do óleo de copaíba e ácido caurenóico em macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi* e o efeito antimicrobiano da combinação entre os produtos naturais com benzonidazol / Danielle Kian. - Londrina, 2017.
103 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* - Tese. 2. Atividade imunomoduladora - Tese. 3. benzonidazol - Tese. I. Yamauchi, Lucy Megumi . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

DANIELLE KIAN

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DO ÓLEO DE COPAÍBA E ÁCIDO
CAURENÓICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Trypanosoma
cruzi* E O EFEITO ANTIMICROBIANO DA COMBINAÇÃO ENTRE OS
PRODUTOS NATURAIS COM BENZONIDAZOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi
Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Vera Lúcia Hideko Tatakihara
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de setembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela constante orientação, dedicação e ensinamentos durante todos esses anos. Agradeço imensamente pela oportunidade que proporcionou e pela confiança depositada.

À prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta pela ajuda e sugestões no trabalho.

Ao César Armando Contreras Lancheros e ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da UEM, pelos ensinamentos e ajuda fundamental nos experimentos realizados.

Aos professores Phileno Pinge-Filho, Wander Rogério Pavanelli e Ivete Conchon-Costa, pelo direcionamento, ideias e sugestões durante toda a realização do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Imunopatologia Experimental da UEL em especial a Maria Isabel Lovo, Sandra Cristina Heim Lonien e Aparecida Malvezi pela ajuda na manutenção das culturas de células e conhecimento compartilhado.

Aos integrantes do Laboratório de Imunoparasitologia Allan Henrique Depieri Cataneo, Milena Menegazzo Miranda e João Paulo Assolini, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos professores Nilton Arakagawa e Valdir Florêncio da Veiga Júnior pelo fornecimento do ácido caurenóico e do óleo de copaíba utilizados no trabalho.

A todos companheiros de laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial a Patrícia Pereira Morais Lopes, que mesmo com pouco tempo de convivência, já se tornou amiga. E aos professores Eliandro Reis Tavares e Alexandre Tadachi Morey, obrigada pela colaboração e amizade.

Aos professores, funcionários técnicos e administrativos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UEL, pela ajuda durante o processo de formação.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

À minha família e ao Marcos pelo constante incentivo e apoio. Vocês sempre estiveram presentes em todos os momentos, nunca me deixaram desistir e sempre acreditaram em mim. Também aos meus avôs queridos, que já não estão presentes, mas que com certeza estariam orgulhosos e felizes com esta minha conquista.

Enfim, sou grata a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Kian, D. **Atividade imunomoduladora do óleo de copaíba e ácido caurenóico em macrófagos infectados por *Trypanosoma cruzi* e o efeito antimicrobiano da combinação entre os produtos naturais com benzonidazol.** 2017. 102 f. Tese. (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical negligenciada que ainda apresenta limitações quanto ao tratamento, como o aparecimento de efeitos colaterais graves e eficácia variável. Na busca por terapias alternativas, a utilização de produtos naturais e estratégias como a combinação de fármacos representam alternativas para introdução de novos medicamentos para essa doença. O trabalho teve como objetivo avaliar o óleo de copaíba e o ácido caurenóico quanto a sua atividade tripanocida e imunomoduladora em macrófagos infectados por *T. cruzi*, além de analisar o efeito combinatório destes produtos naturais com o benzonidazol. Ambos os compostos foram capazes de eliminar o parasito, promovendo diminuição significativa da taxa de infecção e proliferação das formas amastigotas de maneira dose dependente. A eliminação destas formas intracelulares ocorreu por mecanismos independentes da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e das vias relacionadas ao metabolismo do ferro e defesa antioxidante. Apesar dos testes mostrarem que o óleo de copaíba e o ácido caurenóico modulam a resposta imune em macrófagos, o efeito tripanocida pode estar ocorrendo devido à ação direta destes compostos sobre o parasito, uma vez que os tratamentos exibiram um perfil anti-inflamatório. Quando os compostos foram associados ao benzonidazol observou-se efeito sinérgico contra todas as formas de *T. cruzi* para o óleo de copaíba e para o ácido caurenóico apenas para as formas epimastigotas e amastigotas. Em tripomastigotas o efeito da associação foi aditivo. As concentrações utilizadas nos testes mostraram efeito antagônico para células LLCMK₂, não indicando, portanto, toxicidade. Além disso, os tratamentos com os compostos sozinhos ou em combinação com benzonidazol levaram a diversas alterações funcionais e estruturais nas formas epimastigotas, como aumento na produção de espécies reativas, formação de estruturas membranosas e vacuolização no interior das células, peroxidação lipídica entre outras características indicativas de processo autofágico. Portanto, nossos resultados mostram que óleo de copaíba e o ácido caurenóico são capazes de eliminar *T. cruzi*, modular a resposta imune e diminuir a concentração de benzonidazol necessária para causar a morte do parasito, o que poderia diminuir a toxicidade deste medicamento, sendo então, uma alternativa promissora no tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Óleo de copaíba. Ácido caurenóico. Benzonidazol. Imunomodulação. Combinação de fármacos.

Kian, D. **Immunomodulatory activity of copaiba oil and kaurenoic acid in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and the antimicrobial effect of the combination of natural products with benznidazole.** 2017. 102 p. Tese (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected tropical disease that still has treatment limitations, such as the appearance of serious side effects and variable efficacy. In search for alternative therapies, the use of natural products and strategies such as drug combinations represent alternatives for introduction of new drugs for this disease. The study aimed to evaluate the copaiba oil and Kaurenoic acid as its trypanocidal and immunomodulatory activity in macrophages infected with *T. cruzi*, as well as analyzing the combinatorial effect of these natural products with benznidazole. Both compounds were able to eliminate the parasite, promoting a significant reduction in the rate of infection and proliferation of the amastigote forms in a dose dependent manner. The elimination these forms intracellular occurred by independent mechanisms of production of reactive oxygen species and nitrogen and pathways related to iron metabolism and antioxidant defense. Although tests showed that both copaiba oil and kaurenoic acid modulate the immune response in macrophages, the trypanocidal effect may be occurring due to the direct action of compounds on parasite, since treatments exhibited an anti-inflammatory profile. When compounds were associated with benznidazole a synergistic effect was observed against all forms of *T. cruzi* for copaiba oil and for kaurenoic acid, only for the epimastigote and amastigote forms. In trypomastigotes association effect was additive. The concentrations used in tests showed an antagonistic effect for LLCMK₂ cells, thus not indicating toxicity for these cells. In addition, treatments with compounds alone or in combination with benznidazole led to several functional and structural changes in epimastigote forms, such as increased production of reactive species, formation of membranous structures and vacuolization in the cells, lipid peroxidation among other indicative characteristics of autophagic process. Therefore, our results show that copaiba oil and kaurenoic acid are able to eliminate *T. cruzi*, modulate the immune response and decrease the concentration of benznidazole necessary to cause death of parasite, which could decrease the toxicity of this drug, and so, a promising alternative in the treatment of Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Copaiba oil. Kaurenoic acid. Benznidazole. Immunomodulation. Drug combination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1.	Ciclo de vida e as diferentes formas de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 2.	Representação esquemática das principais estruturas e organelas encontradas nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	18
Artigo 1.	Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery	
Figura 1	Copaiba oil and kaurenoic acid impairs <i>T. cruzi</i> internalization by peritoneal macrophages and HeLa cells.....	71
Figura 2	Effect of copaiba oil and kaurenoic acid upon trypomastigote release in treated <i>T. cruzi</i> -infected macrophages.....	72
Figura 3	The effects of copaiba oil and kaurenoic acid in IL-12, IL-10, TGF- β and TNF- α expression levels	73
Figura 4	Effects of copaiba oil and kaurenoic acid upon nitrite production and iNOS expression levels in <i>T. cruzi</i> -infected peritoneal macrophages.....	74
Figura 5	The effects of copaiba oil and kaurenoic acid in ROS production	75
Figura 6	The effects of copaiba oil and kaurenoic acid in HO-1, Ferritin and Nrf-2 expression levels	76
Figura 7	Scheme showing the effect of copaiba oil and kaurenoic acid treatment on <i>T. cruzi</i> -infected macrophages immunodulation and parasite elimination mechanisms.....	77
Artigo 2.	Copaiba oil and kaurenoic acid associated with benzonidazole eliminate <i>Trypanosoma cruzi</i> by autophagy-like mechanisms	
Tabela 1	Combination profile of copaiba oil and kaurenoic acid with benzonidazole for <i>T. cruzi</i> and mammalian cells	99
Figura 1	Ultrastructural alterations in <i>T. cruzi</i> epimastigotes treated with copaiba oil, kaurenoic acid and their combination with benzonidazole	100
Figura 2	Fluorimetric determination of the mechanisms of action of the copaiba oil and kaurenoic acid alone or in combination with benzonidazole	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
cDNA	DNA complementar
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DMSO	Dimetilsulfóxido
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HO-1	Heme oxigenase 1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
mL	Mililitro
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
Nrf-2	Fator nuclear eritróide 2
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
O^{-2}	Superóxido
PAMPs	Padrão de sequencias moleculares associados ao patógeno
PBS	Tampão salina-fosfato
pH	Potencial de Hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator transformador do crescimento β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TLRs	Receptores do tipo Toll

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1	DOENÇA DE CHAGAS E <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2	RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS	19
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO	23
1.4	QUIMIOTERAPIA	25
1.5	ÓLEO DE COPAÍBA E ÁCIDO CAURENÓICO	29
2	OBJETIVOS	33
3	REFERÊNCIAS	34
	ANEXO 1 – Artigo 1 – “Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery”	52
	ANEXO 2 – Artigo 2 – “Copaiba oil and kaurenoic acid associated with benzonidazole eliminate <i>Trypanosoma cruzi</i> by autophagy-like mechanisms”	79
4	CONCLUSÃO	102

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 DOENÇA DE CHAGAS E *Trypanosoma cruzi*

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1,4 bilhões de pessoas em todo mundo, principalmente populações pobres, que vivem em áreas rurais, favelas urbanas ou zonas de conflito, devido a péssimas condições sanitárias e de moradia (PINHEIRO et al., 2017). Não apresentam prioridade de saúde pública tanto em nível nacional como internacional, além de despertarem pouca atenção pelas indústrias farmacêuticas (WHO, 2015). Dentre estas doenças, as que são causadas por protozoários, destacam-se aquelas que têm como agentes etiológicos membros da família Trypanosomatidae, como espécies dos gêneros *Trypanosoma* que causam a doença de Chagas e a doença do sono (HOUWELING et al., 2016).

Conhecida também como Tripanossomíase americana, a Doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina, infectando aproximadamente 6 milhões de pessoas, sendo que 70 milhões estão vivendo em áreas com alto risco de transmissão da doença (WHO, 2015).

No Brasil, estudos realizados em 2014 estimaram a prevalência da doença em 1,0-2,4% (1,9-4,6 milhões de pessoas), afetando principalmente mulheres, indivíduos acima de 60 anos e residentes das regiões nordeste e sudeste do país. No período de 2000-2013, 1.570 casos agudos da doença foram relatados, uma média de 112 casos por ano, sendo que a maioria se concentrou no estado do Pará (75%) (DIAS et al., 2016).

Nas últimas décadas, muitos fatores contribuíram para uma mudança no perfil epidemiológico da doença, como a implementação de diferentes iniciativas para seu controle na América Latina, urbanização e aumento das viagens internacionais e da migração, elevando o número de casos detectados em países não endêmicos da América do Norte e Europa (SCHMUNIS, YADON, 2010; REQUENA-MENDÉZ et al., 2015).

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta duas fases bastante distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda dura poucas semanas, apresenta alta parasitemia e em alguns casos pode ocorrer linfadenomegalia localizada na região da picada como o sinal de Romaña ou chagoma de

inoculação (BERN et al., 2011). No entanto, a doença dificilmente é detectada nesta etapa inicial, por ser, muitas vezes assintomática ou apresentar sintomas inespecíficos como febre, mal-estar e linfocitose, semelhante à de outras patologias. Nesta fase, o sistema imune do hospedeiro pode controlar a replicação do parasito, cessando os sintomas geralmente em torno de 4 a 8 semanas (DUTRA, GOLLOB, 2008; ANDRADE et al., 2014).

O diagnóstico laboratorial nesta fase inicial da doença é baseado em critérios parasitológicos e sorológicos, a partir da detecção direta dos parasitos no sangue, além de sorologia para anticorpos da classe IgM e IgG (MACHADO et al., 2012).

Após o término da fase aguda, aproximadamente 30-40% dos indivíduos infectados evoluem para a forma crônica da doença, caracterizada pela baixa incidência de parasitos circulantes na corrente sanguínea (MACEDO et al., 2002). A maioria dos indivíduos que entram nesta fase permanece na forma clínica indeterminada e assintomática, que representa um estado de equilíbrio entre parasito e hospedeiro. No entanto, em alguns casos o quadro pode manifestar comprometimento cardíaco e/ou digestivo e em menor proporção do sistema nervoso, com reativação intensa do processo inflamatório (BERN, 2015).

Na forma cardíaca ocorre principalmente miocardite crônica e hipertrofia do coração, enquanto na forma digestiva são observadas alterações hipertróficas no esôfago e colón intestinal. Já a forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (RASSI et al., 2010).

Nesta fase da doença, devido à baixa parasitemia e altos títulos de imunoglobulinas específicas, é indicado o diagnóstico por testes sorológicos como a hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e o método imunoenzimático (ELISA) (GOMES et al., 2009; BALOUZ et al., 2017).

A doença de Chagas é transmitida por insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros. Estes pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, e as principais espécies com capacidade de transmissão da doença e de importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma braziliensis* (ARGOLO et al., 2008). Nos países como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile,

Paraguai e Uruguai, *T. infestans* foi o mais associado a endemia chagásica (DIAS et al., 2011).

No Brasil, a transmissão vetorial foi substancialmente reduzida frente aos avanços utilizados no controle de vigilância epidemiológica. A partir de 1940 autoridades do país estabeleceram o primeiro programa de controle da doença de Chagas, mas apenas em 1975 o programa foi estruturado em nível nacional, com foco na eliminação do principal vetor, *T. infestans*, através da pulverização regular de inseticidas (CORASSA et al., 2016). Finalmente, em 2006, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) certificou a interrupção da transmissão da doença através desta espécie no Brasil (FERREIRA, SILVA, 2006). Embora grandes progressos tenham sido alcançados através desse programa, não houve acompanhamento adequado por ações de vigilância. Como resultado, as áreas anteriormente consideradas livres de vetores estão agora sendo repovoadas com vetores infectados, levando a casos recentes da infecção (ANDRADE et al., 2014). Além disso, o fato de existirem mais de 140 espécies de vetores espalhadas pelas Américas, torna a erradicação por este método praticamente impossível (COURA, 2013).

A doença também pode ser transmitida por outras formas que incluem transplante e transfusão sanguínea, nos quais não é realizado triagem específica; congênita, acidental e oral (RASSI et al., 2012).

Como a maioria dos pacientes com doença de Chagas é assintomática e desconhece sua condição, em caso de doação de sangue, eles podem inadvertidamente representar uma séria ameaça à segurança do suprimento de sangue em países não endêmicas como Austrália, Canadá, Espanha e Estados Unidos (ANGHEBEN et al., 2015). Nestes lugares, a incidência da transmissão vetorial é reduzida, no entanto, a probabilidade de infecção por esta via é considerada a mais comum (COURA, 2015).

A transmissão congênita ocorre principalmente por via transplacentária, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, podendo ocorrer em qualquer período da gestação. Além disso, pode ocorrer no canal do parto, através do contato de mucosas do feto com o sangue da mãe contaminado por *T. cruzi* (RENDELL et al, 2015). Nos países não endêmicos também foram registrados casos de transmissão congênita, como consequência da migração de gestantes infectadas da América Latina (HOWARD et al., 2014; CARLIER et

al., 2015), onde esta forma de transmissão ocorre em 4-12% dos casos e a taxa de transmissão a partir de mulheres infectadas cronicamente é estimada em 5% (HOWARD et al., 2014).

Acidentalmente, a transmissão também pode ocorrer pelo contato do parasito com alguma lesão na pele, mucosa ou por auto inoculação, principalmente em profissionais de laboratório que manipulam o parasito no sangue de animais, fezes de triatomíneos, material de pacientes ou vetores infectados (DIAS, 2011).

Nos últimos anos, a transmissão oral tem sido bastante discutida, surtos já foram descritos no Brasil, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Argentina e Equador (SILVA DOS SANTOS et al., 2017). Os casos notificados envolveram ingestão de alimentos ou bebidas, como carne, leite, suco de cana ou açaí contendo fezes do triatomíneo ou o próprio inseto infectado por *T. cruzi*. No Brasil, entre 2000 e 2011, 1252 casos de doença de Chagas aguda foram relatados, sendo que 70% foram atribuídos a transmissão oral, o que enfatiza a importância desta rota de transmissão em humanos (DOMINGUES et al., 2015).

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*. Apresenta algumas características peculiares como a presença de uma única mitocôndria, cujo material genético se concentra em uma porção específica da organela, o cinetoplasto, específico dos membros desta ordem (RODRIGUEZ et al. 2014).

O ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre dois hospedeiros, um invertebrado (triatomíneo) e um vertebrado (mamífero), nos quais são encontradas as diferentes formas do parasito. Os epimastigotas proliferam no intestino médio do inseto vetor e se diferenciam na forma infectante tripomastigota metacíclico. O triatomíneo infectado, após o repasto sanguíneo, defeca ou urina sob a pele do hospedeiro, liberando nestas excreções formas tripomastigotas. Os parasitos podem penetrar através das membranas mucosas ou lesões cutâneas podendo infectar qualquer célula nucleada ou ser internalizado passivamente por fagócitos. Este processo envolve o reconhecimento de uma grande variedade de moléculas presentes nas células do parasito e do hospedeiro, dando início ao ciclo intracelular de *T. cruzi*. Os tripomastigotas ficam contidos em uma estrutura conhecida como vacúolo

parasitóforo, onde gradualmente se diferenciam nas formas amastigotas. Esse processo ocorre paralelamente à lise da membrana deste vacúolo por enzimas secretadas pelo parasito, possibilitando então, que as amastigotas, em contato direto com o citoplasma, iniciem seu processo de divisão binária. Após alguns ciclos de divisão, se diferenciam novamente em tripomastigotas que são liberadas após a ruptura da célula hospedeira. Os parasitos podem invadir outras células ou alcançar a corrente sanguínea, podendo ser ingeridas pelo inseto vetor iniciando um novo ciclo (KOLLIEN, SCHAUB, 2000; RASSI et al., 2010).

As formas do parasito apresentam características morfológicas distintas, que são utilizadas para sua identificação. Epimastigotas possuem forma alongada com flagelo emergindo da porção anterior do parasito, núcleo esférico e cinetoplasto em forma de bastão, próximo à saída do flagelo. Tripomastigotas também possuem um formato alongado e fusiforme, com núcleo na região central e cinetoplasto localizado posteriormente a ele. Próximo ao cinetoplasto, emerge o flagelo que se adere ao longo do corpo celular e é dotado de grande mobilidade. Já as formas amastigotas, intracelulares, são arredondadas com núcleo esférico na região central, cinetoplasto em forma de bastão e flagelo curto interiorizado (TEIXEIRA et al., 2012).

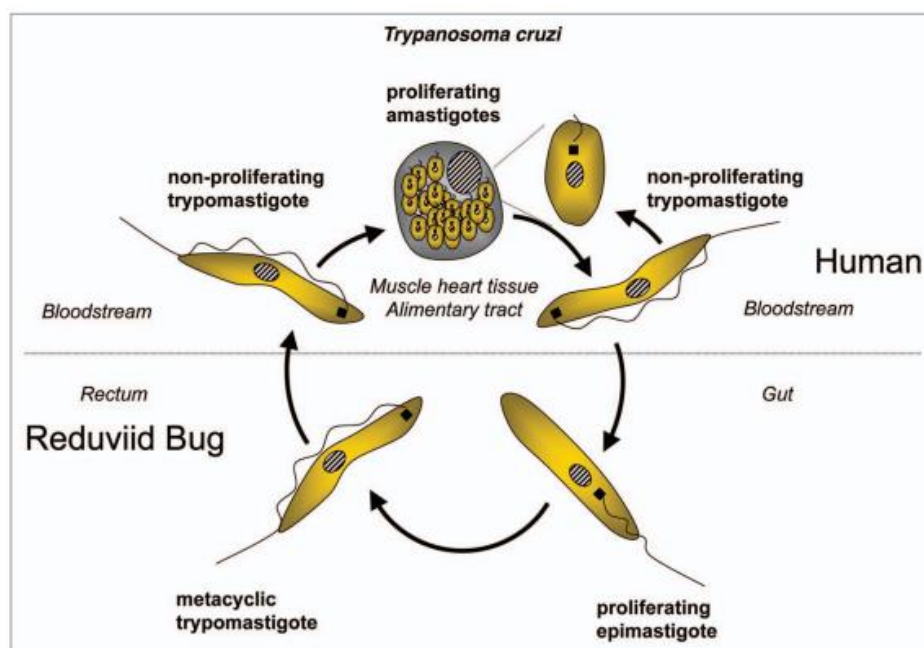


Figura 1. Ciclo de vida e as diferentes formas de *T. cruzi* (DUSZENKO et al., 2011).

