



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÉSAR ARMANDO CONTRERAS LANCHEROS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR *Pseudomonas* sp.,
cepa LV. EM *Trypanosoma cruzi***

Londrina
2011

CÉSAR ARMANDO CONTRERAS LANCHEROS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR *Pseudomonas* sp.,
cepa LV. EM *Trypanosoma cruzi***

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

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L248a Lancheros, César Armando Contreras. Atividade antimicrobiana de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas* sp., cepa LV. em *Trypanosoma cruzi* / César Armando Contreras Lancheros.
– Londrina, 2011.
47 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.
Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Chagas, Doença de – Teses. 3. Doenças parasitárias – Teses. 4. Produtos de ação antimicrobiana – Teses. 5. *Pseudomonas* – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
III. Título.

CDU 616.937.3

CÉSAR ARMANDO CONTRERAS LANCHEROS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS
EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR *Pseudomonas* sp., cepa LV.
EM *Trypanosoma cruzi***

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina - PR

Prof. Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de
Souza Laboratório Nacional de Biociências –
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e
Materiais

Prof. Dr. Gerson Nakazato
UEL – Londrina - PR

Londrina, 11 de Março de 2011

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta pela orientação do trabalho, pela oportunidade de fazer parte do grupo de trabalho do laboratório, pelo apoio e paciência.

À prof. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela ajuda e sugestões no trabalho.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL, principalmente à Admilton Gonçalves de Oliveira pelo fornecimento do extrato.

Aos integrantes do Laboratório de Imunopatologia Experimental da UEL, em especial a Aparecida Malvezi e Rosiane Valeriano pela ajuda na bancada.

À Elizandra Britta e Angelo Caleare membros do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da UEM, pela ajuda na microscopia eletrônica.

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

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, obrigado pela colaboração e amizade.

À Danielle Kian, sempre presente ao longo de todo este tempo, me brindando a força e companhia nos momentos mais difíceis.

Ao meu avô Efrain, minha mãe Isabel e minha irmã Rocio, meus melhores exemplos e meus mais lindos motivos.

MUITO OBRIGADO

LANCHEROS, César Armando Contreras. **Atividade antimicrobiana de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas* sp., cepa LV. em *Trypanosoma cruzi***. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo flagelado *Trypanosoma cruzi*, uma doença endêmica no continente americano, com 10 milhões de pessoas infectadas e mais de 25 milhões em risco de contrair a doença. Os medicamentos usados para o tratamento da doença de Chagas apresentam efeitos colaterais e são efetivos somente na fase aguda da doença. Por estes motivos, novos agentes quimioterápicos são necessários para o tratamento. Neste contexto, diferentes trabalhos estão sendo focados no estudo de compostos de origem natural e sua atividade antitripanossoma. Espécies de *Pseudomonas* são caracterizadas por produzir metabólitos secundários e pela sua utilização em processos de biorremediação e controle biológico de patógenos. Neste trabalho, a fração F3D-etil acetato obtida a partir do sobrenadante de uma cultura de *Pseudomonas* sp. cepa LV. foi testada quanto a atividade antitripanossoma *in vitro* contra formas epimastigotas e amastigotas, assim como o efeito citotóxico da substância sobre células da linhagem LLCMK₂. O extrato mostrou efeito antitripanossoma dose dependente nas formas epimastigotas (cepa Y). As concentrações que apresentaram inibição do crescimento em 50% e 90% após 72h do tratamento foram 17,5 e 22,5 µg/ml, respectivamente. O extrato não foi citotóxico para células LLCMK₂ em concentrações até 2000 µg/ml após 72h de incubação. Houve redução na porcentagem de infecção por *T. cruzi* de células LLCMK₂ após 24, 48, e 72h de tratamento com o extrato. Formas epimastigotas foram tratadas com 17,5 e 22,5 µg/ml durante 72h e depois analisadas por microscopia eletrônica, onde alterações significativas na morfologia e tamanho típico das células quando comparadas com o controle foram evidenciadas.

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*. Atividade antimicrobiana. *Pseudomonas* sp.