Com o aprimoramento da microscopia eletrônica, estas e outras organelas dos tripanossomatídeos puderam ser melhor analisadas. O cinetoplasto contendo o kDNA foi identificado como uma estrutura escura, elétron densa e em formato lamelar, presente na mitocôndria única, que se mostra altamente ramificada e percorre todo o corpo do parasito (DE SOUZA, 2008).

Dentre outras estruturas peculiares de *T. cruzi* estão os acidocalcisomas, encontrados nas três formas de vida e responsáveis pelo estoque intracelular de cálcio e outros íons (SCOTT, DOCAMPO, 2000). São organelas ácidas, geralmente arredondadas e de aproximadamente 200 nm. Já os reservossomos são encontrados apenas em epimastigotas como estruturas desprovidas de membranas internas e contendo inclusões lipídicas. São descritos como sítios de acúmulo de proteínas endocitadas e estão localizadas na parte posterior do corpo do parasito (DE SOUZA, 2002).

Já a organização estrutural do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático são semelhantes à descrita em outras células eucarióticas. O Golgi se apresenta como estrias paralelas localizadas entre o cinetoplasto e o núcleo, próximo à região da qual emerge o flagelo, enquanto o retículo endoplasmático pode ser encontrado em contato com o núcleo, a mitocôndria ou na região periférica da célula (ENGSTLER et al., 2007).

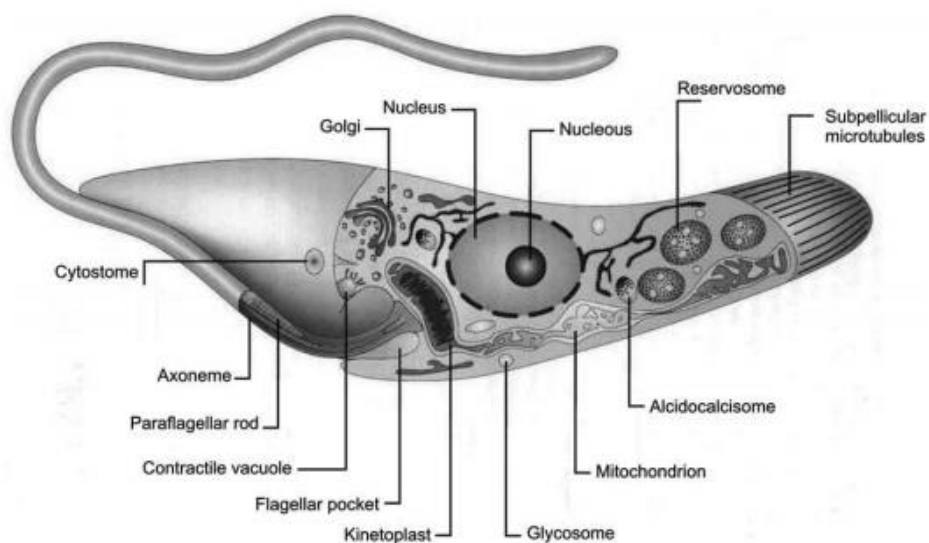


Figura 2. Representação esquemática das principais estruturas e organelas encontradas nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (DE SOUZA, 2008).

1.2 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se a resposta imune do hospedeiro contra o parasito. Portanto, em cada fase da infecção existe uma resposta específica com a participação de células e moléculas sinalizadoras objetivando a eliminação do parasito. Foi proposto que a forte estimulação imune e o processo inflamatório intenso durante a infecção precoce por *T. cruzi* podem não só ser determinantes na patologia associada a fase tardia da doença, mas também cruciais no confinamento do agente etiológico a um determinado sítio intracelular, limitando a infecção e evitando danos aos tecidos (SATHLER-AVELAR et al., 2009; PINHO et al., 2014).

No início da infecção, são observados eventos referentes a imunidade inata, na qual células dendríticas, macrófagos e células *Natural Killer* (NK), parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. (TARLETON, 2007; GEIGER et al., 2016). Estas células possuem uma classe de receptores (PRRs) em sua superfície capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs), que incluem ácidos nucleicos, lipoproteínas, glicoproteínas e outras componentes de membrana, sendo moléculas essenciais e conservadas nos microrganismos e que são ausentes no hospedeiro (RODRIGUES et al., 2012). Dentre os PAMPs identificados em protozoários estão as moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) ligadas à glicoproteínas distribuídas na superfície do parasito (KURUP, TARLETON, 2013).

Dentre os diversos PRRs, os mais estudados são proteínas transmembrana denominadas receptores do tipo Toll (TLRs) (KURUP, TARLETON, 2013). Após o reconhecimento pelos TLRs inicia-se uma cascata de ativação de fatores de transcrição, seguido pela produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que, por sua vez, levam ao recrutamento de células fagocíticas para o tecido infectado, que são importantes não apenas para o controle inicial da infecção, mas também para moldar a resposta imune adaptativa subsequente (JUNQUEIRA et al., 2010; TAKEUCHI, AKIRA, 2010).

Na fase aguda da doença de Chagas ocorre a ativação da imunidade inata estimulada por antígenos de *T. cruzi* através dos receptores TLRs, tais como 4 e 9, em macrófagos e células dendríticas, promovendo uma intensa secreção de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BAFICA, et al., 2006).

A ativação dos TLRs utiliza principalmente a via de transdução de sinal que consiste no recrutamento de várias proteínas intracelulares como MyD88, IRAK e TRAF-6, e quinases que regulam sinal extracelular (ERK) e da cascata MAP quinase (MAPK), envolvidas na ativação dos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1) e NF- κ B (fator nuclear κ B) (KAWAI, AKIRA, 2007). Estes eventos favorecem a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. Portanto, a ativação de TLRs por moléculas de *T. cruzi* pode ativar a via de NF- κ B e MAPK, induzindo a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-12 e TNF- α , que posteriormente induzirão a síntese de IFN- γ (GAZZINELLI, DENKERS, 2006).

Macrófagos podem ter papéis distintos na infecção por *T. cruzi*, dependendo do estado de ativação no momento da interação com o parasito, podendo servir como célula hospedeira ou como efetora da resposta imune. Em termos gerais, dois principais estados de polarização são definidos: macrófago de ativação clássica/inflamatória (M1) e alternativa/regenerativa (M2) (GORDON, MARTINEZ, 2010; MILLS, 2012).

Macrófagos M1 são induzidos por patógenos intracelulares e citocinas como IFN- γ , sendo, portanto, associado ao início e manutenção da inflamação, enquanto em M2 há participação de citocinas imunossupressoras, facilitando a resolução da doença ou uma infecção crônica (SICA, MANTOVANI 2012). Além disso, macrófagos M2 são divididos em pelo menos três subconjuntos: M2a, induzidos por IL-4 ou IL-13; M2b, induzidos por complexos imunes e agonistas de TLRs ou receptores de IL-1; e M2c, induzidos por IL-10, TGF- β e glicocorticoides (ZANLUQUI et al., 2015).

Desta forma, nos primeiros estágios da infecção, *T. cruzi* induz uma extensa resposta inflamatória, no qual macrófagos são ativados por uma cascata de citocinas: inicialmente produzem IL-12, que atua sobre células NK induzindo a produção de IFN- γ . Esta por sua vez, aumenta a produção de IL-

12, TNF- α e óxido nítrico (NO) em macrófagos, contribuindo para a morte do parasita (PISSETTI et al., 2011).

IFN- γ é a citocina mais associada à resistência do hospedeiro durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*, conferindo efeito protetor para o hospedeiro, por limitar a replicação do parasito e induzir a ativação de macrófagos, enquanto sua neutralização resulta em maior susceptibilidade à doença (SILVA et al., 1998; CARDILLO et al., 1996).

Como mencionado, a produção de IL-12 pelo macrófago infectado estimula células NK a produzirem IFN- γ , atuando reciprocamente sobre estas células e contribuindo para a eliminação do parasita (SILVA et al., 1998; GUILMOT et al., 2013), o que pôde ser visto por SILVA et al. (1998), no qual a administração desta citocina a ratos infectados por *T. cruzi* levava a redução da parasitemia e prolongava a sobrevivência dos animais em comparação ao grupo controle não tratado.

ALIBERTI et al. (1996) estudaram a capacidade de *T. cruzi* em induzir a síntese de IL-12 em macrófagos e o papel desta citocina na fase aguda de infecção experimental. Os resultados mostraram que as células na presença dos parasitos produziam esta citocina e que camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-12 tiveram aumento significativo da parasitemia e mortalidade, em comparação ao grupo controle. Os autores, portanto, reforçam que IL-12 esteja induzindo a síntese de IFN- γ em células NK, o que leva a ativação dos macrófagos.

A resposta inflamatória causada por *T. cruzi* é balanceada por eventos anti-inflamatórios, levando ao ambiente de polarização M2 desencadeado principalmente por IL-4, IL-10 e TGF- β . Estas citocinas são necessárias para prevenir o aumento do processo inflamatório e dano tecidual, tendo, portanto, papel modulador da ativação da resposta imune. Elas inibem a produção de NO e a atividade tripanocida de macrófagos infectados e ativados por TNF e IFN γ (COUPER et al., 2008).

Estudo realizado por WAGHABI et al. (2009) utilizando um inibidor da via de sinalização do TGF- β (SB431542) mostrou que camundongos infectados por *T. cruzi* e tratados na fase aguda com este inibidor apresentaram maior sobrevivência, menor parasitemia e menor lesão cardíaca. Já outros trabalhos envolvendo a inibição da IL-10 por anticorpo monoclonal anti-IL-10 mostraram

aumento da produção de IFN- γ induzida por *T. cruzi in vitro* (CARDILLO et al., 1996) e *in vivo* (REED et al., 1994), sugerindo que esta citocina pode ser um potente inibidor de IFN- γ durante a infecção e que a resistência inicial ao parasito pode ser mediada pelo padrão de IFN- γ /IL-10 produzido.

Desta forma, a fase assintomática e indeterminada da doença de Chagas tem sido associada à produção predominante destas citocinas reguladoras sobre as citocinas inflamatórias (SOUZA et al., 2007). Assim, é possível que a capacidade de produzir IL-10 mais tardiamente na fase aguda seja importante para controlar a resposta e permitir a cronificação da doença (ANDRADE et al., 2014).

A interação do sistema complemento com *T. cruzi* também ocorre na resposta imune imediata do hospedeiro, no entanto, é importante considerar que essa interação é dependente das formas evolutivas. O complemento pode ser ativado por amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas, mas apenas estas últimas são suscetíveis à lise por esta via (LIDANI et al. 2017). As formas tripomastigotas, por exemplo, expressam moléculas em sua superfície como T-DAF e Gp160 que interferem na ação da C3 convertase, uma enzima central na cascata do complemento, determinando uma forma de evasão do sistema imune (NARDY et al., 2015; CARDOSO et al., 2016).

A resposta imune adaptativa na doença de Chagas conta com a ativação de células B levando a produção de níveis substanciais de anticorpos e ativação de linfócitos T, essenciais para a redução da parasitemia na fase aguda e controle da infecção da fase crônica (TARLETON, 2007).

Após duas semanas de infecção, são detectadas altas quantidades de IgM e IgG no soro de pacientes na fase aguda da doença de Chagas, o que é utilizado como parâmetro sorológico. Esta resposta humoral constitui uma importante forma de controle da doença, uma vez que foi observado que a depleção de linfócitos B levava a um aumento na parasitemia (KUMAR, TARLETON, 1998).

Linfócitos T CD4⁺ auxiliam nos mecanismos efetores em macrófagos e na ativação de linfócitos TCD8⁺ (MARTIN et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2011). Com o reconhecimento do antígeno, células T CD4⁺ se diferenciam em subpopulações Th1 ou Th2, conforme o padrão de citocina produzido. O mecanismo de diferenciação do padrão Th1 é induzido principalmente por IL-12

e IFN- γ e ocorrem em resposta aos microrganismos que ativam as células dendríticas, macrófagos e células NK, sendo responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto as células Th2 estão envolvidas na resposta controlada por anticorpos (CARDILLO et al., 2007).

Linfócitos TCD8⁺ são importantes na redução da carga parasitária observada em tecidos infectados por *T. cruzi*, agindo de modo citotóxico em células contendo formas amastigotas (BASSO, 2013). Estes linfócitos também produzem IFN- γ , que por sua vez promove mecanismos efetores em macrófagos para eliminação dos parasitos (JUNQUEIRA et al., 2010).

Estudos apontaram para a participação dos linfócitos T CD8⁺ na imunoproteção contra *T. cruzi*, nos quais, camundongos desprovidos de linfócitos T por timectomia neonatal ou geneticamente modificados mostram que ambas as populações, CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais para o controle da parasitemia e sobrevivência dos animais nas fases aguda e crônica da infecção (TARLETON et al., 1994; COTTA DE ALMEIDA et al., 1997).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ânion hidroxila) são moléculas instáveis que contém um ou mais elétrons desemparelhados e são produzidos como intermediários de muitos processos fisiológicos (PHANIENDRA et al., 2015).

T. cruzi, como parasito intracelular, deve sobreviver aos próprios metabolitos produzidos como subprodutos de seu metabolismo aeróbico e também lidar com o estímulo oxidativo do sistema imune do hospedeiro, o que inclui a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (MACHADO-SILVA et al., 2016). Durante a fagocitose pelos macrófagos, o meio oxidativo é formado pela ativação da enzima NADPH oxidase, que produz $O_2^{\cdot-}$, convertido dentro do fagossomo em efetores tóxicos como H_2O_2 e posteriormente OH^{\cdot} . Estas espécies oxidantes podem provocar danos ao DNA, oxidação de proteínas, além de peroxidação lipídica, interferindo na integridade de membrana (FIGUEIRA et al., 2013).

O papel da invasão e do processo inflamatório na produção de ROS foi analisado por GUPTA et al. (2009) em cardiomiócitos de camundongos

infectados por *T. cruzi*. Neste caso, houve aumento na produção destas espécies reativas, que pôde ser potencializado por citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Além disso, o potencial de membrana foi alterado, o que resultou na ineficiência da cadeia de transportadora de elétrons.

Outro radical livre altamente reativo é o NO, sintetizado endogenamente e envolvido em muitos processos biológicos como vasodilatação, inibição de agregação de plaquetas, reparação de tecidos, neurotransmissão entre outras (GHIMIRE et al., 2017). Desempenha sua função também no sistema imune, no qual é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras, sendo essenciais para a proteção contra patógenos intracelulares como vírus, fungos e protozoários (GUTIERREZ et al., 2009).

NO é formado pela ação de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) a partir da L-arginina tendo como subproduto a L-citrulina. Existem três isoformas de NOS, que diferem com respeito a sua regulação, distribuição tecidual e propriedades físicas e funcionais, podendo ser agrupadas em óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase neural (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (NAHREVANIAN, 2009).

A nNOS e eNOS são encontradas no sistema nervoso central e endotélio vascular, respectivamente, são vias constitutivas dependentes de Ca⁺² e produzem baixas quantidades de NO. Já iNOS é independente de Ca⁺² intracelular e quando induzida, libera quantidades maiores da molécula (FORSTERMANN, SESSA, 2012).

A indução da síntese de NO por macrófagos é crucial para o desenvolvimento da imunidade contra *T. cruzi*. Seu efeito protetor tem sido evidenciado por se combinar com H₂O₂ ou O²⁻ e produzir peroxinitrito (ONOO⁻). Esta molécula oxidante e citotóxica é altamente efetiva contra o parasito, podendo danificar as células por peroxidação lipídica, conseqüentemente prejudicando a integridade de membrana ou levando a apoptose pela alteração da função mitocondrial (ALVAREZ et al., 2011; RADI, 2013). Além disso, pode modificar quimicamente determinadas proteínas, incluindo a família de cisteína-proteases, como a cruzipáina, essencial no metabolismo deste protozoário (VENTURINI et al., 2000).

Os tripanossomas estão bem equipados para lidar com oxidantes endógenos e produzidos exogenamente. Este fato é refletido por uma rede

antioxidante eficiente, formada por uma série de enzimas e moléculas reativas não enzimáticas que ocupam um papel fundamental na desintoxicação de ROS e RNS produzidas durante as interações entre parasitas e células hospedeiras (PIACENZA et al., 2009).

A enzima superóxido dismutase (SOD) protege o parasito do O_2^- gerados por ele ou derivado dos fagócitos, catalisando a conversão desta molécula em oxigênio e água. Em *T. cruzi*, a enzima é dependente de ferro e se apresenta em quatro isoformas, que detoxificam o superóxido gerado no citosol (SODB1), glicossomos (SODB1-2) e mitocôndrias (SODA e C). Já na detoxificação do H_2O_2 , os tripanosomatídeos utilizam um sistema antioxidante dependente de “tiol”, com a participação da tripanotiona. Até o momento, foram identificadas cinco peroxidases dependente de tripanotiona em tripanossomatídeos: duas triparedoxina peroxidase, duas glutaciona peroxidase e uma peroxidase dependente de ascorbato (WILKINSON et al., 2000; MACHADO-SILVA et al., 2016).

1.4 QUIMIOTERAPIA

Os dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são nifurtimox e benzonidazol, sendo que no Brasil é utilizado apenas este último (SALOMON, 2012). Estes nitrocompostos exercem sua atividade biológica através da produção de compostos que o sistema de detoxificação do parasito não consegue eliminar (WILKINSON, KELLY, 2009).

O mecanismo de ação do benzonidazol envolve a redução do seu grupo nitro por enzimas nitroredutases. Neste processo, origina-se intermediários de radicais livres e metabolitos eletrofílicos que reagem com proteínas, lipídios, DNA e perturbam a função celular normal e o metabolismo do parasito. Também, acredita-se que a inibição da NADH-fumarato redutase de *T. cruzi*, a melhora da fagocitose e a morte por INF- γ sejam mecanismos adicionais envolvidos na atividade tripanocida do benzonidazol. De forma semelhante, o nifurtimox também atua através do mecanismo de redução do grupo nitro. No entanto, há um maior papel das espécies reativas de oxigênio, como íon superóxido e o peróxido de hidrogênio, que são tóxicos para *T. cruzi* (GASPAR et al., 2015).

Estudos clínicos mostram que ambos medicamentos apresentam atividade farmacológica significativa na fase aguda da doença e na infecção congênita, apresentando expressivos índices de cura, em torno de 80% dos pacientes tratados (COURA, 2009; COURA, PEREIRA-BORGES et al., 2011). Entretanto, apresentam alta toxicidade e vários efeitos colaterais, o que geralmente levam à interrupção do tratamento.

Os efeitos secundários mais frequentes com o uso do benzonidazol são as manifestações cutâneas, como as dermatites, anorexia, dor muscular e edema generalizado. Para o uso do nifurtimox foram relatados alterações psíquicas e manifestações digestivas tais como náusea e vômitos, além de contraindicação para pacientes com doenças renais, hepática e grávidas (BOIANI et al., 2010). Outros problemas associados a terapia com estes medicamentos são a limitação quanto à eficácia durante a fase crônica da doença, longo período de tratamento e a grande variabilidade genética das populações de *T. cruzi*, que pode interferir na atividade antiparasitária dos fármacos (BONNEY, 2014).

Diante destes dados, há extrema necessidade na busca de novas terapias, a fim de resolver estas limitações do tratamento convencional e estar de acordo com o fármaco ideal preconizado pela Organização Mundial da Saúde, no qual é estabelecido cura parasitológica em todas as fases da doença, baixo custo para o paciente, nenhum efeito colateral, administração em poucas doses entre outros (WHO, 2015). Neste sentido, estudos com associação e reposicionamento de fármacos, modificação molecular de compostos já existentes, síntese de novas moléculas ou utilização de produtos naturais vêm ganhando destaque (HOET et al., 2004; FIELD et al., 2017).

Quando se associa dois ou mais medicamentos para o tratamento de uma doença, espera-se como resultado efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. Sinergismo resulta da interação positiva entre os dois compostos, ou seja, quando o efeito com a utilização da combinação é maior do que o obtido para cada fármaco isoladamente. A ausência de interação é referida como efeito aditivo; o efeito da combinação é semelhante ao observado com a utilização das drogas em monoterapia. Já nas interações antagônicas, a mistura dos compostos resulta em efeito menor que o esperado (ZIMMERMANN et al., 2007; HE, 2016).

Um dos modelos experimentais para avaliar os efeitos da combinação de agentes inibitórios *in vitro* é o “chequerboard”, forma mais conhecida e simples para medir estes efeitos (HALLANDER et al., 1982). Neste caso, utiliza-se uma variedade de concentrações em série dos fármacos e posterior cálculo do FICI (índice de concentração inibitória fracionária). A partir deste cálculo, a combinação dos agentes pode ser classificada com FICI menor que 1 indicando interação sinérgica; se superior a 1, interação antagônica e igual a 1, efeito aditivo (CHOU, TALALAY, 1984; CHOU, 2006).

Fármacos combinados podem atuar em diferentes alvos terapêuticos a fim de melhorar a resposta ao tratamento, visando principalmente um aumento da eficácia, redução das dosagens individuais e conseqüentemente os efeitos colaterais de cada um (HE, 2016).

Como *T. cruzi* apresenta uma variedade de mecanismos de invasão e infecção, além de ser capaz de parasitar diferentes tecidos, as estratégias de tratamento que consideram mais do que um alvo terapêutico parecem ser promissoras. Neste sentido, estudos estão focando na combinação de fármacos antiparasitários convencionais com outros compostos sintéticos ou naturais que poderiam agir modulando a resposta imune ou apresentando diferentes mecanismos de ação. Diversas combinações de fármacos já foram testadas para o tratamento da doença, abordando principalmente a associação de novos compostos com benzonidazol (LOPEZ-MUÑOS et al, 2010; ASTELBAUER, WALOCHNIK, 2011; GARCIA et al., 2016).

PELIZZARO-ROCHA et al. (2010) estudaram a combinação do benzonidazol com partenolídeo, um sesquiterpeno de origem natural isolado de *Tanacetum parthenium*. Os tratamentos mostraram forte efeito sinérgico nas formas epimastigotas e aditivo para tripomastigotas. Quanto a citotoxicidade, a combinação resultou em forte antagonismo levando a maior proteção de células mamíferas aos efeitos colaterais do medicamento. Resultados semelhantes também foram observados na combinação de benzonidazol com outro sesquiterpeno (guaianolida 11,13-dehidrocompressanolida) isolado da mesma planta, mostrando atividade sinérgica e aditiva sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas, respectivamente (COGO et al., 2013).

Produtos sintéticos também foram estudados em associação ao benzonidazol, como no trabalho de VALDEZ et al. (2012) que avaliaram o

composto C4 (N-Butyl-1-(4-Dimethylamino) Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carboline-3-Carboxamide). Nos testes *in vitro* a combinação mostrou efeito sinérgico contra epimastigotas e tripomastigotas, e em modelo murino observaram redução nos níveis de parasitemia, de infiltrados inflamatórios e na taxa de mortalidade dos animais.

Além disso, a associação com medicamentos utilizados para tratar outras doenças também pode ser considerada uma estratégia promissora na terapia da doença de Chagas. Estudos focados nas interações entre benzonidazol e antifúngicos como cetoconazol (ARAÚJO et al., 2000), posaconazol (DINIZ et al., 2013) e itraconazol (MARTINS et al., 2015) mostraram maior eficácia na quimioterapia em infecção experimental quando comparado ao tratamento com os medicamentos isoladamente, indicando um potencial para novas terapias para doença de Chagas.

Outra estratégia bastante estudada para o tratamento de doenças negligenciadas é a utilização de produtos naturais, que podem ser de origem vegetal ou animal, considerados uma rica fonte de compostos bioativos que podem oferecer novos mecanismos de ação e menor toxicidade que o tratamento convencional (SCOTTI et al., 2016).

Os produtos naturais também podem influenciar o sistema imunológico e seus efeitos podem ser manipulados para produzir uma resposta imune maior ou menor. Uma avaliação das respostas imunes após a exposição a estes compostos poderia fornecer respostas sobre como eles atuam dentro do hospedeiro (IZUMI et al., 2011). Além disso, podem ser empregados como modelo para o desenvolvimento de fármacos sintéticos e semissintéticos com eficácia, segurança e propriedades farmacocinéticas melhoradas (CHEUKA et al., 2017).

Devido a estas propriedades, produtos derivados de plantas são uma imensa fonte de compostos potencialmente ativos contra protozoários. Desta forma, para a doença de Chagas, a perspectiva de desenvolver novos medicamentos nos últimos 15 anos, levou ao rastreio de quase 400 espécies pertencentes a mais de 100 famílias de plantas para atividade contra *T. cruzi* (IZUMI et al., 2011).

1.5 ÓLEO DE COPAÍBA E ÁCIDO CAURENÓICO

Árvores do gênero *Copaifera* (família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinioideae*), conhecidas popularmente como copaíbas ou copaibeiras, são encontradas nas regiões tropicais da América Latina e África Ocidental. No Brasil, estas árvores são nativas principalmente das regiões sudeste, centro-oeste e amazônica e reconhecidas por atingir até 40 metros de altura, possuir tronco com coloração escura e copa ampla e densa, com flores pequenas utilizadas para identificação das espécies (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002).

Estas árvores produzem uma oleoresina denominado óleo de copaíba, que exsuda do tronco ferido e é importante por conferir a planta proteção contra animais e patógenos (MARTINS et al., 2008). Apresenta odor forte e característico, coloração do amarelo claro ao marrom avermelhado, viscosidade e composição química variável dependendo da espécie de copaíba extraído (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002). Características genéticas da planta, além do tipo de solo, disponibilidade de água e época do ano também podem influenciar na sua composição.

O óleo de copaíba é comercializado em todo o país, especialmente na região amazônica, em feiras livres e lojas especializadas em produtos naturais. Na cultura popular, é indicado para inúmeras enfermidades como bronquite e asma, inflamações em geral e cicatrização de feridas (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2002; CARVALHO et al., 2005). Portanto, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de confirmar e validar cientificamente as propriedades medicinais atribuídas a esse produto natural.

PAIVA et al. (1998) mostraram que óleo de copaíba extraído de *C. langsdorffi* apresentava efeito protetor da mucosa gástrica de ratos, prevenindo o aparecimento de úlceras induzidas quimicamente, enquanto MARTINI et al. (2016) viram que o tratamento tópico com óleo de *C. multijuga* influenciava positivamente no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

O efeito anti-inflamatório foi mostrado por VEIGA et al. (2007) com óleos de três espécies de copaíbas: *C. multijuga*, *C. cearensis* e *C. reticulata*, que foram capazes de inibir parcialmente a produção de óxido nítrico por

macrófagos e reduzir a pleurisia em modelo murino. GHIZONI et al. (2017) também estudaram esta propriedade do óleo de *C. reticulata* em ratos com artrite induzida e viram que o composto apresentava atividade anti-inflamatória e antioxidante nos animais.

A atividade antimicrobiana é, certamente, uma das propriedades mais avaliadas para o óleo de copaíba. SANTOS et al. (2008) mostraram que a oleoresina extraída das espécies *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* atuavam sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, afetando a parede celular destas bactérias. Outro trabalho, utilizando bactéria Gram positiva, foi realizado por OTAGUIRI et al. (2016), no qual mostraram que óleo de *C. multijuga* atuava sobre células planctônicas de *Streptococcus agalactiae*, além de ter efeito na formação do biofilme.

Quanto a atividade antiprotozoária, SANTOS et al. (2008b) mostraram que o óleo de diferentes espécies de *Copaifera* foram capazes de eliminar formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo que o mais eficaz foi o extraído de *C. reticulata*. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que este oleoresina também era capaz de reduzir significativamente o tamanho das lesões em patas de camundongos promovidas pelo parasito (SANTO et al., 2011). Para *T. cruzi*, estudos com óleo de copaíba foram realizados por IZUMI et al. (2013), que mostraram atividade contra todas formas do parasito, particularmente sobre as formas replicativas, nas quais a concentração de 5 µg/mL o óleo de *C. martii* e *C. officinalis* inibiram 99% das formas amastigotas.

Diferenças nos ensaios biológicos com óleo extraído de diferentes espécies de *Copaifera* se devem especificamente a sua composição química, que se apresenta por uma mistura de terpenos, substâncias constituídas basicamente de hidrocarbonetos e formados estruturalmente por unidade de isoprenos (C₅H₈) (VEIGA et al., 2007).

Os sesquiterpenos são responsáveis pelo aroma típico do óleo de copaíba (LEANDRO et al., 2012) e por serem os principais componentes, muitas das atividades farmacológicas da oleoresina são atribuídas a eles. Os mais relatados na literatura são: α-copaeno, β-humuleno, β-cariofileno, α-cubebeno, entre outros e quanto aos diterpenos, os mais encontrados são ácidos diterpênicos como hardwíckiico, covalênico, caurenóico e copálico.

Várias atividades biológicas já foram atribuídas a estes terpenos como sendo anestésicos, anticarcinogênicos, anti-inflamatórios e anti-alérgicos (LEANDRO et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013).

Diterpenos caurânicos são uma classe de compostos que ocorrem naturalmente em plantas, principalmente espécies pertencentes ao gênero *Wedelia*, *Mikania*, *Annona*, *Xylopia* e *Acmela* (HARAGUCHI et al., 2011). O ácido caurenóico (ácido ent-kaur-16-em-19-oic) foi descrito pela primeira vez por FERRARI et al. (1971), no entanto, foi detectado como componente do óleo de copaíba apenas em 1998 por BRAGA e colaboradores, que conseguiram isolar a molécula do óleo de *C. cearensis* através de cromatografia.

Diversas atividades biológicas deste ácido já foram comprovadas, dentre elas ação vasorrelaxante, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (TIRAPELLI et al., 2004; AMBROSIO et al., 2008; BACARIN et al., 2009; CHOI et al., 2011).

CUNHA et al. (2003) atribuíram o papel de relaxante uterino ao ácido caurenóico obtido do óleo de *C. lagsdorffii*, após observarem que a molécula bloqueava o cálcio e interferia nos canais de potássio sensíveis ao ATP, em testes *in vitro* com tecidos musculares de ratos.

Atividade anti-inflamatória foi descrita por PAIVA et al. (2002) que observaram que o ácido caurenóico prevenia o dano tissular através de mudanças histológicas e bioquímicas em modelos murinos com colite induzida por ácido acético. Esta propriedade também foi observada por LYU et al. (2011), no qual camundongos apresentando lesão pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados com ácido caurenóico obtido de *Aralia continentalis*. Neste estudo, houve melhora na estrutura do pulmão e supressão significativa de infiltrado de neutrófilos, ao mesmo tempo que reduzia a atividade da mieloperoxidase, enzima envolvida na migração de leucócitos para o local da inflamação e a expressão de genes para citocinas pró-inflamatórias.

Já, MIZOKAMI et al. (2012) mostraram que administração do ácido caurenóico a camundongos com dor inflamatória induzida por ácido acético levava a um efeito analgésico, com inibição das citocinas TNF- α e IL-1 β , além de ciclooxigenase-2 (COX-2) e precursores da síntese de prostaglandinas-2 (PGE2), importantes mediadores da inflamação.

Como antimicrobiano, JEONG et al. (2013) mostraram propriedades anticariogênicas, com inibição do crescimento, da produção de ácido e formação de biofilme de *Streptococcus mutans*. Posteriormente, MOREIRA et al. (2016) confirmaram esta atividade, mostrando que o ácido era capaz de inibir o crescimento de microrganismos responsáveis pela cárie dental, podendo ser considerado um possível ingrediente na formulação dos produtos de higiene bucal.

SANTOS et al. (2013) avaliaram o efeito do ácido caurenóico sobre *L. amazonensis* e confirmaram que o tratamento resultava em alterações morfológicas e estruturais no parasito, com aumento da permeabilidade da membrana plasmática e despolarização da membrana mitocondrial. Em estudo semelhante, IZUMI et al. (2012) verificaram que o diterpeno também apresentava atividade contra todas as formas de *T. cruzi*, com ação sobre a integridade da membrana do parasito.

A capacidade de plantas em sintetizar produtos que naturalmente agem na defesa contra diferentes patógenos pode ser citotóxica quando administradas ao ser humano (IZUMI et al., 2012). Assim, embora a atividade farmacológica do ácido caurenóico seja expressiva, tem sido relatada uma moderada atividade hemolítica e citotóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2009). No entanto, esta molécula pode ter sua estrutura modificada com objetivo de melhorar sua atividade e/ou reduzir a toxicidade para o hospedeiro (HARAGUCHI et al., 2011).

Desta forma, HARAGUCHI et al. (2011) obtiveram derivados sintéticos a partir do ácido caurenóico e estudaram sua atividade sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os autores observaram que alguns deles foram mais efetivos do que o próprio ácido com valores de IC₅₀ variando de 2-24 µM, indicando que as modificações estruturais aumentavam a atividade tripanocida da molécula, além de gerar menor toxicidade. Outro trabalho utilizando novas substâncias derivadas do ácido caurenóico foi realizado por BATISTA et al. (2013). Neste caso, os compostos sintéticos se mostraram eficazes na eliminação do clone W2 de *Plasmodium falciparum*, um grupo resistente à cloroquina, o que poderia proporcionar novos caminhos também para o desenvolvimento de medicamentos antimaláricos.

2. OBJETIVOS

- Determinar a toxicidade do óleo de copaíba e do ácido caurenóico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.
- Avaliar o efeito destes compostos naturais sobre formas amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e células HeLa infectadas.
- Analisar a expressão de genes para citocinas pró e anti-inflamatórias, genes envolvidos no metabolismo de ferro e defesa antioxidantes em macrófagos peritoneais infectados por *T. cruzi* e tratados com os compostos naturais.
- Analisar a produção de NO e a expressão do gene iNOS, além da quantificação de ROS em macrófagos infectados por *T. cruzi* e tratados com os compostos naturais.
- Observar o efeito combinatório do óleo de copaíba e do ácido caurenóico com benzonidazol sobre as três formas de *T. cruzi* e sobre células LLCMK₂.
- Identificar as alterações funcionais e ultraestruturais que os compostos isolados ou em combinação causam nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.

3 REFERÊNCIAS

ALIBERTI, J.C.S., CARDOSO, M.A.G., MARTINS, G.A., GAZZINELLI, R.T., VIEIRA, L.Q., SILVA, L.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect immunity*, 1961–1967, 1996.

ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., PIACENZA, L., RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 286,8:6627–6640, 2011.

ARGOLO A.M., FELIX M., PACHECO R. & COSTA J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio, PIDC, Inst Oswaldo Cruz, 16-17, 2008.

AMBROSIO, S. R., FURTADO, N.A., DE OLIVEIRA, D.C., DA COSTA, F.B., MARTINS, C.H., DE CARVALHO, T.C., PORTO, T.S., VENEZIANI, R.C. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. *Z Naturforsch C*, 63:5-6, 2008.

ANDRADE, D.V., GOLLOB, K.J., DUTRA, W.O. Acute Chagas Disease: New global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3010, 2014.

ANGHEBEN, A., BOIX, I., BUONFRATE, D., GOBBI, F., BISOFFI, Z., PUPPELLA, S. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*; 13: 540-50, 2015.

ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA. M.Ê.S., BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *J Antimicrob Chemother*, 45: 819–24, 2000.

ASTELBAUER, F., WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 38:118– 124, 2011.

BACCARIN, T., CZEPULA, A., FERREIRA, R.A., LUCINDA-SILVA, R.M. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. *Rev Bras Farmac*, 19:612-616, 2009.

BAFICA, A., SANTIAGO, H.C., GOLDSZMID, R., ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T., SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.*,15;177(6):3515-9, 2006.

BALOUZ, V., AGÜERO, F., BUSCAGLIA, C.A. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol.* 97: 1–45, 2017.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med*, 1:1-10, 2013.

BATISTA, R., GARCÍA, P.A., CASTRO, M.A., DEL CORRAL, J.M.M, SPEZIALI, N.L., VAROTTI, F.P., DE PAULA, R.C., GARCÍA-FERNÁNDEZ, L.F., FRANCESCH, A., FELICIANO, A.S., OLIVEIRA, A.B. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. *Europ J Med Chem.*, 62:168e176, 2013.

BERN, C. Chagas'disease. *N Engl J Med.*, 373:456-66, 2015.

BERN, C., MARTIN, D.L., GILMAN, R.H. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol*; 75: 19-47, 2011.

BOIANI, M., PIACENZA, L., HERNANDEZ, P., BOIANI, L., CERECETTO, H., GONZALEZ, M., DENICOLA, A. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-

containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochem Pharm.*, 79:1736–1745, 2010.

BONNEY, K.M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*, 21, 11, 2014.

BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; ANTUNES, O.A.C.; PINTO, A.C. Terpenoids from *Copaifera cearensis*. *Phytochemistry*, 49, 263–264, 1998.

CARDOSO, M.S., REIS-CUNHA, J.L., BARTHOLOMEU D.C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* 6:659, 2016.

CARDILLO, F. POSTOL, E., NIHEI, J., AROEIRA, L.S., NOMIZO, A., MENGEL J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 122:584-95, 2007.

CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S.G., SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect immun*, 128–134, 1996.

CARLIER, Y., SOSA-ESTANI, S., LUQUETTI, A.O., BUEKENS, P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3): 363-368, 2015.

CARVALHO, J.C.T., CASCON, V., POSSEBON, L.S., MORIMOTO, M.S.S., CARDOSO, L.G.V., KAPLAN, M.A.C., GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950, 2005.

CAVALCANTI, B.C., BEZERRA, D.P., MAGALHÃES, H.I., MORAES, M.O., LIMA, M.A., SILVEIRA, E.R., CÂMARA, C.A., RAO, V.S., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L.V. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. *J Appl Toxicol.*, 29(7):560-8, 2009.

CHEUKA, P.M., MAYOKA, G., MUTAI, P., CHIBALE, K. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*, 22, 58, 2017.

CHOI, R.J., SHIN, E.M., JUNG, H.A., CHOI, J.S., KIM, Y.S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Phytomedicine.*, 15;18(8-9):677-82, 2011.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Reviews.*, Vol. 58, 3, 623-574, 2006.

CHOU, T.C., TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation.* 22; 27-55, 1984.

COGO, J., CALEARE,A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., FERREIRA, I.C.P., NAKAMURA, C.V. Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benzonidazole. *Phytomedicine* 20:59– 66, 2012.

CORASSA, R., ACEIJAS, C., BRITO ALVES, P.A., GARELICK, H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspect Public Health*,137:5, 289-295, 2016.

COSTA-LOTUFO, L.V., CUNHA, G.M., FARIAS, P.A., VIANA, G.S., CUNHA, K.M., PESSOA, C., MORAES, M.O., SILVEIRA, E.R., GRAMOSA, N.V., RAO, V.S. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon.*, 40(8):1231-234, 2002.

COTTA-DE-ALMEIDA, V., BERTHO, A.L., VILLA-VERDE, D.M., SAVINO, W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Immunol Immunopathol.*, 82: 125–32, 1997.

COUPER, K.N., BLOUNT, D.G, RILEY, L.M. IL-10: The Master regulator of immunity to infection. *J Immunol.*, 180:5771-5777, 2008.

COURA, J.R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(8): 962-967, 2013.

COURA, J.R. Present Situation and new Strategies for Chagas disease Chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 549-554, 2009.

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

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106: 641-645, 2011.

CUNHA, K.M., PAIVA, L.A., SANTOS, F.A., GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R., RAO, V.S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. *Phytother Res*, 17(4):320-4, 2003.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 103(4):313-25, 2008.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasit Res*. 88(12):1013-25, 2002.

DIAS, J.C.P., AMATO NETO, V., LUNA, E.J.A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44: 375–379, 2011.

DIAS, J.C.P., RAMOS JR, A.N., GONTIJO, E.D., LUQUETTI, A., SHIKANAI-YASUDA, M.A., COURA, J.R., TORRES, R.M., DA CUNHA MELO, J.R. 2nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop* 49:Supplement I, 2016.

DINIZ, L.F., URBINA, J.A., DE ANDRADE, I.M., MAZZETI, A.L., MARTINS, T.A., Caldas, I.S. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis* 7(8): e2367, 2013.

DOMINGUES, C.S., HARDOIM, D.J., SOUZA, C.S.F., CARDOSO, F.O., MENDES, V.G., PREVITALLI-SILVA, H. Oral Outbreak of Chagas Disease in Santa Catarina, Brazil: Experimental Evaluation of a Patient's Strain. *PLoS ONE* 10(10): e0122566, 2015.

DUTRA, W.O., GOLLOB, K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.*, 21(3): 287–292, 2008.

DUSZENKO, M., GINGER, M.L., BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M., COLOMBO, M., COOMBS, G.H., COPPENS, I., JAYABALASINGHAM, B., LANGSLEY, G., DE CASTRO, S.L., MENNA-BARRETO, R., MOTTRAM, J.C., NAVARRO, M., RIGDEN, D.J., ROMANO, P.S. Autophagy in protists. *Autophagy* 7:2, 127-158; 2011.

ENGSTLER, M., PFOHL, T., HERMINGHAUS, BOSCHART, M., WIEGERTJES, G., HEDDERGOTT, N., OVERATH, P. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell.*, 2;131(3):505-15, 2007.

FERRARI, M., PAGNONI, U.M., PELIZZONI, F., LUKES, V., FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. *Phytochemistry*, 10: 905-907, 1971.

FERREIRA IDE L, SILVA TP. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. Rev Soc Bras Med Trop., Oct;39(5):507-9, 2006.

FIELD, M.C., HORN, D., FAIRLAMB, A.H., FERGUSON, M.A., GRAY, D.W., READ, K.D., DE RYCKER, M., TORRIE, L.S., WYATT, P.G., WYLLIE, S., GILBERT, I.H. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. Nat Rev Microbiol., 27;15(4):217-231, 2017.