LANCHEROS, César Armando Contreras. **Antimicrobial activity of extracellular compounds produced by *Pseudomonas* sp., LV strain in *Trypanosoma cruzi*.** 2011.47 f. Dissertation (Master's degree in Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi* is a neglected disease distributed in Latin America. Current treatment of Chagas' disease has toxic effects and limited efficacy. This problems lead to search of new chemotherapeutic agents against this disease. This study reports at the first time the biological activity of substances secreted in the supernatant of *Pseudomonas* sp. LV cultures. Tripanocidal activity against epimastigote forms was observed after 72 h of treatment and concentrations of 17.5 and 22.5 µg/ml showed 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) of growth inhibition, respectively. No growth was detected when the parasites were treated with concentrations higher than 30 µg/ml. There was a decrease in the percentage of infected LLCMK₂ cells, but no significant difference was observed for both, concentration and the time of incubation. In the cytotoxic assay, about 81.67% of the cells remain viable even at the highest concentration of the extract (2000 µg/ml). Scanning electron microscopy of epimastigotes treated with the IC₅₀ and IC₉₀ concentrations showed significant morphological alterations when compared with untreated cells.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Tripanocidal activity. Growth inhibition. *Pseudomonas* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática de um corte longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi*9

ARTIGO

- Figura 1** – Effect of different concentrations of the extract obtained from *Pseudomonas* sp. on the proliferation of epimastigotes, after 72 h of treatment. Epimastigotes were incubated for 72 h at 28 °C39
- Figura 2** – Cytotoxicity analysis with the MTT method in LLCMK₂ cells after 72 h of treatment. The *Pseudomonas* extract was added in different concentrations of 1 – 2000 µg/ml40
- Figura 3** – Effect of the extract obtained from *Pseudomonas* sp. on the proliferation of amastigote form, after 24, 48 and 72 h of treatment. Two concentrations were used 5 and 10 µg/ml. The internalization index (A) and percent of infection (B) was calculated. The control is estimated as 100%41
- Figura 4** – Scanning electron microscopy of epimastigote forms of *T. cruzi* after 72 h of treatment. (A) Untreated control; (B) IC₅₀ treatment; (C) IC₉₀ treatment. Bars = 2 µm42

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 | TRYPANOSOMA CRUZI E DOENÇA DE CHAGAS..... | 8 |
| 1.1.1 | Características Gerais | 9 |
| 1.1.2 | Formas de Transmissão da Doença de Chagas..... | 11 |
| 1.1.3 | Fases e Formas Clínicas da Doença de Chagas..... | 13 |
| 1.1.4 | Controle da Doença de Chagas | 14 |
| 1.1.5 | Desenvolvimento de Novos Quimioterápicos | 16 |
| 1.1.6 | Potenciais Alvos no Parasita | 16 |
| 1.1.7 | Substâncias com Atividade Antitripanossoma | 18 |
| 1.1.8 | Pseudomonas..... | 20 |
| 2 | OBJETIVOS | 22 |
| | REFERÊNCIAS | 24 |
| 4 | ARTIGO – Trypanosoma cruzi: antitrypanosomal activity of extracellular compounds produced by Pseudomonas sp. LV strain | 34 |
| | REFERÊNCIAS | 45 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRYPANOSOMA CRUZI E A DOENÇA DE CHAGAS

O subreino Protozoa contém mais de 65000 espécies conhecidas, que estão classificadas em 7 filos. No filo Sarcomastigophorea encontra-se a ordem Kinetoplastidae e, nesta, a família Trypanosomatidae (Levine et al., 1980). Membros desta família são parasitos obrigatórios que se caracterizam por apresentar estruturas e organelas peculiares, porém nem sempre exclusivas como: cinetoplasto, microtúbulos subpeliculares, glicossomas e um único flagelo que emerge da bolsa flagelar (Figura 1). O cinetoplasto é constituído por moléculas de DNA do cinetoplasto (kDNA), os maxicírculos e minicírculos que formam uma rede complexa e está localizado em uma mitocôndria única. O citoesqueleto dos tripanossomatídeos é caracterizado pela presença de microtúbulos subpeliculares que estão ligados entre si e com a membrana plasmática, conferindo forma e rigidez celular (Gull, 1999). Os glicossomas são organelas envolvidas por uma membrana que encontram-se distribuídos no citoplasma e contém enzimas envolvidas em diferentes vias metabólicas, entre elas, a via glicolítica (De Souza, 2002). Neste caso, as enzimas que participam da conversão da glicose a 3-fosfoglicerato estão localizadas em glicossomas (Opperdoes, 1987)