FIGUEIRA, T.R., BARROS, M.H., CAMARGO, A.A., CASTILHO, R.F., FERREIRA, J.C., KOWALTOWSKI, A.J., SLUSE, F.E., SOUZA-PINTO, N.C., VERCESI, A.E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. Antioxid. Redox Signal., 18:2029–2074, 2013.

FORSTERMANN, U., SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J., 33:829–837, 2012.

GARCÍA, M.C., PONCE, N.E., SANMARCO, L.M., MANZO, R.H., JIMENEZ-KAIRUZ, A.F., AOKI, M.P. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental Chagas disease. Antimicrob Agents Chemother, 60:3700 –3708, 2016.

GASPAR, L., MORAES, C.B., FREITAS-JUNIOR, L.H., FERRARI, S., COSTANTINO, L., COSTI, M.P., CORON, R.P., SMITH, T.K., SIQUEIRA-NETO, J.L., MCKERROW, J.H., CORDEIRO-DA-SILVA, A. Current and Future Chemotherapy for Chagas Disease. Curr Med Chem., 22(37):4293-312, 2015.

GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. Nat Rev Immunol., 6(12):895-906, 2006.

GEIGER, A., BOSSARD, G., SERENO, D., PISSARRA, J., LEMESRE, J.L., VINCENDEAU, P. HOLZMULLER, P. Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from trypanosomatids. *Front. Immunol.* 7:212, 2016.

GHIMIRE, K., ALTMANN, H.M., STRAUB, A.C., ISENBERG, J.S. Nitric oxide: what's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol.*, 1;312(3):C254-C262, 2017.

GHIZONI, C.V., ARSSUFI AMES, A.P., LAMEIRA, O.A., BERSANI, C.A., SÁ NAKANISHI A.B., BRACHT, L., MARÇAL NATALI, M.R., PERALTA, R.M., BRACHT, A., COMAR, J.F. Anti-Inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *J Cell Biochem*, Mar 21, 2017.

GOMES, Y.M., LORENA, V.M., LUQUETTI, A.O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(Suppl 1):115–121, 2009.

GORDON, S., MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593–604, 2010.

GUILMOT, A., BOSSE, J., CARLIER, Y., TRUYENS, C. Monocytes Play an IL-12-Dependent Crucial Role in Driving Cord Blood NK Cells to Produce IFN-g in Response to *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2291, 2013.

GUIMARÃES, A.G., QUINTANS, J.S.S., QUINTANS-JUNIOR, L.J. Monoterpenes with analgesic activity-A systematic review. *Phytother Res.*, 27:1–15, 2013.

GUPTA, S., BHATIA, V., WEN, J.J., WU, Y., HUANG, M.H., GARG, N.J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.*, 47:1414–1421, 2009.

GUTIERREZ, F.R.S., MINEO, T.W.P., PAVANELLI, W.R., GUEDES, P.M.M., SILVA, J.S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 236-245, 2009.

HALLANDER, H.O., DORNBUSH, K., GEZELIUS, L. Synergism between aminoglycosides and cephalosporin with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22: 743-752, 1982.

HARAGUCHI, S.K., SILVA, A.A., VIDOTTI, G.J., DOS SANTOS, P.V., GARCIA, F.P., PEDROSO, R.B., NAKAMURA, C.V., DE OLIVEIRA, C.M., DA SILVA, C.C. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde-thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. *Molecules*, 26;16(2):1166-80, 2011.

HE, B., LU, C., ZHENG, G., HE, X., WANG, M., CHEN, G., ZHANG, G., LU, A. Combination therapeutics in complex diseases. *J Cell Mol Med.*, 20(12):2231-2240, 2016.

HOET, S., FREDERIK, A., OPPERDOES, B., QUETIN-LECLERC, Q. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 353-364, 2004.

HOUWELING, T.A.J., KARIM-KOS, H.E., KULIK, M.C., STOLK, W.A., HAAGSMA, J.A., LENK, E.J. Socioeconomic inequalities in neglected tropical diseases: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(5): e0004546, 2016.

HOWARD, E.J., XIONG, X., CARLIER, Y., SOSA-ESTANI, S., BUEKENS, P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 121: 22-33, 2014.

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.*, 28, 809, 2011.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., VEIGA, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *J Med Chem*, 12: 2994–3001, 2012.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., VEIGA-JÚNIOR, V.F., NAKAMURA, C.V. Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: a comparative study. *Planta Med*, 79(11):952-8, 2013.

JEONG, S.I., KIM, B.S., KEUM, K.S., LEE, K.H., KANG, S.Y., PARK, B.I., LEE, Y.R., YOU, Y.O. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2013:160592, 2013.

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

KAWAI, T., AKIRA, S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *TRENDS in Mol Med* 13:11, 2007.

KOLLIEN, A.H., SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*, 16(9). 381-387, 2000.

KUMAR, S., TARLETON, R.L. The relative contribution on antibody production and CD8+T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Paras Immun*, 20:207-216, 1998.

KURUP, S.P., TARLETON, R.L. Perpetual expression of PAMPs necessary for optimal immune control and clearance of a persistent pathogen. *Nat Commun*, 4: 2616, 2013.

LEANDRO, L.M., SOUSA VARGAS, F., BARBOSA, P.C.S., NEVES, J.K.O., SILVA, J.A., VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*, 17, 3866-3889, 2012.

LIDANI, K.C.F., BAVIA, L., AMBROSIO, A.R., DE MESSIAS-REASON, I.J. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front Microbiol.*, 20;8:607, 2017.

LOPEZ-MUÑOZ, R., FÁUNDEZ, M., KLEIN, S. *Trypanosoma cruzi*: in vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. *Exp Parasitol*, 167–171, 2010.

LYU, J.H., LEE, G.S., KIM, K.H., KIM, H.W., CHO, S.I., JEONG, S.I., KIM, H.J., JU, Y.S., KIM, H.K., SADIKOT, R.T., CHRISTMAN, J.W., OH, S.R., LEE, H.K., AHN, K.S., JOO, M. *ent-kaur-16-en-19-oic acid*, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2. *J Ethnopharmacol.*, 11;137(3):1442-9, 2011.

MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P., PENA, S.D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*, 4: 1-16, 2002.

MACHADO, F.S., DUTRA, W.O., ESPER, L., GOLLOB, K., TEIXEIRA, M.M, FACTOR, S.M., WEISS, L.M., NAGAJYOTHI, F., TANOWITZ, H.B., GARG, N.J. Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin Immunopathol.*, 34(6): 753–770, 2012.

MACHADO-SILVA, A., CERQUEIRA, P.G., GRAZIELLE-SILVA, V., GADELHA, F.R., PELOSO, E.F., TEIXEIRA, S.M.R., MACHADO, C.R. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res* 767:8–22, 2016.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev.*, 201:304-371, 2004.

MARTINI, C.A.N, SCAPINI, J.E.S., COLLAÇO, L.M., MATSUBARA, A., DA VEIGA JÚNIOR, V.F. Comparative analysis of the effects of *Copaifera multijuga* oil-resin and nitrofurazona in the cutaneous wound healing process. *Rev. Col. Bras. Cir.* 3(6): 445-451, 2016.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F., LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. *Rodriguésia*, 59 (3): 455-476, 2008.

MARTINS, A.F., DINIZ, T.F., MAZZETI, L., DA SILVA, A.L. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. *PLoS ONE* 10(6): e0128707, 2015.

MILLS, C.D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol.*, 32:463–488, 2012.

MIZOKAMI, S.S., ARAKAWA, N.S., AMBROSIO, S.R., ZARPELON, A.C., CASAGRANDE, R., CUNHA, T.M., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q., VERRI, W.A. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the NO–cyclic GMP–Protein kinase G–ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. *J Nat Prod.*, 25;75(5):896-904, 2012.

MOREIRA, M.R., SOUZA, A.B., SOARES, S., BIANCHI, T.C., EUGÊNIO, D.S., LEMES, D.C., MARTINS, C.H.G., MORAES, T.S., TAVARES, D.C., FERREIRA, N.H., AMBRÓSIO, S.R., VENEZIANI, R.C.S. ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: *In vitro* activity against bacteria responsible for dental caries. *Fitoterapia* 112:211–216, 2016.

NARDY, F.A., FREIRE-DE-LIMA, C.G., MORROT, A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol Res., 2015:178947, 2015.

NAHREVANIAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. Braz J Infect Dis., 13(6):440-8, 2009.

OTAGUIRI, E.S., MORGUETTE, A., BIASI-GARBIN, R.P., MOREY, A.T., LANCHEROS, C., KIAN, D., OLIVEIRA JR, A.G., KERBAUY, G., PERUGINI, M., DURÁN, N., NAKAMURA, C.V., VEIGA JUNIOR, V.F., NAKAZATO, G., PINGE-FILHO, P., YAMAUCHI, L.M., YAMADA-OGATTA, S.F. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae* Curr Pharm Biotechnol., Dec 13, 2016.

PAIVA, L.A., GURGEL, L.A., SILVA, R.M., TOMÉ, A.R., GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R., SANTOS, F.A., RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. Vascul Pharmacol, 39(6):303-7, 2002.

PAIVA LA, RAO VS, GRAMOSA NV, SILVEIRA ER Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. J Ethnopharmacol 62: 73-78., 1998.

PELIZZARO-ROCHA, K.J., TIUMAN, T.S., IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS, B.P., NAKAMURA, C.V. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. Phytomedicine 18:36–39, 2010.

PHANIENDRA, A., JESTADI, D.B., PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Ind J Clin Biochem, 30(1):11–26, 2015.

PIACENZA, L., ALVAREZ, M., PELUFFO, G., RADÍ, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Current Opinion in Microbiology*, 12:415–421, 2009.

PINHEIRO, E., BRUM-SOARES, L., REIS, R., CUBIDES, J.C. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Rev Soc Bras Med Trop*, 50(3):296-300, 2017.

PINHO, R.T., DA SILVA, W.S., CORTES, L.M.C., SOUSA, P.S.V. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Experimental Parasitology* 147: 72–80, 2014.

PISSETTI, C.W., CORREIA, D., DE OLIVEIRA, R.F., LLAGUNO, M.M., BALARIN, M.A.S. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5(3): e976, 2011.

RADÍ R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem.*, 288(37):26464–72, 2013.

RASSI, A JR., RASSI, A., MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Amer.*, 26(2): 275-291, 2012.

RASSI, A.; JR, RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet.*, 375: 1388–1402, 2010.

REED, S.G., BROWNELL, C.E., RUSSO, D.M, SILVA, J.S., GRABSTEIN, K.H., MORRISSEY, P.J. IL-10 Mediates Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection, *J Immunol* 153(7):3135-40, 1994.

RENDELL, V.R., GILMAN, R.H., VALENCIA, E., GALDOS-CARDENAS, G., VERASTEGUI, M., SANCHEZ, L. *Trypanosoma cruzi*-Infected Pregnant Women without Vector Exposure Have Higher Parasitemia Levels: Implications for Congenital Transmission Risk. *PLoS ONE* 10(3): e0119527, 2015.

REQUENA-MÉNDEZ, A., ALDASORO, E., DE LAZZARI, E., SICURI E, BROWN, M., MOORE, D.A., GASCON, J., MUÑOZ, J. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 13;9(2):e0003540, 2015.

RODRIGUES, A.A., SAOSA, J.S.S., DA SILVA, G.K., MARTIN, F.A., DA SILVA, A.A. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. *PLoS Negl Trop Dis* 6(4): e1598, 2012.

RODRIGUES, J.C., GODINHO, J.L., DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcel Biochem.*, 74: 1-42, 2014.

SALOMON, C.J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Scienc*, 101:3, 2012.

SANTOS, A.O., COSTA, M.A., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B.P., DA VEIGA-JÚNIOR, V.F., DE SOUZA LIMA, M.M., NAKAMURA, C.V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp Parasitol*, 129(2):145-51, 2011.

SANTOS, A.O., IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B.P., VEIGA-JÚNIOR, V.F., NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(1):59-64, 2013.

SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*,103(3):277-81, 2008.

(b) SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba

oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz, 103(3): 277-281, 2008.

SATHLER-AVELAR, R., VITELLI-AVELAR, D.M., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz, 104(Suppl. I): 246-251, 2009.

SCHMUNIS, G.A., YADON, Z.E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop; 115: 14-21, 2010.

SCOTT, D.A., DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem., 275:31, 2000.

SCOTTI, M.T., SCOTTI, L., ISHIKI, H., RIBEIRO, F.F., CRUZ, R.M, OLIVEIRA, M.P., MENDONÇA, F.J. Natural products as a source for antileishmanial and antitrypanosomal agents. Comb Chem High Throughput Screen., 19(7):537-53, 2016.

SICA, A., MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest 122:787–795, 2012.

SILVA, J.S., ALIBERTI, J.C., MARTINS, G.A., SOUZA, M.A., SOUTO, J.T., PÁDUA, M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res.;31(1):111-5, 1998.

SILVA-DOS-SANTOS, D., BARRETO-DE ALBUQUERQUE, J., GUERRA, B., MOREIRA, O.C., BERBERT, L.R., RAMOS, M.T. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. PLoS Negl Trop Dis, 11(4): e0005507, 2017.

SOUZA, P.E., ROCHA, M.O., MENEZES, C.A., COELHO, J.S., CHAVES, A.C. *T. cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and

cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun* 75: 1886–1894, 2007.

TAKEUCHI, O., AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140(6):805–20, 2010.

TARLETON, R.L. Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol.*, 19(4): 430-4, 2007.

TARLETON, R.L., SUN, J., ZHANG, L., POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.*, 62(5):1820-9, 1994.

TEIXEIRA, A. R. HECHT, M.M, GUIMARO, M.C., SOUSA, A.O., NIT, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev*, 3:592-630, 2011.

TEIXEIRA, D.E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P.H., DE SOUZA, W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1749, 2012.

TIRAPELLI, C. R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*, 492:233-241, 2004.

VALDEZ, R.H., TONIN, L.T.D., UEDA-NAKAMURA, T. SILVA, S.O., DIAS FILHO, B.P., YAMADA-OGATTA, S.F., YAMAUCHI, L.M., NAKAMURA., C.V. *In Vitro* and *In vivo* trypanocidal synergistic activity of *N*-Butyl-1- (4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro-Carboline-3-carboxamide associated with benzimidazole. *Antim Agents Chemoth.*, 507–512, 2012.

VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova*, 25:2 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F., ROSAS, E.C., CARVALHO, M.V., HENRIQUES, M.G.M.O., PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. *J Ethnopharm.*, 112:248–254, 2007.

VENTURINI, G., SALVATI, L., MUOLO, M., COLASANTI, M., GRADONI, L., ASCENZI, P. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(2):437–41, 2000.

WAGHABI, M.C., COUTINHO, C.M., SOEIRO, M.N., PEREIRA, M.C., FEIGE, J.J., KERAMIDAS, M., COSSON, A., MINOPRIO, P., VAN LEUVEN, F., ARAÚJO-JORGE, T.C. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha (2)-macroglobulin. *Infect Immun.*, 70: 5115–5123, 2009.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem.J.*, 352:3 755-761, 2000.

WILKINSON, S. R., KELLY, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med.*, 29;11:e31, 2009.

WHO. Neglected tropical diseases. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>, 2015.

ZANLUQUI, N.G., WOWK, P.F., PINGE-FILHO, P. Macrophage polarization in Chagas disease. *Clin Cell Immunol*, 6:2, 2015.

ZIMMERMANN, G.R., LEHÁR, J., KEITH, C.T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today.*, 12(1-2):34-42, 2007.

ANEXO 1

Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery

Danielle Kian^a, César Armando Contreras Lancheros^b, João Paulo Assolini^c, Nilton Syogo Arakawa^d, Valdir Florêncio Veiga-Júnior^e, Celso Vataru Nakamura^b, Phileno Pinge-Filho^c, Ivete Conchon-Costa^c, Wander Rogério Pavanelli^c, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^a, Lucy Megumi Yamauchi^{a,*}

^aDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

^bDepartamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

^cDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil,

^dDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

^eDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

*Corresponding author, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil. Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788.

E-mail: lionilmy@uel.br

ABSTRACT

Natural compounds have been investigated considering their activity, mechanisms of action, and toxicity. Knowledge about which pathway is activated remains crucial to understand the mechanism of action of these bioactive substances during treatment of the infected host. Herein, we showed that copaiba oil and kaurenoic acid were able to eliminate *Trypanosoma cruzi* forms by infected macrophages, through further mechanisms besides nitric oxide, reactive oxygen species, iron metabolism, and antioxidant defense. Both compounds induced an anti-inflammatory response with an increase in IL-10 and TGF- β and decrease in IL-12 production. Although copaiba oil and kaurenoic acid have the ability to modulate the immune response in host cells, their antimicrobial activity seems to be a direct action of the compounds on the parasites, causing their death.

Keywords: Copaiba oil, Kaurenoic acid, Chagas disease, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory effect

1. Introduction

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a neglected tropical disease which affects at least 6 million people in Latin America [1]. During the acute phase of the Chagas disease non-specific symptoms may appear in addition to high parasitaemia [2]. Inflammatory cytokines, chemokines, and nitric oxide (NO) production, as well as the activation of innate mechanisms are important to control this initial infection [3]. One of major effector cells that lead to parasite death are macrophages, which act through NO production induced by TNF- α and IFN- γ , whereas anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β are associated with susceptibility to *T. cruzi* infection, by impairing activation of macrophages [4]. All these cytokines, therefore, determine the polarization of these cells to M1 or M2 profiles. M1 macrophages are efficient producers of pro-inflammatory cytokines and responsible for host defense against intracellular pathogens, while anti-inflammatory cytokines induce an M2

phenotype related to suppression of inflammation [5]. This feature is important to define host resistance or susceptibility to a pathogen.

The fact that natural products also have the ability to modulate the immune system is relevant, since they can offer new substances for the treatment of Chagas disease. Currently, the drugs used are nifurtimox and benznidazole, however both present high toxicity and variable efficacy [6,7]. Thus, we evaluated the immunomodulatory activity of two bioactive substances that have antimicrobial activity against *T. cruzi*, copaiba oil and kaurenoic acid.

The *Copaifera* genus belongs to the Fabacea family and produces an oleoresin that has been widely studied due to its medicinal properties such as healing [8], anti-inflammatory action, decreasing leukocyte migration [9], or inhibiting histamine and serotonin pathways [10], besides antiprotozoal activities against *T. cruzi* [11] and *Leishmania amazonensis* [12]. The oleoresin from *C. martii* presents trypanocidal activity in all forms of *T. cruzi*, inducing lipid peroxidation and permeability changes in the cellular and mitochondrial membrane of the parasites [11]. Furthermore, oils from different species of *Copaifera* (*C. multijuga*, *C. officinalis*, *C. reticulata*, *C. lucens*, *C. paupera*, *C. martii*, *C. langsdorfii* and *C. cearensis*) eliminated the two forms of *L. amazonensis* by inducing an increase in plasma membrane permeability and depolarization in the mitochondrial membrane potential of the parasite [12]. Significantly, *L. amazonensis* infected mice orally treated with *C. martii* oil presented improvement in paw lesions caused by parasites [13].

Kaurenoic acid is one of main diterpene of copaiba oil and can also be found in other plant species. Its biological activities, such as, anti-allergic [14], immunosuppressive [15], apoptosis-inducing [16], anti-inflammatory [17], and antimicrobial activities [18] have already been demonstrated. Kaurenoic acid also eliminated trypomastigote forms of *T. cruzi* [19] by causing alteration in membrane integrity [20] and two forms of *L. amazonensis* through increasing plasma membrane permeability and mitochondrial membrane depolarization of promastigote forms [21].

Although the antiprotozoal effects of both substances have been shown, the immunomodulatory activity in *T. cruzi* infected cells still remains to be determined. Since one of factors that may influence the efficiency of treatment is cooperative action between drug effect and host immune response, the aim

of this study was to evaluate whether copaiba oil and kaurenoic acid induce the killing machinery in *T. cruzi* infected macrophages.

2. Material and methods

2.1 Natural compounds

We evaluated the activity of oleoresin from *Copaifera martii* collected at Tapar, Par, provided by Valdir F. Veiga-Júnior (Universidade Federal do Amazonas, Brazil), and deposited in the Herbarium Chico Mendes (Maric, Rio de Janeiro, Brazil). Kaurenoic acid obtained from dried roots of *Sphagneticola trilobata* was provided by Nilton S. Arakawa (Universidade Estadual de Londrina, Brazil) [22]. Substances were prepared as stock solution in DMSO, and the final concentration of solvent did not exceed 0.1% in the experiments.

2.2 Parasite *T. cruzi*

Trypomastigotes cultured in LLCMK₂, a fibroblast cell line, were used. Cell cultures were infected with 5x10⁶ trypomastigotes and after 24 h, non-internalized parasites were removed and cultures were maintained in 10% FBS-RPMI at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Five days post infection, trypomastigote forms were collected from cell supernatants.

2.3 Animals

Male BALB/c mice, 7–8 weeks old, weighing 20-25 g, were obtained from the Universidade Estadual de Maringá, Brazil. Mice maintenance and procedures were performed according to protocols approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (protocol number 10611/2015.39). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.4 Culture of adherent peritoneal exudate cells

Peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavity of mice with 5 mL cold PBS buffer, washed and counted. 2×10^5 cells/well were adhered to 24-well plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in 10% FBS-RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂ for 24h. Next, non-adherent cells were washed with PBS and adherent cells maintained in 10% FBS-RPMI medium.

2.5 Viability of peritoneal macrophages

The cytotoxicity effects of copaiba oil and kaurenoic acid treatment were determined by mitochondrial oxidation of MTT [dimethylthiazol diphenyltetrazolium bromide] assay. Briefly, peritoneal macrophages (2×10^5 cells/well) were cultured in a 96-well culture plate (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) with 10% FBS-RPMI medium containing different concentrations of copaiba oil or kaurenoic acid (ranging from 5 to 160 µg/mL) or medium alone as cell growth control. Cells were incubated for 48 h at 37 °C in 5% CO₂. Next, MTT (0.5 mg/mL) was added according to the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)]. The product formed was measured at 540 nm with a microtiter plate reader (Synergy HT, Biotek, USA). Assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.6 Phagocytic assay

Peritoneal macrophages and HeLa lineage cells (2×10^5 cells/well) were adhered to 13 mm round glass coverslips and infected with trypomastigote forms in a ratio of 5:1 (parasites/cell) for 2h in 10% FBS-RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂. After infection, cells were washed with PBS and incubated with copaiba oil or kaurenoic acid (at concentrations of 5, 10, 15, and 20 µg/mL) or medium alone for 48h at 37 °C in 5% CO₂. Cells were stained with Giemsa and the survival index of infection was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell [23]. Experiments were performed in triplicate in three independent experiments. All tests included untreated *T. cruzi* infected peritoneal macrophages as controls.

Quantification was carried out using light microscopy where 200 cells were randomly counted. The supernatant was used to measure the levels of nitric oxide (NO).

2.7 Trypomastigote release in treated T. cruzi-infected macrophages

Peritoneal macrophages (2×10^5 cells) were infected with 1×10^6 trypomastigotes per well for 2h at 37 °C in 5% CO₂. Non-internalized parasites were washed with PBS and cells were treated with copaiba oil or kaurenoic acid (10 and 20 µg/mL) in 10% FBS-RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂. The assay included untreated *T. cruzi* infected peritoneal macrophages as controls. Four days after treatment, trypomastigote release to supernatants was counted until day 7 after infection. Assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.8 Gene expression analyses of treated T. cruzi infected macrophages

RNA from *T. cruzi*-infected peritoneal macrophages (1×10^6 cells) treated with copaiba oil or kaurenoic acid (10 and 20 µg/mL) or medium alone, as mentioned in phagocytic assay, was extracted using an SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's procedure. RNA concentration was determined by absorbance (260 nm) measurements with a spectrophotometer (Synergy HT, Biotek, Winooski, USA). Complementary DNA was synthesized using 500 ng of total RNA and 2 µM Oligo(dT) primer in a reverse transcription reaction by MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) following the manufacturer's procedure. Real-time PCR was performed in Rotor-Gene Q equipment (Qiagen, Hilden, Germany) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, USA), in the final volume of 20 µL. The reaction mixture also contained 2 µM primers (Table 1) and 100 ng of cDNA template. Cycling conditions were 10 min at 95 °C and 40 cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at 60 °C, and 30 sec at 72 °C, followed by melting curve analysis (60 to 95 °C at 0.5 °C/sec). Gene expression levels were determined by reference to β-actin using the comparative cycle threshold method. Assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.9 Determination of nitrite levels

NO production was determined by measuring the level of accumulated nitrite in the supernatant obtained from the phagocytic assay by the Griess reaction. In a 96-well plate, the culture supernatant was incubated with the same volume of Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid) for 10 min at room temperature and in the dark. Thereafter, the samples were read at an absorbance of 540 nm in a microtiter plate reader (Synergy HT, Biotek, USA). Nitrite concentrations were calculated by reference to a standard curve generated by known concentrations of sodium nitrite. Assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.10 Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) by fluorescence

Total ROS production was measured based on the increase in fluorescence caused by conversion of chemical dye used to fluorescence compound 2',7'-dichlorofluorescein (DFA). Briefly, peritoneal macrophages (2×10^5 cells) were adhered to a 96-well black plate for 24h. Cells were infected with trypomastigote forms in a ratio of 5:1 (parasites/cell) for 2h in 10% FBS-RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂. Then, cells were washed with PBS and incubated with copaiba oil or kaurenoic acid (10 and 20 µg/mL) or medium alone for 48h at 37 °C in 5% CO₂. H₂O₂ (0.03%) was used as a positive control. Samples were washed with PBS and then auto fluorescence reading was performed in a Perkin-Elmer Victor fluorometer ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm). Next, 2 µM H₂DCFDA probe (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added to each well and incubated for 30 min in the dark at 37 °C in 5% CO₂. Reading on the fluorometer was again performed. Assays were carried out in triplicate on three different occasions.

2.11 Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, utilizing the GraphPad Prism 6.0 computer software

application (GraphPad Software, San Diego, USA). Results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 *Copaiba oil and kaurenoic acid decreased T. cruzi amastigote proliferation*

In an attempt to verify whether copaiba oil and kaurenoic acid could enhance the trypanocidal capacity of infected cells, the phagocytic index was determined on peritoneal macrophages and HeLa cells. Both treatments promoted a significant decrease in the infection rate and proliferation of the amastigote forms in a dose-dependent manner, with no difference when phagocytic cells or non-phagocytic cells were used (Fig.1). The concentrations tested were not cytotoxic to peritoneal macrophages of mice, with CC_{50} of 46.25 $\mu\text{g/mL}$ to copaiba oil and 70.63 $\mu\text{g/mL}$ to kaurenoic acid (data not shown).

3.2 *Copaiba oil and kaurenoic acid decreases trypomastigote release to culture supernatants by T. cruzi-infected macrophages*

The trypomastigote forms in the supernatants were counted to verify if the treatment influences parasite differentiation and release from infected macrophages. Both compounds, copaiba oil (Fig. 2A) and kaurenoic acid (Fig. 2B), were able to significantly decrease *T. cruzi* release at all concentrations tested when compared to infected and untreated controls.

3.3 *Copaiba oil and kaurenoic acid decrease IL-12 and increase gene expression for TGF- β and IL-10 cytokines in T. cruzi-infected macrophages*

In order to determine the immunomodulatory action of copaiba oil and kaurenoic acid treatment in infected macrophages, we evaluated mRNA levels of IL-12, IL-10, TGF- β , and TNF- α genes by real time PCR. Both treatments decreased IL-12 gene expression (Fig.3A), and upregulated IL-10 (Fig. 3B) and TGF- β (Fig. 3C), whereas TNF- α expression did not show any difference when compared to

the infected and untreated control (Fig.3D), considered significant when $p < 0.05$.

3.4 Copaiba oil and kaurenoic acid decrease NO levels and iNOS gene expression in T. cruzi-infected macrophages

NO is the main microbicidal effector of macrophages and it has been shown that cytokines such as TGF- β and IL-10 act as inhibitors of iNOS gene and NO production, whereas TNF- α is an inductor, important for the control of parasite growth. To analyze whether the treatments influenced the production of this molecule, we measured the levels of nitrite and the expression of the iNOS gene. *T. cruzi*-infected macrophages demonstrated increased NO production and expression of the iNOS gene, however, after treatment with copaiba oil and kaurenoic acid, a significant reduction in nitrite levels in the culture supernatant was noticed at all tested concentrations (Figs. 4A, B). In addition, we observed that treatment with these compounds also decreased the expression of the iNOS gene in these cells compared to the untreated and infected control (Fig.4C).

3.5 Copaiba oil decreases and kaurenoic acid does not change ROS production in T. cruzi-infected macrophages

During *T. cruzi* infection, macrophages are activated to produce ROS in a process known as respiratory burst. As some studies suggest that this mechanism is related to parasite control, we investigated whether both compounds interfere in ROS production. *T. cruzi*-infected macrophages presented increased ROS production, similar to that induced by the positive control, when compared to uninfected cells (data not shown). However, there were no significant differences in ROS production after treatment with copaiba oil and kaurenoic acid, except for the treatment with the highest concentration of copaiba oil tested where a decrease in this production was observed when compared to the infected and untreated cells (Fig. 5).

3.6 Copaiba oil and kaurenoic acid cause downregulation of the Nrf-2 gene, but do not alter the expression of the HO-1 and ferritin genes in T. cruzi-infected macrophages

Since microbicidal activity was not occurring via NO or ROS production, we analyzed whether copaiba oil and kaurenoic acid were inducing other mechanisms related to the iron metabolism, modulation of the immune system, or antioxidant defense by expression of ferritin, heme oxygenase (HO-1), and Nrf-2 genes, respectively. Ferritin and HO-1 did not demonstrate significant differences compared to untreated infected controls (Figs.6A,B), while the Nrf-2 gene expression presented a downregulation in relation to the controls (Fig. 6C).

4. Discussion

Chagas disease chemotherapy relies on the drugs benznidazole and nifurtimox, both of which present well-known toxicity profiles, which include severe side effects associated with patients under treatment. In addition, therapy is challenging as patients are diagnosed in the chronic phase, a period of the disease during which the drugs have less effect. Since these drugs were launched, no changes have been made regarding Chagas disease chemotherapy. In the present study, we showed that copaiba oil and kaurenoic acid were able to eliminate *T. cruzi* and the oleoresin presented better activity when compared to the isolated substance. Interestingly, after the treatments of infected macrophages there was a decrease in parasite-infected cells and a reduction in the release of trypomastigotes even though the anti-inflammatory profile was activated. Indeed, the mechanism of parasite elimination was independent of NO, ROS production, and pathways related to iron metabolism and antioxidant defense, suggesting a direct action on the parasite (Fig.7)

This antimicrobial activity on amastigote forms was demonstrated using the oleoresins from *C. martii* and *C. officinalis* [11] and kaurenoic acid [21] on intracellular forms of *T. cruzi* in LLCMK₂ cells, however, the immunomodulatory activities of both compounds on *T. cruzi* infected macrophages were unclear. We showed that *T. cruzi* induces a strong proinflammatory response [25],

however, copaiba oil and kaurenoic acid elicit an anti-inflammatory effect that overcomes the parasite response. Increased production of IL-10 was also observed when LPS-induced macrophages were treated with kaurenoic acid [26]. This natural compound is known to present immunomodulatory and antioxidant properties [27]. Furthermore, kaurenoic acid activates TGF- β signaling, resulting in an anti-inflammatory response through prototypic TGF β R [28]. Although the compounds presented an anti-inflammatory profile, with increased TGF- β and IL-10 cytokines and reduced IL-12 production, there was a decrease in the number of infected cells and trypomastigote release.

The cytokine profile that copaiba oil and kaurenoic acid induced in *T. cruzi* infected macrophages suggests an immunomodulatory property capable of activating the macrophages towards the M2 profile. This cell can be activated and phenotypically polarized in two groups: classically activated macrophages (M1) and alternatively activated macrophages (M2), generated from the effects of Th1 or Th2 profile cytokines, respectively [29]. IFN- γ activated M1 produces high levels of TNF- α , IL-12, reactive oxygen, and nitrogen intermediates resulting in greater microbicidal activity. However, during the inflammatory process, the production of anti-inflammatory cytokines also occurs, favoring the polarization to M2. This group can be divided into three categories, one of them, M2c, is induced by IL-10 and TGF- β cytokines [30].

Indeed, induced M2-macrophages through treatment with copaiba oil and kaurenoic acid decreased NO production. Murine peritoneal macrophages induced by LPS and treated with copaiba oil also demonstrated decreases in NO production [30], the authors observed that the 50 mg/mL treatment of oleoresin *C. multijuga* Hayne and *C. cearensis* ex Huber Ducke significantly inhibited NO production by 30%, and 85% when 500 mg/mL oleoresin of *C. reticulata* was used. NO inhibition was also observed when LPS-stimulated J774[26] and RAW 264.7 [31,32] macrophage lineages were treated by kaurenoic acid. In addition, no alterations in ROS production were observed as result of treatment with copaiba oil and kaurenoic acid. This important microbicidal pathway generates antimicrobial superoxide radicals within the phagosome by NADPH oxidase complex [33]. Notably, we showed that neither of these two main microbicidal pathways is activated to eliminate the parasites,

so we investigated other pathways that might be activated to eliminate the parasite.

Nrf2 is a key regulator of antioxidant defenses modulating HO-1. Interestingly, the activation of Nrf2 and HO-1 reduced parasite load when mice and macrophages infected with *T. cruzi* were exposed to Cobalt Protoporphyrin, an activator of Nrf-2, leading to an increase in HO-1 expression that considerably reduced parasite burden in both animals and isolated cells [34]. This enzyme is related to the degradation of the heme group resulting in the formation of carbon monoxide, Fe^{2+} , and biliverdin [35]. Carbon monoxide plays several biological functions as an anti-inflammatory and protection against oxidative stress, while Fe^{2+} ion increases the synthesis of ferritin being responsible for the cytoplasmic iron stock. The increase in ferritin production is related to the decrease in available iron which could inhibit *T. cruzi* growth [36]. We showed that the transcription factor Nrf2 gene expression undergoes downregulation in comparison to the control. Additionally, after the treatments with copaiba oil and kaurenoic acid, no significant difference was observed in either the expression of HO-1 or ferritin gene, when compared to the infected and untreated control. These data, however, differ from those found in the literature where kaurenoic acid treated RAW 264.7 cells showed an increase in Nrf2 gene expression, as well as other genes regulated by them, such as HO-1 [37]. We suggest that these pathways are also not involved in the elimination of *T. cruzi*.

Despite the above, we still observed that copaiba oil and kaurenoic acid are capable of eliminating the intracellular form of *T. cruzi*. We believe that, although the compounds have the capacity to act through modulating the immune response, their activity is mainly due to the direct action on the intracellular parasites, as described by Izumi et al. [11]. Their data showed that the action of *C. martii* copaiba oil causes ultrastructural changes in the parasite observed by electron microscopy. The mechanism proposed by the authors was that the copaiba oil acts directly on the membranes, causing their disorganization and also reducing dimensions of the parasite, which would lead to their death. In addition, we showed that the compounds present in copaiba oil are more effective when in combination, acting synergistically, as suggested by Lima et al. [24] who showed that copaiba oil fractions had less activity on tumor

cells than crude oleoresin. This fact was also observed in the treatment with two terpenes, β -caryophyllene and copalic acid, which together showed synergistic activity against *T. cruzi* [20]. Considering that most species of *Copaifera* genus present these two terpenes in the composition of their oils, this synergism may be one of the reasons why the oil activity is superior to that of isolated compounds.

In conclusion, our study demonstrates that copaiba oil and kaurenoic acid can eliminate the amastigote forms of *T. cruzi* and drive the response of infected macrophages to an M2 profile, confirming its anti-inflammatory properties. Further studies should be performed to elucidate the mechanisms of action on *T. cruzi* forms. Importantly, our results indicate that the use of copaiba oil and kaurenoic acid as a therapeutic compound against *T. cruzi* is beneficial, especially due to their anti-inflammatory effect which could control damage caused by the exacerbated immune response elicited by *T. cruzi*.

Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Vera Lúcia Hideko Tatakihara and Aparecida Donizette Malvezi for their assistance with *T. cruzi* maintenance. This study was supported by the Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UEL/Fundação Araucária [Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada da UEL CP 09/2016], Fundação Araucária [Programa de Apoio a Núcleos de Excelência CP02/2016], and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Mrs.R. Camargo helped with English editing of the manuscript.

References

- [1] WHO (2015). Neglected tropical diseases. Available in <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>
- [2] C. Bern, Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease, *N Engl J Med*, 364 (2011) 2527-34.

- [3] F.S. Machado, G.A. Martins, J.C. Aliberti, F.L. Mestriner, F.Q. Cunha, J.S. Silva, *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide dependent trypanocidal activity, *Circulation*. 102(24) (2000) 3003-3008.
- [4] S.G. Reed, C.E. Brownell, D.M. Russo, J.S. Silva, K.H. Grabstein, P.J. Morrissey, IL-10 Mediates Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection, *J Immunol* 153(7) (1994) 3135-40.
- [5] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6 (2014) 13.
- [6] J. Urbina, Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches, *ActaTropica*. 115 (2010) 55-68.
- [7] J.D. Maya, B.C. Cassels, P. Iturriaga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira, A. Morello, Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host, *Comp Biochem Physiol Part A* 146 (2007) 601–620.
- [8] K.C. de Albuquerque, A.D. da Veiga, J.V. Silva, H.P. Brigido, E.P. Ferreira, E.V.Costa, A.M. Marinho, S. Percário, M.F. Dolabela. Brazilian Amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal leishmaniasis wounds with *Copaifera*, *Evid Based Complement Alternat Med*.(2017) 8350320.
- [9] C. Kobayashi, T.O. Fontanive, B.G, Enzweiler, L.R. de Bona,T. Massoni,M.A. Apel, A.T.Henriques, M.F. Richter, P. Ardenghi, E.S. Suyenaga. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats, *Pharm Biol*.49(3) (2011) 306-13.
- [10] N.M Gomes, C.M. Rezende, S.P. Fontes, M.E. Matheus, A.C. Pinto, P.D. Fernandes, Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory

activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. J. Ethnopharmacol. 128 (2010) 177–183.

[11] E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, V.F. Veiga-Júnior, C.V. Nakamura, Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: a comparative study. *Planta Med*, 79(11) (2013) 952-8.

[12] A.O. Santos, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*, *J Ethnopharm* 120 (2008) 204–208.

[13] A.O. Santos, M.A. Costa, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, V.F. Veiga-Jr, M.M.S. Lima, C.V. Nakamura, *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice, *Exp. Parasitol.* 129 (2011) 145-151.

[14] S. Cheenpracha, O. Yodsaoue, C. Karalai, C. Ponglimanont, S. Subhadhirasaku, S. Tewtrakul, A. Kanjana-Opas, Potential antiallergic entkaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*, *Phytochemistry*, 67 (2006) 2630-2634.

[15] Y. Zhang, J. Liu, W. Jia, A. Zhao, T. Li, Distinct immunosuppressive effect by *Isodon serra* extracts, *Int Immunopharmacol.* 5(13-14) (2005) 1957-65.

[16] J.J. Liu, R.W. Huang, D.J. Lin, X.Y. Wu, J. Peng, X.L. Pan, Q. Lin, M. Hou, M.H. Zhang, F. Chen, Antiproliferation effects of oridonin on HPB-ALL cells and its mechanisms of action, *Am J Hematol.* 81(2) (2006) 86-94.

[17] G. Fucina, L.W. Rocha, G.F. da Silva, S.M. Hoepers SM, F.P. Ferreira, T. Guaratini, V. Cechine Filho, R.M. Lucinda-Silva, N.L. Quintão, T.M. Bresolin. Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts. *Pharm Biol.* 54(11) (2016) 2465-2474.

[18] M.R. Moreira, A.B. Souza, S. Soares, T.C. Bianchi, D. de Souza Eugênio, D.C. Lemes, C.H. Martins, T. da Silva Moraes, D.C. Tavares, N.H. Ferreira, S.R. Ambrósio, R.C. Veneziani. ent-Kaurenoic acid-rich extract from

Mikaniaglomerata: *In vitro* activity against bacteria responsible for dental caries, *Fitoterapia*.112 (2016) 211-6.

[19] R. Batista, J.L Humberto, E. Chiari, A.B. de Oliveira, A.B, Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(1) (2007) 381–391.

[20] E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, V.F. Veiga, A.C. Pinto, C.V. Nakamura, Terpenes from *copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 55 (2012) 2994–3001.

[21] A.O. dos Santos, E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias-Filho, V.F. da Veiga-Junior, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of diterpene acids in *copaíba* oil, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (2012) 59–64, 2012.

[22] S.S. Mizokami, N.S. Arakawa, S. R.Ambrosio, A.C. Zarpelon, R. Casagrande, T.M. Cunha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, W.A. Verri, Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: effect on cytokine production and activation of the no-cyclicgmp-protein kinase g-atp-sensitive potassium channel signaling pathway, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 896–904.

[23] E.S. Barrias, L.C. Reignault, W. de Souza, T.M.U. Carvalho, Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages, *PLoS ONE*, vol. 5 (2010) 1.

[24] S.R.M Lima, V.F. Veiga Junior, H.B. Christo, A.C. Pinto, P.D. Fernandes, *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions, *Phytother Res* 17(2003)1048–1053.

[25] B. Basso, Modulation of immune response in experimental Chagas disease, *World J Exp Med* 3(1) (2013) 10.