A família Trypanosomatidae compreende organismos com ciclo de vida simples e outros com ciclo de vida relativamente complexo. Algumas espécies completam o ciclo de vida em um único hospedeiro, geralmente invertebrado (ciclo monoxênico) enquanto outros alternam entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado ou plantas (ciclo heteroxênico) (De Souza, 2000). Assim, os tripanossomatídeos parasitam diferentes vertebrados, invertebrados (das ordens Diptera e Hemiptera) e também plantas (Maslov et al., 2001; Stevens et al., 2001).

Espécies da família Trypanosomatidae são agentes de doenças de importância médica, veterinária e agrônômica. Algumas são causadoras de doenças em humanos como: tripanossomíase americana (doença de Chagas) causada por *Trypanosoma cruzi*, tripanossomíase africana (doença do sono) cujo agente

Argentina, parasitando pequenos mamíferos e insetos (Schofield, 2000). Diferentes isolados e clones de *T. cruzi* podem ser agrupados em duas principais linhagens filogenéticas, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II de acordo com marcadores bioquímicos e moleculares (Souto et al., 1996; Anon, 1999). Tradicionalmente, *T. cruzi* I está associado com o ciclo doméstico e com a infecção em mamíferos e encontra-se predominantemente ao norte da região amazônica (Briones et al., 1999). O grupo *T. cruzi* II contém cinco subgrupos relacionados, denominados IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Brisse et al., 2000) e está relacionado com o ciclo silvestre da transmissão e com a infecção em marsupiais, distribuindo-se ao sul da região amazônica e países do cone sul (Fernandes, 1999). No entanto, estudos mostram que os dois grupos podem estar circulando tanto no ciclo doméstico como no ciclo silvestre (Añez et al., 2004; Botero et al., 2007).

O ciclo doméstico ocorre em moradias pela invasão e proliferação de vetores infectados pelo parasita. No ciclo peridoméstico intervêm mamíferos silvestres ou domésticos que entram e saem livremente das residências ou triatomíneos silvestres que são atraídos pela luz e alimento. A invasão por vetores silvestres e sua adaptação às moradias são influenciadas por fenômenos como o desmatamento (Coura et al., 2002; Schmunis, 2007). No ciclo silvestre, vetores contaminados com parasita infectam pequenos animais como roedores e marsupiais (Schmunis, 2000) e o contato com seres humanos é esporádico (Abad Franch; Monteiro, 2007).

Durante o ciclo de vida entre os dois hospedeiros, inseto vetor e mamífero, o parasita apresenta diferentes morfologias com características bioquímicas, fisiológicas, imunológicas e de expressão gênica distintas. Estas formas são: a) epimastigota, forma extracelular replicativa, não infectante, presente no intestino médio do vetor; b) tripomastigota metacíclico, forma infectante, não replicativa, presente no final do intestino e no reto do vetor; c) tripomastigota sanguíneo, forma infectante, não replicativa, presente no sangue do hospedeiro vertebrado; e d) amastigota, forma intracelular replicativa no hospedeiro mamífero (Tyler; Engman, 2001).

O ciclo de *T. cruzi*, inicia-se quando as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas junto com as excreções do vetor e penetram no hospedeiro vertebrado por uma lesão na pele, pela mucosa ocular ou via oral (Dorny et al, 2009). Após a invasão, os parasitas são internalizados no vacúolo parasitóforo

formado pela fusão dos lisossomos com a membrana plasmática da célula. Com o rompimento do vacúolo, os parasitas são liberados no citoplasma e diferenciam-se na forma amastigota intracelular (Andrews, 2002). Depois de múltiplos ciclos de fissão binária, as formas amastigotas se diferenciam novamente nas formas tripomastigotas que após o rompimento da membrana plasmática podem infectar novas células, ou cair na corrente sanguínea disseminando-se para diferentes órgãos (Teixeira, et al 2006; Yoshida, 2007). A forma tripomastigota pode ser ingerida pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Uma vez no estômago, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que migram para o intestino médio e se multiplicam ativamente. No reto, os parasitas se aderem ao epitélio intestinal onde ocorre a diferenciação em tripomastigota metacíclico, processo conhecido por metaciclogênese (Kollien; Shaub, 2000). Essas formas são liberadas através das fezes e urina do vetor e podem dar origem a um novo ciclo no hospedeiro vertebrado (Tyler; Engman, 2001).