- [26] F.S. Vargas, P.D.O. de Almeida, E.S. Aranha, A.P.A. Boleti, Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins, *Molecules*, 20 (2015) 6194-6210.
- [27] J.A. Macri, S.S. da Silva, M.M. Miranda, N.W. Kawakami, S.R. Ambrósio, W.A. Verri Jr, R. Cecchini, I. Conchon-Costa, N.S. Arakawa, W.R. Pavanelli, Immunomodulatory and antioxidant properties of kaurenoic acid on macrophages of BALB/c *in vitro*, *Amer J Immun* 10(4) (2014) 183-188.
- [28] K.H. Kim, J.W. Han, S. Jung, B.J. Park, C.W. Hang, M. Joo. Kaurenoic acid activates TGF- β signaling, *Phytomedicine* 32 (2017) 8-14.
- [29] F.O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, M. Locati, Macrophage activation and polarization, *Front Bioscience* 13 (2008) 453-461.
- [30] V.F. Veiga Júnior, E.C. Rosas, M.V. Carvalho, M.G.M.O. Henriques, Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearenses* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparative study, *J Ethnopharm* 112 (2007) 248-254.
- [31] R. Diaz-Viciedo, S. Hortelano, N. Giron, J.M. Masso, B. Rodriguez, A. Villar, B.L. Heras, Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 369 (2008) 761–766.
- [32] R.J. Choi, E.M. Shina, H.A. Jung, J.S. Choi, Y.S. Kim, Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages, *Phytomedicine* 18(8-9) (2011) 677-682.
- [33] B.M. Babior. The respiratory burst of phagocytes, *J. Clin. Invest* 73 (1984) 599-601.

[34] C.N. Paiva, D.F. Feijó, F.F. Dutra, V.C. Carneiro, G.B. Freitas, L.S. Alves, J. Mesquita, G.B. Fortes, R.T. Figueiredo, H.S.P. Souza, J.L. Vieira, M.T. Bozza, Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *J Clin Invest* 122(7) (2012) 2531–2542.

[35] F.A. Wagener, H.D. Volk, D. Willis, N.G. Abraham, M.P. Soares, G. Adema, C.G. Figdor, Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*, 55 (2003) 551-71.

[36] M.S. Cardoso, J.L Reis-Cunha, D.C. Bartholomeu, Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection, *Front.Immunol.*6 (2016) 659.

[37] J.H. Lyu, G.S. Lee, K.H. Kim, H.W. Kim, S.I. Cho, S.I. Jeong, H.J. Kim, Y.S. Ju, H.K. Kim, R.T. Sadikot, J.W. Christman, S.R. Oh, H.K Lee, K.S. Ahn, M.J. Joo, Ent-kaur-16-en- 19-oic acid, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2, *Ethnopharmacol.* 137 (2011) 1442–1449.

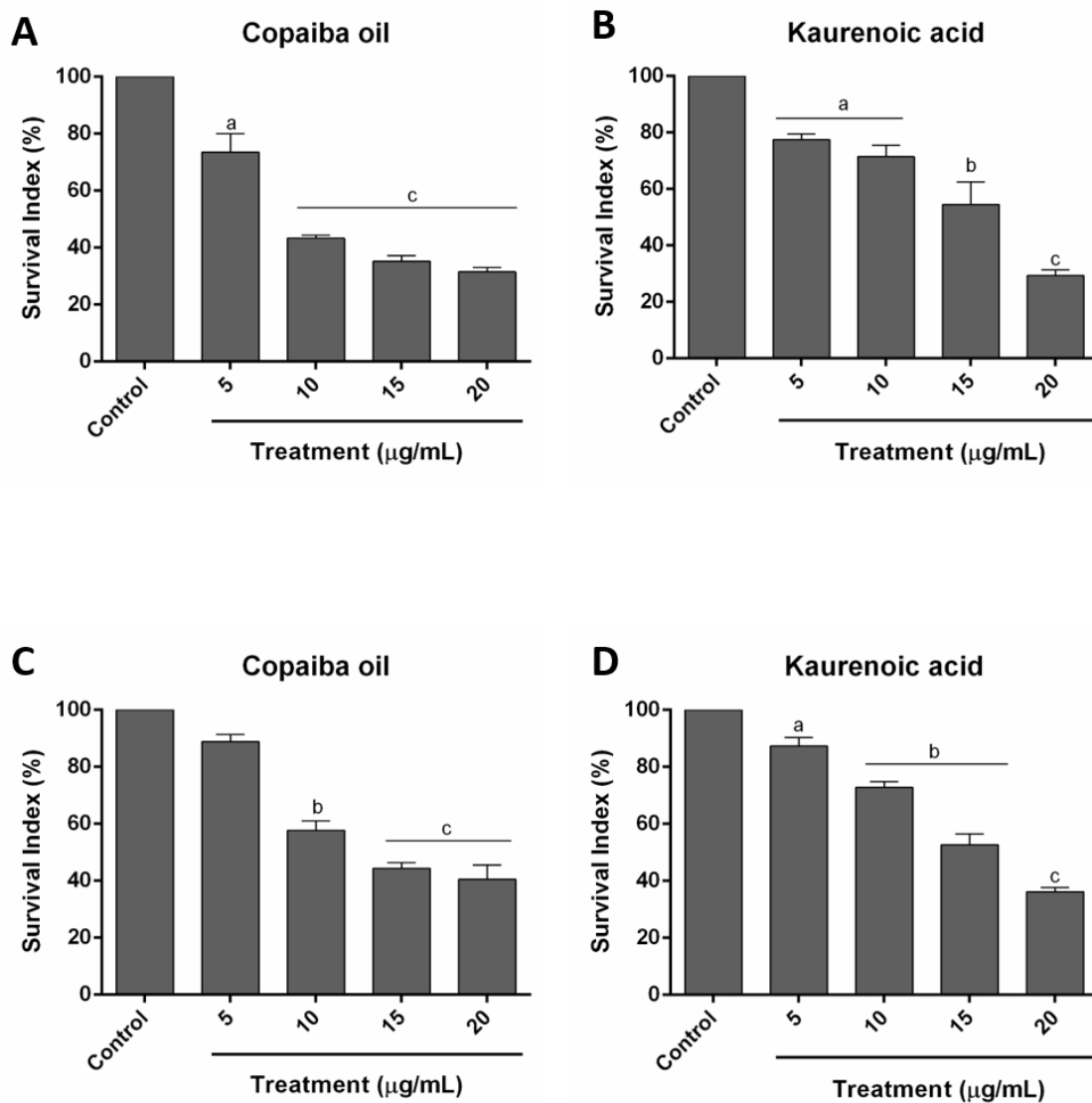


Fig. 1. Copaiba oil and kaurenoic acid effect on *T. cruzi*-infected peritoneal macrophages and HeLa cells. Infected cells were treated with increasing concentrations of kaurenoic acid and copaiba oil (5, 10, 15, and 20 $\mu\text{g/mL}$) or medium alone (Control) for 48h to determine the parasite survival index in peritoneal macrophage (A and B), HeLa cells (C and D). Amastigote number and infected cell quantification was carried out under a light microscope and the values used to calculate the index. Data represent three independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$.

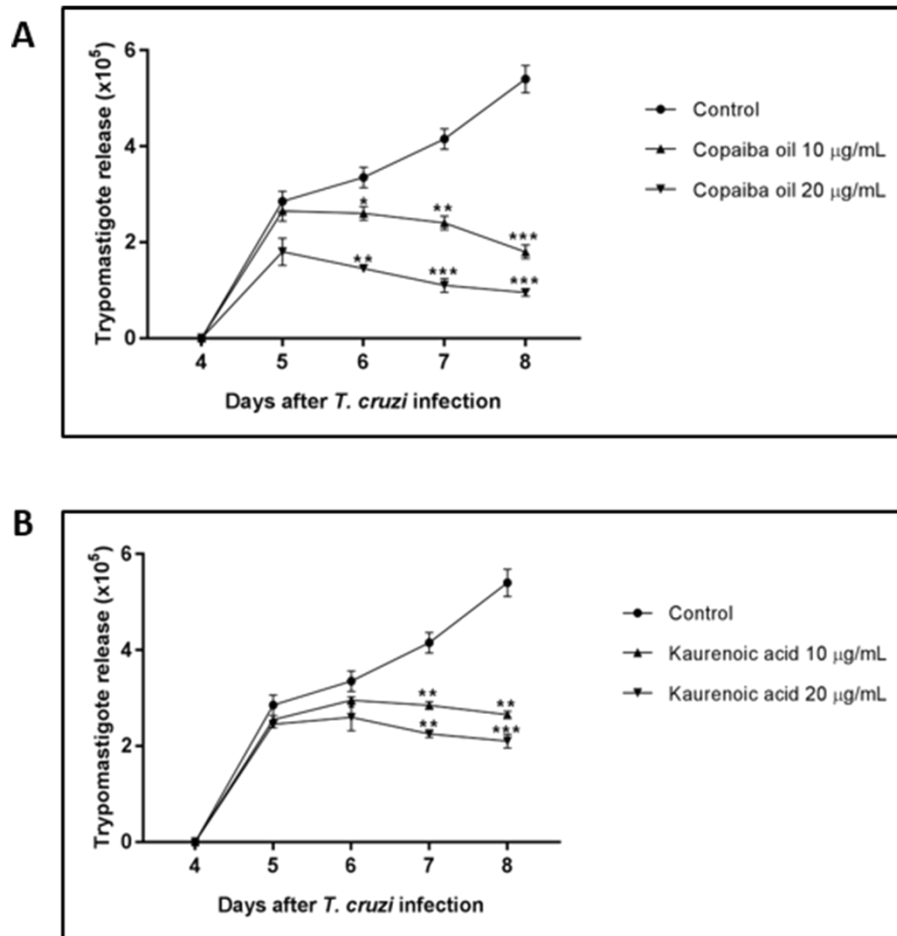


Fig. 2. Effect of copaiba oil and kaurenoic acid upon trypomastigote release in treated *T. cruzi*-infected macrophages. *T. cruzi*-infected macrophages were treated daily with 10 and 20 µg/mL of copaiba oil (A), kaurenoic acid (B) or medium alone (Control). After 4 days of treatment, trypomastigotes release to supernatants was counted until day 8 after infection. Results are the mean \pm standard error for duplicate determinations and are representative of two independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

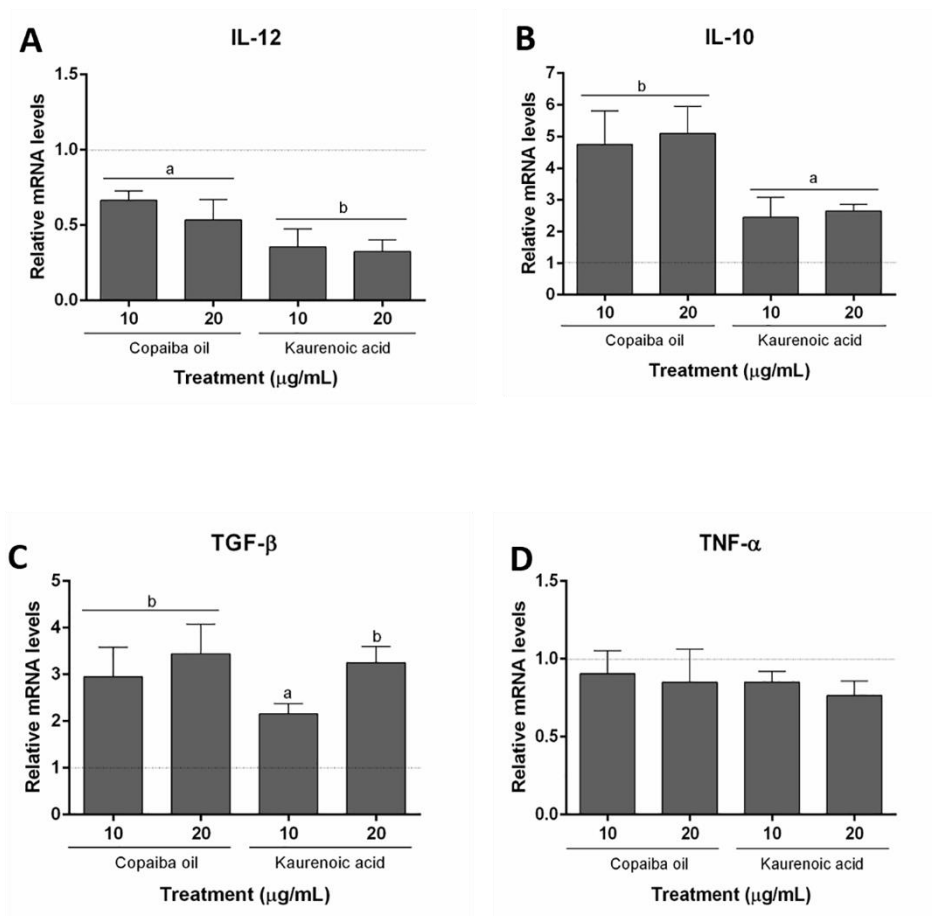


Fig. 3. The effect of treatment of *T. cruzi*-infected macrophages with copaiba oil and kaurenoic acid on IL-12, IL-10, TGF- β and TNF- α expression levels. Infected macrophages were treated with 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of copaiba oil, kaurenoic acid or medium alone (Control) for 48h. Results are presented as the relative gene expression of IL-12 (A), IL-10 (B), TGF- β (C) and TNF- α (D) related to the control (dashed line). Results are the mean \pm standard error for duplicate determinations and are representative of three independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

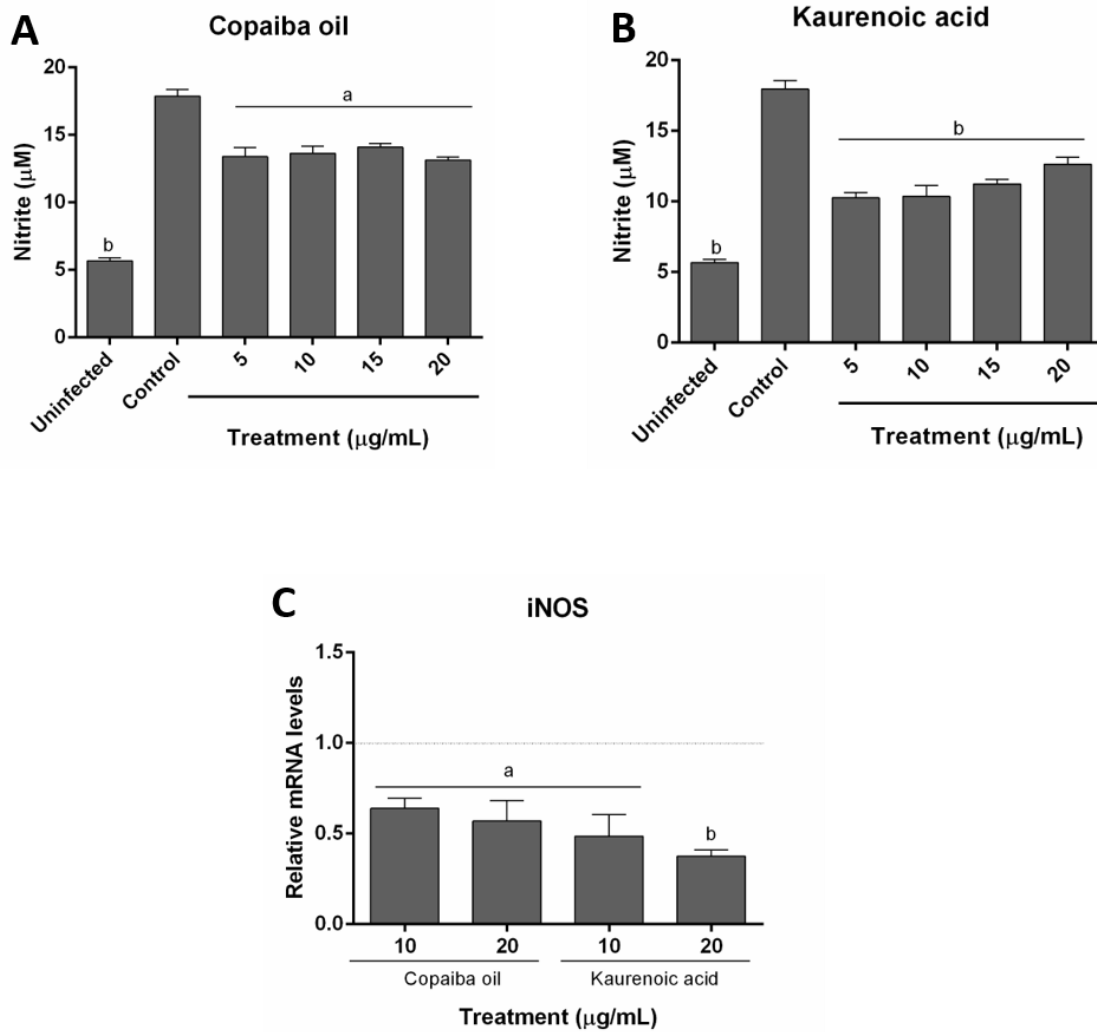


Fig. 4. Copaiba oil and kaurenoic acid treatments decrease nitrite production and iNOS expression levels in *T. cruzi*-infected peritoneal macrophages. and infected cells were treated with increasing concentrations (5, 10, 15, and 20 $\mu\text{g/mL}$) of copaiba oil (A), kaurenoic acid (B) or medium alone (Control) for 48h. Uninfected represents non-infected and non-treated macrophages. Nitrite levels in supernatant were measured by Griess reaction and to determine iNOS gene expression, relative gene expression related to the control, dashed line, is presented (C). Results are the mean \pm standard error for duplicate determinations and are representative of three independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$.

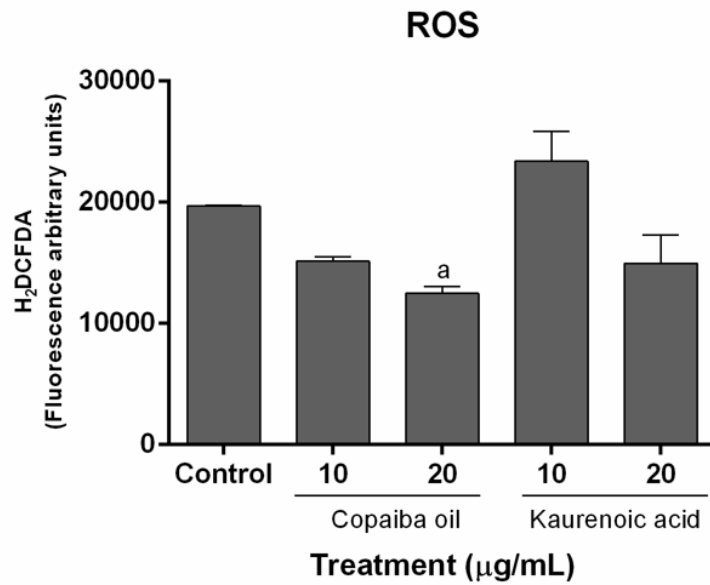


Fig. 5. Measurement of ROS production after treatment of *T. cruzi*-infected macrophages with copaiba oil and kaurenoic acid. Infected-cells were treated with 10 and 20 µg/mL of copaiba oil or kaurenoic acid or medium alone (Control) for 48h and analyzed in fluorometer to H₂DCFDA probe. Results are the mean ± standard error for duplicate determinations and are representative of three independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, ^ap < 0.05.

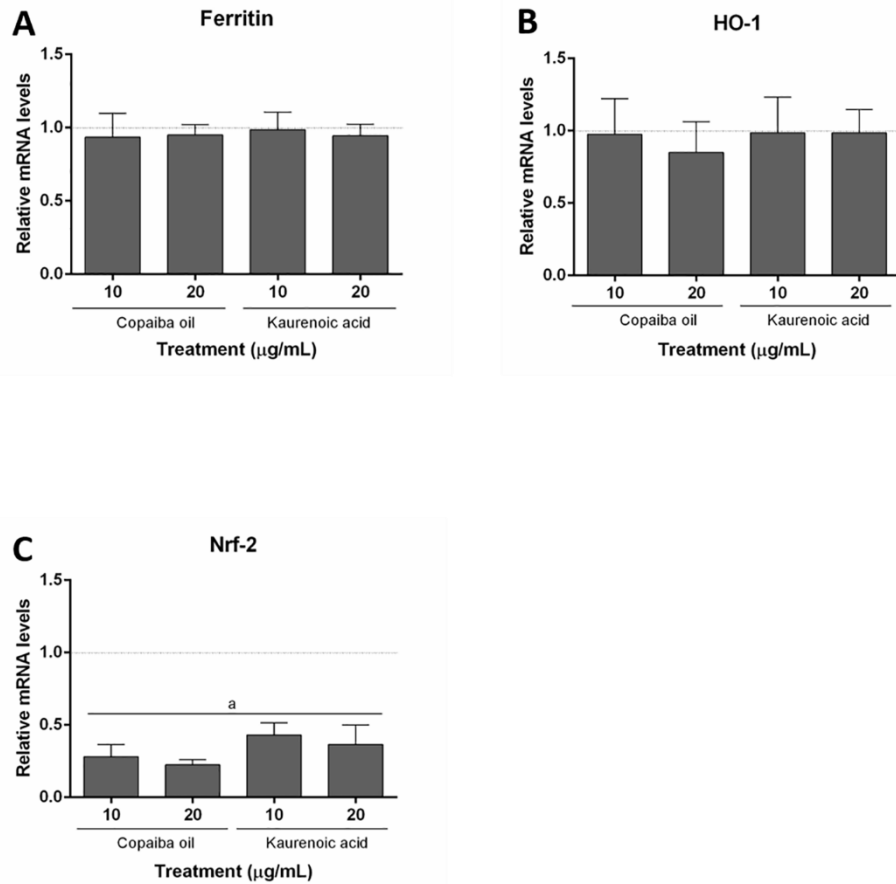


Fig. 6. HO-1, Ferritin and Nrf-2 expression levels after treatment of *T. cruzi*-infected macrophages with copaiba oil and kaurenoic acid. Infected-cells were treated with 10 and 20 µg/mL of copaiba oil or kaurenoic acid or medium alone (Control) for 48h. Results are relative gene expression of Ferritin (A), HO-1 (B) and Nrf-2 gene (C) related to control (dashed line). Results are the mean ± standard error for duplicate determinations and are representative of three independent experiments. Significant differences were observed between the treatments and infected cells cultured in medium alone, ^ap < 0.05.

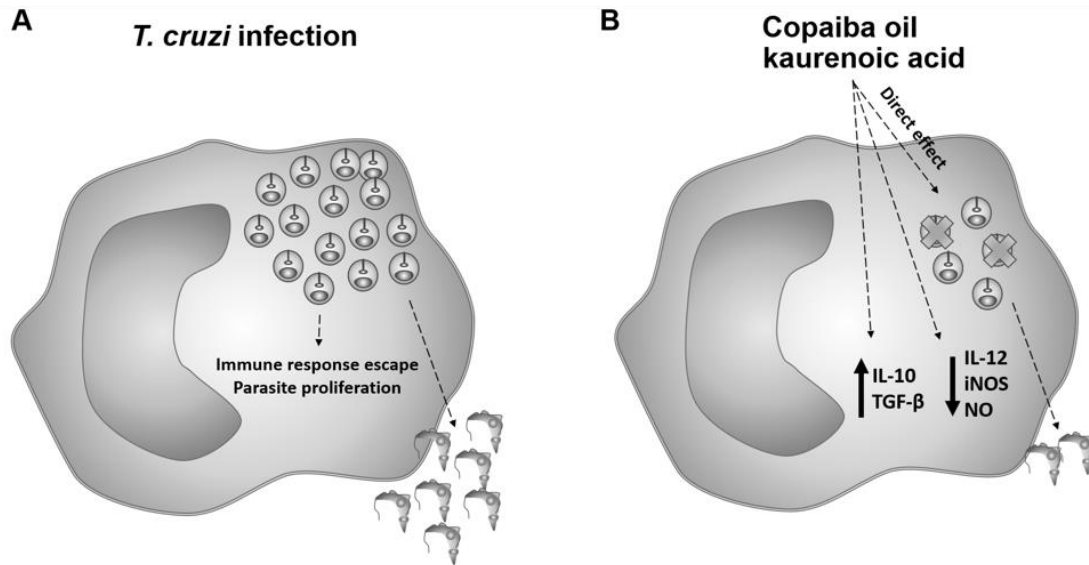


Fig. 7. Scheme showing the effect of copaiba oil and kaurenoic acid treatment on *T. cruzi*-infected macrophages immunodulation and parasite elimination mechanisms. After *T. cruzi* infection, parasite evade from immune response and proliferate although macrophages activate NO and ROS pathways (A). The treatments of infected macrophages with copaiba oil and kaurenoic acid upregulate the gene expression of IL-10 and TGF- β and consequently, downregulate the expression of IL-12, iNOS and decrease NO production. Even though this fact happened the parasite survival index is lower than control group, suggesting a direct action of these two substances on the amastigote forms (B), subsequently release of less trypomastigote form of *T. cruzi*.

Table 1

Sequence of primers used in real time-PCR

Primer	Forward (3')	Reverse (5')
TNF- α	tgtgctgacagctttcaaca	cttgatggatgcatgaga
IL-12	agcaccagcttcttcatcagg	gcgctggattcgaacaag
IL-10	tgacatactgctaaccg	ggatcattccgataaggct
TGF- β	gctgaaccaaggagacggaat	gctgatcccgttgattcca
iNOS	cgaaacgcttcaactcca	tgacctatattgctgtggct
Nrf-2	tcacacgagatgagcttagggcaa	tacagtctggcggcgactttat
HO-1	cccaaaactggcctgtaaaa	cgtggtcagcaacatggat
Ferritin	ttccaggatgtgcagaagcc	aagaggcctgattcaggctc
β -actin	agctgcgttttacaccctt	aagccatgccaatggtgtct

ANEXO 2

Copaiba oil and kaurenoic acid associated with benznidazole eliminate *Trypanosoma cruzi* by autophagy-like mechanisms

Danielle Kian¹, César Armando Contreras Lancheros², Nilton Syogo Arakawa³, Valdir Florêncio Veiga-Júnior⁴, Celso Vataru Nakamura², Phileno Pinge-Filho⁵, Ivete Conchon-Costa⁵, Wander Rogério Pavanelli⁵, Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹, Lucy Megumi Yamauchi^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. ² Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, ³ Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. ⁴ Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. ⁵ Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil,

*Corresponding author (lionilmy@uel.br)

ABSTRACT

Search for new antiprotozoal substances and strategies such as combination drugs may be promising ways to solve problems related to the treatment of Chagas disease, which include side effects, variable efficacy and emerging resistance. Therefore, we have shown that natural products can emerge as an alternative to the therapy of this disease, such as copaiba oil and kaurenoic acid that were able to eliminate *Trypanosoma cruzi*. When associated with benznidazole, copaiba oil showed synergistic effect in all forms of the parasite, while for kaurenoic acid and there was synergism for epimastigotes and amastigote and additive effect to trypomastigotes, showing no toxicity to mammalian cells. The compounds and their combinations caused functional and structural changes in parasite as increased production of reactive species and alterations in membrane and organelles. In this way, we can see that both the copaiba oil and kaurenoic acid isolated as in association with benznidazole are capable of killing *T. cruzi* and, according to the alterations caused in the parasite, we believe that the mechanism of action is related to an autophagy-like process.

Keywords: copaiba oil, kaurenoic acid, benznidazole, drug combination

1. INTRODUCTION

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is one of the most relevant public health problems in Latin America. The available therapy for elimination of the parasite in the acute phase relies only on nifurtimox and benznidazole (URBINA, 2010; ARCE-FONSECA et al., 2015), which present variable efficacy and toxicity to the patient. Although several studies in search of a new drug, there has been little progress, and to date there is no effective treatment for patients in chronic phase (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

For a drug to be considered ideal by the World Health Organization were established some requirements as parasitological cure of acute and chronic

cases, few side effects and no teratogenic, administration in a few doses, low cost to the patient and others (WHO, 2015). Therefore, the search for new therapies has been studied using natural products and strategies such as molecular modification of existing compounds, drug combination, synthesis of new molecules and drug repositioning (TEMPONE et al, 2011).

Studies with natural products, which may have animal or plant origin, comprise a promising source of new drugs that used naturally or synthetically modified, contribute to the treatment of many diseases (SCOTTI et al., 2016). For *T. cruzi*, wide variety of isolated substances showing activity against this parasite mainly plant-derived alkaloids, terpenes and phenolics (KAISER et al., 2003; IZUMI et al., 2011).

A natural substance widespread in popular culture and has been studied due to its medicinal properties is the copaiba oil, an oleoresin extracted from trees of *Copaifera* genus, present in the tropical regions of American and African continents. In addition to the anti-inflammatory and analgesic properties described (CARVALHO et al., 2005; VEIGA-JUNIOR et al., 2006), oil also possesses microbicidal activity (ZIMMERMAM-FRANCO et al., 2013; OTAGUIRI et al. 2016; GUIMARÃES et al., 2016); different species of *Copaifera* oil have already shown activity against *Leishmania amazonensis* (SANTOS et al., 2008; SANTOS et al., 2011) and *T. cruzi* (IZUMI et al., 2013).

The chemical composition of copaiba oil is a variable mixture of terpenes, among them, kaurenoic acid (VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002). As well as the oil, studies have shown this compound had also anti-inflammatory properties (FUCINA et al., 2016), besides acting as anti-allergic (CHEENPRACHA et al., 2006) and antimicrobial eliminating forms of *L. amazonensis* (SANTOS et al., 2013; MIRANDA et al., 2015) and *T. cruzi* (BATISTA et al. 2007; IZUMI et al. 2012).

Drug combination strategy is an interesting way to promote effectiveness of drugs with different mechanisms of action, which may decrease the individual dosages required for the treatment of the diseases (BERMUDEZ et al., 2016). In the case of Chagas disease, studies generally associate new compounds with benznidazole, in order to decrease its side effects. Synergistic effects have been observed in association with anti-inflammatory drugs such as aspirin (LÓPEZ MUÑOZ et al., 2010), antifungals such as ketoconazole or

posaconazole (ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011) and antidepressants such as clomipramine (GARCIA et al., 2016; STRAUSS et al., 2013).

Thus, a promising alternative for the treatment of Chagas disease would be the combination of natural substances with standard drug benznidazole. Based on this possibility, COGO et al. (2012) analyzed the trypanocidal activity of guaianolide obtained from plant *Tanacetum parthenium*. This sesquiterpene was effective against the three forms of *T. cruzi* at low micromolar concentrations that did not affect mammalian cell viability. The combinational effect with benznidazole revealed the presence of synergistic effect against epimastigotes and marginal additive effect against the trypomastigotes forms. These results were similar to those already obtained by PELIZZARO-ROCHA et al. (2010), who tested the parthenolide obtained from *Tanacetum vulgare* also on the forms of *T. cruzi* and the IC₅₀ of benznidazole was reduced 23-fold when combined with the natural compound, showing that these associations are able to eliminate the parasite with lower drug concentrations.

So, although the activities of copaiba oil and kaurenoic acid on *T. cruzi* have already been described, the association of these compounds with benznidazole has not yet been determined. This strategy combination therapy can reduce the toxic doses of benznidazole, would be great advance in the control of this disease. Therefore, here we investigated the trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid, isolated and in combination with benznidazole, besides evaluating the main alterations in the parasite induced by the treatments and the possible mechanism of action involved in the death of *T. cruzi*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Natural Compounds and benznidazole

Oleoresin was provided by Valdir F. Veiga-Júnior (Universidade Federal do Amazonas, Brazil), from *Copaifera martii* collected Tapará, Pará and kaurenoic acid was obtained from dried roots of *Sphagneticola trilobata* provided by Nilton S. Arakawa (Universidade Estadual de Londrina, Brazil). The DMSO used to

prepare copaiba oil, kaurenoic acid and benznidazole (Laboratório Central de Medicamentos, Pernambuco, Brazil) stock solution did not exceed 1% in all cultures.

2.2 Cell cultures

LLCMK₂ cells were cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 100 units of penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate (10% FBS-RPMI) in an atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

2.3 Parasite *T. cruzi*

Epimastigote forms of *T. cruzi* strain Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) were maintained in LIT medium (CAMARGO, 1964) supplemented with 10% FBS at 28 °C. To obtain the amastigote and trypomastigote forms, subconfluent cultures of LLCMK₂ maintained in 10% FBS-RPMI were infected with 5x10⁶ trypomastigotes. After five days, the released parasites were collected from cell supernatants.

2.4 Drug Combination Assay

The effect of combination of copaiba oil and kaurenoic acid with benznidazole on three forms of *T. cruzi* and LLCMK₂ cells was performed by checkerboard methodology to obtain the combination index (CI), proposed by CHOU (2006) and reviewed by ZHAO et al. (2010). Briefly, epimastigotes (1x10⁶ parasites/mL) were resuspended in LIT in the presence of different concentrations of both drugs and counted after 96 h incubation at 28 °C. For the trypomastigote, cells were collected (1x10⁷ parasites/mL) and exposed to different concentrations of each drug in combination and after 24 h the parasites were analyzed for viability. To amastigotes forms, LLCMK₂ cells (2x10⁵) were infected with trypomastigotes (1x10⁶) and after 4 h of infection, the culture was treated with different concentrations of the compounds and incubated for 96 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were stained with Giemsa and the phagocytic index of infection was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the

mean number of parasites per infected cell. To verify cytotoxicity, LLCMK₂ cells were incubated with different concentrations of the compounds and after 96 h cell viability was quantified using the MTT method. The IC₅₀ for each association was determined and the data were calculated and expressed as combination Index $CI = (IC_{50 \text{ compound A associated}}/IC_{50 \text{ compound A alone}}) + (IC_{50 \text{ compound B associated}}/IC_{50 \text{ compound B alone}})$. CI values lower, equal and greater than one indicate, respectively, synergistic, additive and antagonistic profile of association tested.

2.5 Electron Microscopy

Transmission electron microscopy was performed with epimastigote forms (1×10^6 parasites/mL) treated with the compounds alone and in combination with benznidazole at concentrations that corresponded to the IC₅₀. After incubation, they were harvested, washed twice in PBS, and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 24 h. Then samples were post fixed in a solution of 1% OsO₄, 0.8% potassium ferrocyanide, and 10 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h. After this period, the parasites were dehydrated in increasing concentrations of acetone and soaked in Epon resin for 72 h at 60 °C. Ultrafine sections were obtained with an ultramicrotome (Leica), collected in grids and stained with 5% uranyl acetate and lead citrate for further observation under transmission electron microscopy Jeol JEM 1400. The parasites were analyzed and compared with controls without any treatment.

2.6 Fluorometric Assays

Epimastigotes (1×10^6 cells/mL) were cultured in 24-well plates and treated with copaiba oil and kaurenoic acid alone and in combination with benznidazole at concentrations corresponding to the IC₅₀ for each treatment. As a control, culture was used in the absence of the compounds. Cells were incubated for 96 h at 28 °C and after washing with PBS the mechanism of action of the compounds was evaluated in the production assays of reactive species of oxygen and nitric oxide, lipid inclusions, mitochondrial membrane potential, lipid

peroxidation and membrane cell integrity. In all tests, the fluorescence intensity was read in Victor X3 fluorometer Perkin-Elmer.

2.6.1 Reactive Oxygen Species (ROS)

For the detection of ROS production, the labeling was done with 10 μM H_2DCFDA for 45 min and then read with excitation of 488 nm and emission of 530 nm. The presence of ROS was evaluated by the fluorescence caused by the reduction of the dye generating the fluorescence compound 2', 7'-dichlorofluorescein (DFA) (SHUKLA et al., 2012).

2.6.2 Nitric Oxide (NO)

For the detection of NO, cells were labeled with 1 μM diaminofluorescein diacetate (DAF-2-DA) for 30 min, after washing and resuspended in PBS and incubated again for 15 min. The reading was performed with excitation of 495 nm and emission of 515 nm. Fluorescence occurs due to deacetylation of DAF-FM diacetate by intracellular esterases when it reacts with NO (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.6.3 Lipid inclusions

To evaluate the presence of lipid inclusions, the parasites were incubated in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ Nile red for 30 min and the fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission of 535 nm. Nile red dye fluoresces strongly in the presence of triacylglycerols, cholesterol or cholesterol esters (SCARIOT et al., 2017).

2.6.4 Mitochondrial-membrane potential

To evaluate the mitochondrial membrane potential the cells were incubated with 0.25 μM Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) for 30 min after washing and fluorescence determined at 540 nm excitation and 595 nm emission. As a control 2.5 μM of Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) was

used. TMRE is a positively charged red-orange dye, therefore accumulates in active mitochondria; while CCCP eliminates mitochondrial potential by preventing staining (SALOMÃO et al., 2013).

2.6.5 Lipid peroxidation

For lipid peroxidation assay, the parasites were labeled with 50 μ M diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) for 15 min and fluorescence determined with excitation spectrum of 355 nm and emission of 460 nm. DPPP reacted with organic hydroperoxides and hydrogen peroxide to give DPPP oxide, which is fluorescent (OKIMOTO et al., 2000).

2.6.6 Cell Membrane Integrity Assay

For the cell membrane integrity assay, the parasites were incubated with 0.2 μ g/mL propidium iodide (PI) for 10 min. Digitonin (40.0 μ M), a natural surfactant, was used as a positive control for the loss of cell membrane integrity. The reading was performed with excitation of 485 nm and emission of 580 nm. PI has affinity for nucleic acid, which easily penetrates the cell when the plasma membrane is compromised (GOULD et al., 2008).

2.7 Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. The results were considered significant when $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 computer software application (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

Copaiba oil and kaurenoic acid combined with benznidazole show synergistic and additive effects in *T. cruzi*

Both copaiba oil and kaurenoic acid showed activity against all forms of *T. cruzi*. In addition, the combination of copaiba oil with benznidazole has a strong synergism against the three forms of parasite, with FICI<1. In this situation, for the treatment of epimastigote the IC₅₀ of copaiba oil was reduced 5-fold and benznidazole 6-fold after the combination. Whereas in the combination of kaurenoic acid with benznidazole the synergistic effect was seen only on epimastigote and amastigote forms, and for trypomastigote the effect was additive. After drug combination, the IC₅₀ for epimastigotes was reduced by about 3-fold and 2-fold for kaurenoic acid and benznidazole, respectively. In addition, all associations showed FICI>1 for LLCMK₂, indicating antagonistic effect on these cells (Table 1).

Copaiba oil, kaurenoic acid and its combinations with benznidazole cause ultra-structural changes in epimastigote forms of *T. cruzi*

The untreated epimastigote presented normal organelle ultrastructure, such as the nucleus prominent, a ramified mitochondrion and kinetoplast (Fig. 1A), while the parasites treated exhibited an ultrastructure changed, as treatment with benznidazole, in which there was the formation membranous structures and fragmentation of the organelles (Fig. 1B). Copaiba oil caused kinetoplast swelling, disorganization of kDNA with less electron-dense material and vacuolization in the cytoplasm (Fig. 1C), whereas kaurenoic acid led to the formation of internal membranes, vacuolization, presence of lipid inclusions, and digestion of organelles (Fig. 1E). However, when these natural compounds were associated with benznidazole, they led to the formation of internal membranes with profiles of reticulum endoplasmic surrounding organelles, indicative of autophagic vacuoles and kinetoplast swelling (Fig. 1 D, F).

Copaiba oil, kaurenoic acid and its combinations with benznidazole have different mechanisms of action in *T. cruzi*

Fluorimetric tests evaluating the mechanisms of action of the compounds showed that benznidazole alone caused an increase in the production of ROS and NO, in addition to loss of cellular membrane integrity. The trials also

demonstrated that the activity of the copaiba oil in parasite also is related to NO production, whereas the kaurenoic acid, besides stimulating the production of this molecule, would also act in the formation of lipidic corpuscles, altering the mitochondrial potential and the integrity of the cell membrane. However, the combination of these compounds with benznidazole showed increased NO production and lipid peroxidation. All the tests presented a significant difference when compared to the control without treatment (Fig. 2).

4. DISCUSSION

Benznidazole is the standard drug for treating Chagas disease, however, therapy has some limitations as an occurrence of various side effects and not successful in the cure of most of the chronic patients. Drug combination is an interesting and current strategy to treat diseases with many benefits, such as increases the efficacy using lower dosage, which leads to lower toxicity and hindering the selection of resistant strains. Therefore, our results showed that copaiba oil and kaurenoic acid in combination with benznidazole have a synergistic and additive effect against *T. cruzi* without presenting cytotoxicity in mammalian cells. In addition, treatment with these compounds alone or in combination are capable of causing various functional and structural changes in the parasite that are responsible for its elimination.

The mechanism of action of benznidazole is related to the reduction of the nitro group of the drug and consequent formation of various free radicals that induce oxidative stress and electrophilic metabolites. They covalently bond to DNA, proteins, and lipids, and induce the death of parasite (URBINA, 2010). In the work, epimastigotes treated with the drug showed increase in NO and ROS production, which may be associated with mitochondrial damage or inhibition of the detoxification system of parasite, and the production of these reactive species could be affecting the integrity of the membrane, besides to act on the fragmentation of organelles, changes that could be observed by electron microscopy.

Combination therapy with new drugs has been shown to be an important approach against *T. cruzi*, but one question that arises is the mechanism by which this combination is synergistic. Studies have demonstrated that

compounds with actuation of many targets or cell pathways can cooperate to enhance the final effect observed (BAHIA et al., 2014). The mechanism of action of benznidazole is well established, however, the action of copaiba oil and kaurenoic acid has not been elucidated.

Interestingly, we found that these natural compounds in combination with benznidazole increase NO production, induce oxidative damage to epimastigotes reflected by lipid peroxidation. Free radicals are toxic to *T. cruzi* and can interact with important macromolecules of the parasite, attacking cell membranes and trigger this process of lipoperoxidation, which is characterized by causing changes in the physical and chemical properties of these structures, resulting in changes in permeability, formation of cytotoxic products such as malondialdehyde and release of organelle content may thus be a cause or consequence of autophagy and apoptosis process (SCHERZ-SHOVAL, ELAZAR, 2007; PELIZARRO-ROCHA et al., 2011).