1.1.2 Formas de Transmissão da Doença de Chagas

Naturalmente a doença de Chagas é transmitida ao homem por insetos hematófagos da subfamília Triatominae, família Reduviidae e ordem Hemiptera. Podem ser transmissores da doença cerca de 120 espécies de triatomíneos distribuídas em 16 gêneros, sendo que a maioria está presente em regiões tropicais e subtropicais do continente americano (Carcavella et al, 1998; Schofield; Galvão, 2009). Destas espécies, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* são considerados os principais vetores. Embora todas as espécies sejam consideradas vetores potenciais do parasita, só algumas estão relacionadas com o ciclo doméstico, outras são relevantes apenas no ciclo silvestre (Kollien; Schaub, 2000).

R. prolixus, um dos principais vetores da doença de Chagas, é uma espécie nativa das florestas mais secas do sistema do Orinoco, mas também há registros desta espécie em ambientes úmidos tais como Amazônia, no Brasil e Colômbia, apresentando-se em associação com a árvore de palma do gênero *Attalea*. Algumas espécies de triatomíneos se adaptaram para colonizar ambientes

artificiais e estabelecer consideráveis níveis de infestação, podendo transmitir *T. cruzi* para humanos e animais domésticos (Abad Franch; Monteiro, 2007). Uma destas espécies é *T. infestans* que se espalhou do habitat silvestre ao doméstico e peridoméstico em países da América do Sul (Dias et al., 2002). Outras espécies importantes nos ciclos doméstico e peridoméstico são: *Panstrongylus lutzi* (Garcia et al., 2005), *Triatoma rubrofasciata*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius stali*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pallescens* e *Rhodnius ecuadoriensis* (Coura et al., 2002; Abad Franch; Monteiro, 2007).

Mais de 100 mamíferos terrestres e arborícolas como marsupiais, roedores, carnívoros e primatas de pequeno porte, incluindo também animais domésticos (cães, gatos e coelhos) e o próprio homem são hospedeiros de *T. cruzi* (Herrera et al., 2008). Geralmente a transmissão do parasita para pequenos mamíferos pode ocorrer via oral quando o mamífero ingere vetores infectados (Schofield, 2000; Herrera et al., 2008). Algumas das principais espécies que além de atuar como reservatórios ajudam a dispersar o parasita são: *Didelphis* marsupiais, *Philander opossum*, *Holochilus brasiliensis*, *Nasua nasua*, *Bradypus torquatus*, *Leontopithecus rosalia*, *Caluromys* sp., *Dasyopus* sp., *Nectomys* sp., *Artibeus* sp., entre outras (Fernandes et al., 1999; Coura et al., 2002).

A via vetorial (80-90% da transmissão) ocorre pelo contato da pele e mucosa do hospedeiro vertebrado com as excretas contaminadas do inseto vetor. Este tipo de transmissão depende da diferenciação do parasita no vetor, da frequência e do volume das dejeções do triatomíneo, e o tempo decorrido entre o repasto sanguíneo e a dejeção (De Souza, 2000).

Em países não endêmicos a incidência da transmissão vetorial é reduzida, mas aumenta a probabilidade de infecção por transfusão de sangue contaminado (Schmunis, 1999) que é considerada a segunda via mais comum de contrair a doença (5-20% da transmissão) (Dias, 2000). Isso acontece devido à migração de pessoas doadoras de sangue de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e à falência em exames sorológicos nos bancos de sangue para a detecção de *T. cruzi* (Schmunis, 1999). Este tipo de transmissão ocorre principalmente em países não endêmicos como Austrália, Canadá, Espanha e Estados Unidos ou em países com avanços na erradicação do vetor (Schmunis, 1999, 2007).