As for treatments with natural products alone, there was also an increase in NO. In this case, production of this molecule might be associated with mitochondrial damage and lead to loss of integrity of the membrane and organelles of fragmentation, which could also be observed in the treatment of parasites with kaurenoic acid.

IZUMI et al. (2013) showed copaiba oil of different species of *Copaifera* had activity against *T. cruzi*, in special against replicative forms. *C. martii* and *C. officinalis* oleoresins caused twofold increase in the lipidic peroxidation, measured in terms of malondialdehyde, in addition to increased cell-membrane permeability and changed the mitochondrial potential showed by flow cytometry. However, these changes could not be observed in our work when epimastigotes were treated with *C. martii* oil, which may have occurred due to the different methodologies used for analysis. The same research group also evaluated the changes caused by kaurenoic acid in *T. cruzi* (IZUMI et al., 2012), showing loss of membrane integrity in epimastigotes, which could also be observed in our analyzes, in addition to other alterations.

In this work, the microscopy analysis for all treatments showed almost no cells with leakage of cellular content, what could exclude the possibility that death occurred through classic necrosis, which is well characterized by an increase in cell volume, plasma membrane rupture and subsequent loss of

intracellular content. However, interestingly, the analyzes revealed signs of autophagy, characterized by the appearance of endoplasmic reticulum profiles involving organelles, formation of membranous structures in the cytosol, cytoplasmic vacuolization, organelle digestion, swelling of the kinetoplast and presence of lipidic bodies, which are indicative of this the cell death process (MENNA-BARRETO et al., 2009).

Cell death is well characterized including apoptosis, autophagy and necrosis (GUIMARÃES, LINDEN, 2004). Autophagy is essential to maintain the homeostasis of an organism and involves the formation of a double membrane structure called autophagous vacuole to sequester cytoplasmic structures. This structure fuses with the lysosome forming an autophagolysosome for the degradation and recycling of macromolecules (XIE, KLIONSKY, 2007). However, when autophagic capacity fails to establish homeostatic balance, the cell can activate different mechanisms of death. Another important feature is that this pathway can also induce apoptosis, since cells that are not able to cope with cellular stressors through autophagy can be eliminated by this mechanism (KEMP, 2017).

The origin of the autophagosomal structure is still unknown, suggesting the endoplasmic reticulum and/or Golgi complex as source of this membrane, justifying the presence of profiles of these organelles involving cellular structures during the autophagic process (MARI et al, 2011). In addition, the presence of lipidic corpuscles may also be related to autophagy, since works show mobilization of lipids to these structures and of these to the lysosome during the death process through this pathway (SINGH, CUERVO, 2012).

Thus, we suggest that the death of epimastigote after treatments with natural compounds and combinations with benznidazole would be occurring by mechanisms similar to autophagy, and this is promising for possible future therapeutic approaches because this is a controlled process of death characterized by a lack of inflammatory response in the host.

In conclusion, the study shows that combination of copaiba oil and kaurenoic acid with benznidazole besides the compounds alone are capable of killing *T. cruzi* by autophagy-like pathways. The data are important, since drug combination allows lower concentrations of each compound to be required to kill the parasite, reducing the toxicity of conventional treatment. However, further

studies are needed to elucidate this activity and its mechanism of action, especially *in vivo* models, which may represent a promising strategy for the development of new therapies for Chagas disease.

REFERENCES

Arce-Fonseca, M., Rios-Castro, M., Carrillo-Sánchez, Sdel.C., Martínez-Cruz, M., Rodríguez-Morales, O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Paras Vect*, 8(121): 1-7, 2015.

Astelbauer, F., Walochnik, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 38:118– 124, 2011.

Bahia, M.T., Diniz, L.F., Mosqueira, V.C.F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 23(9), 2014.

Batista, R., Humberto, J.L., Chiarid, E., de Oliveira, A.B. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. *Bioorg Med Chem Lett* 15:381-391, 2007.

Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J.P., Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop*, 156:1-16, 2016.

Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 6: 93–100, 1964.

Carvalho, J.C.T., Cascon, V., Possebon, L.S., Morimoto, M.S.S., Cardoso, L.G.V., Kaplan, M.A.C., Gilbert, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother Res* 19: 946-950, 2005.

Cheenpracha, S., Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasaku, S., Tewtrakul, S., Kanjana-Opas, A. Potential antiallergic ent-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. *Phytochem*, 67:2630-2634, 2006.

Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58(3):621-81, 1984.

Cogo, J., Caleare, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Ferreira, I.C.P., Nakamura, C.V. Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benznidazole. *Phytomed* 20:59– 66, 2012.

Costa, F.B., Albuquerque, S., Vichnewski, W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilioides* with trypanomicidal activity, *Planta Med* 62:557–559, 1996.

Fucina, G., Rocha, L.W., da Silva, G.F., Hoepers, S.M., Ferreira, F.P., Guaratini, T., Cechinel, T.V., Lucinda-Silva, R.M., Quintão, N.L., Bresolin, T.M. Topical anti-inflammatory phytomedicine based on *Sphagneticola trilobata* dried extracts. *Pharm Biol*, 54(11):2465-2474, 2016.

García, M.C., Ponce, N.E., Sanmarco, L.M., Manzo, R.H., Jimenez-Kairuz, A.F., Aoki, M.P. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*, 60:3700 –3708, 2016.

Gould, M.K., Vu, X.L., Seebeck, T., De Koning, H.P. Propidium iodide-based methods for monitoring drug action in the kinetoplastidae: comparison with the Alamar Blue assay. *Anal Biochem* 382: 87-93, 2008.

Guimarães, A.L., Cunha, E.A., Matias, F.O., Garcia, P.G., Danopoulos, P., Swikidisa, R., Pinheiro, V.A., Nogueira, R.J. Antimicrobial activity of copaiba

(*Copaifera officinalis*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in compounding for wound Care. Int J Pharm Compd, 20(1):58-62, 2016.

Guimarães, C., Linden, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem, 271(9):1638-50, 2004.

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, 28: 809–823, 2011.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. J Med Chem, 12: 2994–3001, 2012.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Veiga-Júnior, V.F., Nakamura, C.V. Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: a comparative study. Planta Med, 79(11):952-8, 2013.

Kayser, O., Kiderlen, A.F., Croft, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol Res, 2:55-62, 2003.

Kemp, M.G. Crosstalk between apoptosis and autophagy: environmental genotoxins, infection, and innate Immunity. J Cell Death, 1–6, 2017.

Lazarin-Bidóia, D., Desoti, V.C., Martins, S.C., Ribeiro, F.M., Ud Din, Z., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., de Oliveira Silva, S. Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system. Antimicrob Agents Chemother, 60:890 –903, 2016.

Lopez-Muñoz, R., Fáunderz, M., Klein, S. *Trypanosoma cruzi*: in vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. Exp Parasitol, 167–171, 2010.

Mari, M., Tooze, S.A., Reggiori, F. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *Biol Rep*, 3:25, 2011.

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* 40:157–168, 2009.

Miranda, M.M., Panis, C., da Silva, S.S. Macri, J.A., Kawakami, N.W., Hayashida, T.H., Madeira, T.B., Acquaro, V.R., Nixdorf, S.L., Pizzatti, L., Ambrósio, S.R., Cecchini, R., Arakawa, N.S., Verri, W.A., Conchon, I., Pavanelli, W.R. Kaurenoid acid possesses leishmanicidal activity by Triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO pathway. *Mediators Inflamm*, 2015:392918, 2015.

Okimoto, Y., Watanabe, A., Nikia, E., Yamashita, T., Noguchia, N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Letters* 474:137-140, 2000.

Otaguiri, E.S., Morguette, A., Biasi-Garbin, R.P., Morey, A.T., Lancheros, C., Kian, D., Oliveira, A.G. Jr, Kerbauy, G., Perugini, M., Durán, N., Nakamura, C.V., Veiga Junior, V.F., Nakazato, G., Pinge-Filho, P., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta, S.F. Antibacterial combination of oleoresin from *Copaifera multijuga* Hayne and biogenic silver nanoparticles towards *Streptococcus agalactiae*. *Curr Pharm Biotechnol*, Dec13, 2016.

Pelizzaro-Rocha, K.J., Tiunan, T.S., Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomed*, 18: 36–39, 2010.

Pelizzaro-Rocha, K.J., Veiga-Santos, P., Lazarin-Bidóia, D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Ximenes, V.F., Silva, S.O., Nakamura, C.V. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection* 13,1018e1024, 2011.

Pereira, P.C.M., Navarro, E.C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 19:34, 2013.

Salomão, K., De Santana, N.A., Molina, M.T., De Castro, S.L. Menna-Barreto, R.F.S. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. *BMC Microbiology*, 13:196, 2013.

Santos, A.O., Costa, M.A., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., da Veiga-Júnior, V.F., de Souza Lima, M.M., Nakamura, C.V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp Parasitol*, 129(2):145-51, 2011.

Santos, A.O., Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Veiga-Júnior, V.F., Nakamura, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(1):59-64, 2013.

Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Nakamura, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(3): 277-281, 2008.

Scariot, D.B., Britta, E.A., Moreira, A.L., Falzirolli, H., Silva, C.C., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Nakamura, C.V. Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of Miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. *Front. Microbiol.* 8:255, 2017.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*, 4;26(7):1749-60, 2007.

Scotti, M.T., Scotti, L., Ishikib, H., Ribeiro, F.F., Cruza, R.M.D., Oliveira, M.P., Bezerra, F.J. Natural products as a source for antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Combin Chem High Throug Screen*, 19, 1-17, 2016.

Shukla, A. K., Patra, S., and Dubey, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. *Eur. J. Med. Chem*, 54, 49–58, 2012.

Silva, L.H.P., Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia clin biol*, 20:191-207, 1953.

Singh, R., Cuervo, A.M. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Intern J Cell Biol*, 2012:1-12, 2012.

Strauss, M., Lo Presti, M.S., Bazán, P.C., Baez, A., Fauro, R., Esteves, B., Sanchez Negrete, O., Cremonuzzi, D., Paglini-Oliva, P.A., Rivarola, H.W. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Int*, 62(3):293-9, 2013.

Tempone, A.G., Oliveira, C.M., Berlinck, R.G.S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med*, 77: 572-85, 2011.

Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 115: 55–68, 2010.

Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova*, 25:2 273-286, 2002.

Veiga-Júnior, V.F., Zunino, L., Patitucci, M.L., Pinto, A.C., Calixto, J.B. The inhibition of paw edema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J Pharm Pharmacol*, 58: 1405-1410, 2006.

WHO. Neglected tropical diseases. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/, 2015.

Xie, Z., Klionsky, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9:1102 – 1109, 2007.

Zhao, L., Au, J.L., Wientjes, M.G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Front Biosci* 1: 241–249, 2010.

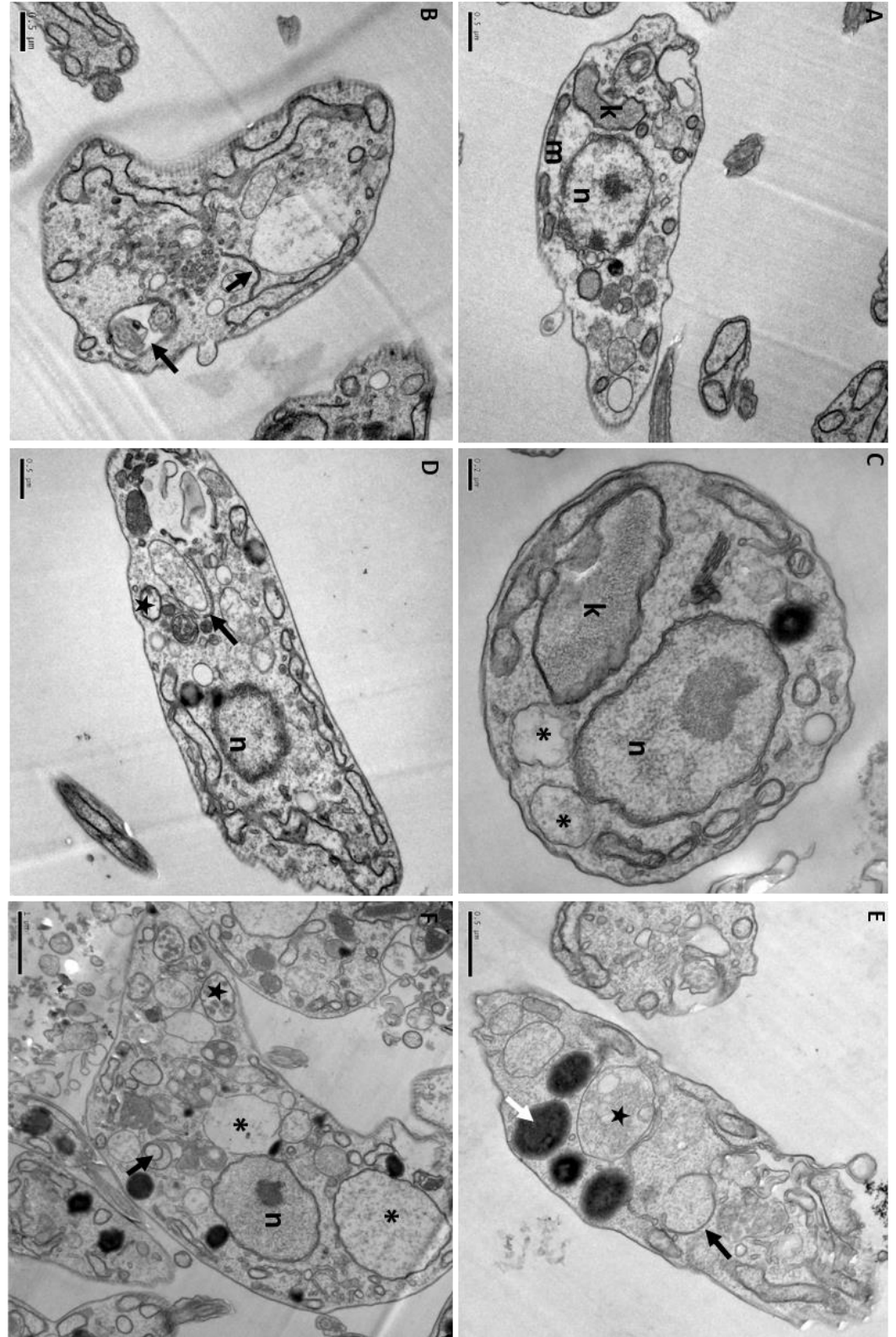
Zimmermam-Franco, D.C., Bolutari, E.B., Polonini, H.C., do Carmo, A.M., Chaves, M., Raposo, N.R. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* oleoresin against dermatophytes. *Molecules*, 11;18(10):12561-70, 2013.

Table 1. Combination profile of copaiba oil and kaurenoic acid with benznidazole for *T. cruzi* and mammalian cells

	Copaiba oil + BZD		Kaurenoic acid + BZD	
	FICI	PROFILE	FICI	PROFILE
Epimastigote	0,377	SYNERGISTIC	0,926	SYNERGISTIC
Trypomastigote	0,399	SYNERGISTIC	1,006	ADDITIVE
Amastigote	0,431	SYNERGISTIC	0,937	SYNERGISTIC
LLCMK ₂	1,438	ANTAGONIST	1,163	ANTAGONIST

Combination index (FICI), values <1 indicate synergism, =1 additivity and >1 antagonism (CHOU, 2006).

Figure 1. Ultrastructural alterations in *T. cruzi* epimastigotes treated with copaiba oil, kaurenoic acid and their combination with benznidazole. Control parasites exhibited normal morphology (A), whereas treated epimastigotes with benznidazole (B), copaiba oil (C), copaiba oil with benznidazole (D), kaurenoic acid (E) and kaurenoic acid with benznidazole (F) exhibit alterations as vacuoles (black asterisk), membranous structures (black arrow), lipid inclusions (white arrow), indicative of autophagic vacuoles (star). (n) nucleus; (k) kinetoplast; (m) mitochondria.



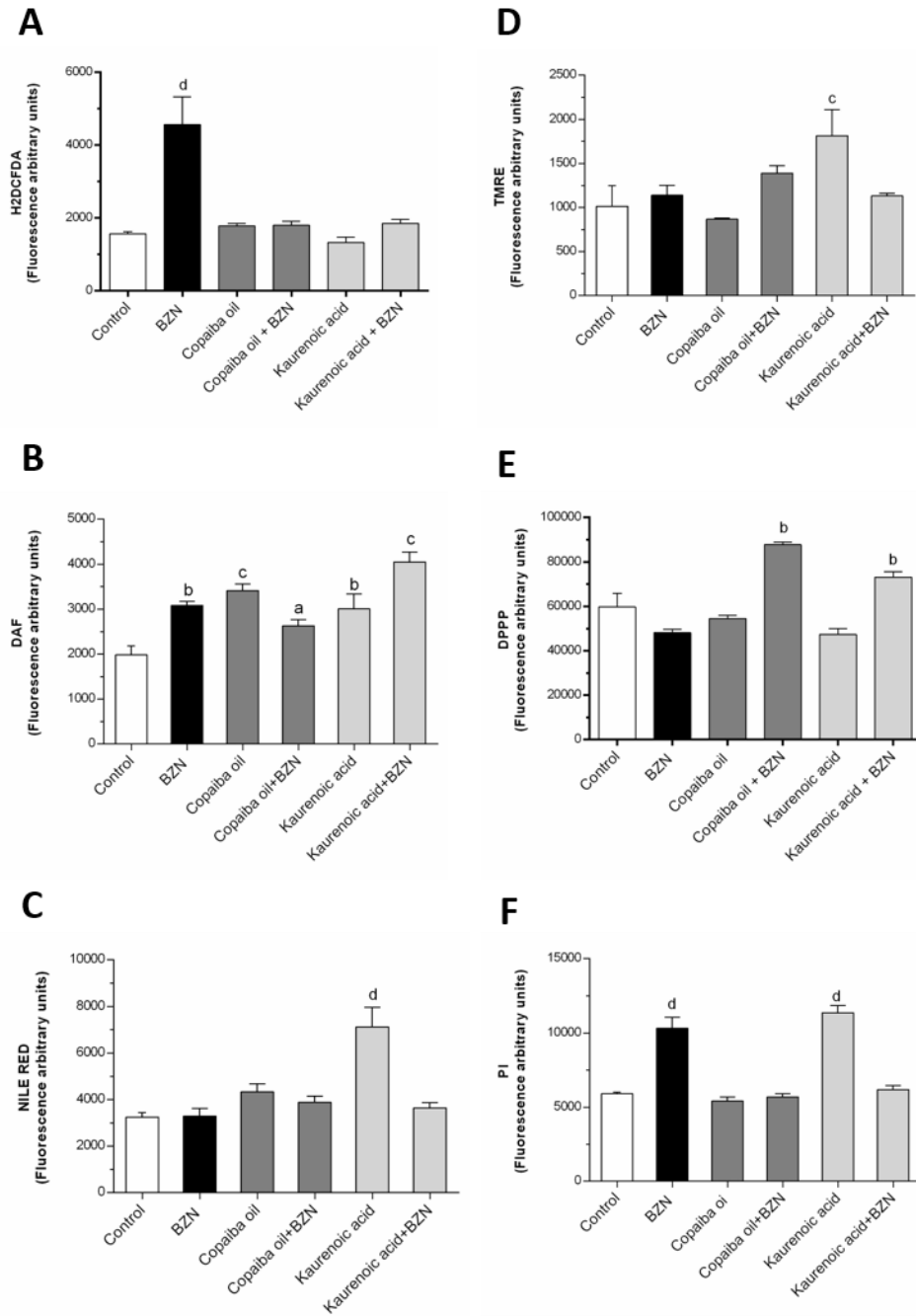


Figure 2. Fluorimetric determination of the mechanisms of action of the copaiba oil and kaurenoic acid alone or in combination with benznidazole. Production of reactive oxygen species (A), nitric oxide (B), lipid inclusions (C), mitochondrial membrane potential (D), lipid peroxidation (E) and cell membrane integrity (F). Epimastigotes were treated with compounds and their association with benznidazole. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.0001$, significant difference in relation to the untreated control.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que óleo de copaíba e ácido caurenóico possuem atividade sobre as formas intracelulares de *T. cruzi*, diminuindo a taxa de infecção e proliferação dos parasitos em células fagocíticas e não fagocíticas. Os compostos foram capazes de modular a resposta imune, no entanto, induzindo um perfil anti-inflamatório nos macrófagos infectados. Desta forma, acreditamos que a eliminação de *T. cruzi* possa estar ocorrendo pela ação direta destes produtos naturais sobre o parasito. Além disso, suas associações com benzonidazol mostraram resultados promissores, com efeito sinérgico e aditivo para *T. cruzi* e antagônico para células mamíferas. As alterações funcionais e estruturais causadas pelos tratamentos com os compostos sozinhos e em combinação indicam que o parasito pode estar sendo eliminado por mecanismos semelhantes a autofagia. Portanto, estes dados comprovam a atividade tripanocida do óleo de copaíba e ácido caurenóico, assim como suas combinações com benzonidazol, reforçando o potencial destes produtos naturais no tratamento da doença de Chagas.