Outras vias pouco frequentes são: transmissão oral, congênita, transplante de órgãos e acidentes de laboratório. A transmissão da doença por via oral ocorre de maneira excepcional, pela ingestão de alimentos contaminados com a urina ou excreções do triatomíneo (Dorny et al., 2009). Muitos tipos de alimentos podem estar relacionados com este tipo de transmissão, como: carne de caça mal cozida, frutas, caldo de cana entre outros (Dias, 2006). A transmissão congênita de *T. cruzi* ocorre em 4-12% dos casos da doença nos países do Cone Sul, como consequência ocorrem nascimentos de prematuros e com baixo peso (Dias, 2000). No caso de acidentes laboratoriais, a transmissão de *T. cruzi* se dá pelo contato com culturas, sangue, ou instrumentos contendo a forma tripomastigota (Dias, 2000).

1.1.3 Fases e Formas Clínicas da Doença de Chagas

A fase aguda da doença segue 6-10 dias após a infecção e afeta principalmente o tecido muscular estriado e o sistema nervoso central. É caracterizada por alta parasitemia, inflamação e danos do miocárdio (Morris et al., 1990). Nesta fase, os pacientes geralmente desenvolvem uma infecção assintomática, mas em alguns casos podem apresentar características clínicas como febre, cefaléia, mal-estar geral, astenia e hiporexia. Podem apresentar também sinais de porta de entrada da infecção, do tipo ocular (sinal de Romana) ou cutâneo (chagoma de inoculação).

O óbito durante a fase aguda da doença é pouco frequente e está relacionado, na maioria das vezes, com insuficiência cardíaca decorrente da miocardite aguda ou a meningoencefalite aguda (Rassi et al., 2000; Texeira et al., 2006). O tratamento nesta fase da doença consegue curar de 30-80% dos casos (Coura et al., 2002). De 8 a 10 semanas após a infecção ocorre um período de latência, chamada também de fase indeterminada, com baixa parasitemia e que gera manifestações como pequena inflamação no coração e degeneração do tecido muscular esquelético. Estas características são de baixa intensidade e a maioria dos indivíduos infectados permanece nesta fase que pode durar a vida inteira ou evoluir para a fase crônica sintomática (Texeira et al., 2006).

Estima-se que 10 a 20 anos após a infecção, aproximadamente 30% dos pacientes desenvolvem infecção crônica sintomática (Morris et al., 1990) que pode ser do tipo cardíaco, digestivo, misto ou neurológico. O tipo cardíaco da doença geralmente afeta indivíduos entre 30 e 40 anos (Texeira et al., 2006), consistindo em uma forma progressiva de cardiomiopatia (Laranja et al., 1965), chamada também de Cardiomiopatia Chagásica Crônica, que pode levar à morte 5 anos após a identificação das primeiras falhas cardíacas (Texeira et al., 2006). Nesse tipo há manifestações como patologia microvascular, hipoperfusão do miocárdio (Morris et al., 1990), arritmias cardíacas, aneurisma ventricular, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita (Texeira et al., 2006).

A fase crônica da doença também pode originar alterações hipertróficas no esôfago e colón intestinal, chamadas de megaesôfago e megacólon, respectivamente, que podem aparecer em pacientes entre 20 e 40 anos de idade. No megaesôfago ocorrem sintomas como aumento da salivação, regurgitação, soluço e aumento da acidez estomacal. O principal sintoma do megacólon é a constipação que produz a dilatação e compromete o cólon sigmóide e o reto, outras complicações podem incluir oclusão intestinal, fecalomas e ulceração. A forma mista é caracterizada pela combinação de problemas cardíacos e gastrointestinais e, por último, na forma neurológica são observadas alterações morfológicas no tecido nervoso central, originadas pela invasão do parasita nas células da glia (Teixeira, et al., 2006). Durante a fase crônica o tratamento específico apenas reduz os níveis de parasitemia (Coura; De Castro, 2002).

1.1.4 Controle da Doença de Chagas

O controle da doença de Chagas possui limitantes como: prevalência da transmissão no ciclo silvestre, elevado número de reservatórios, transmissão congênita não prevenível e deficientes condições socioeconômicas nas comunidades endêmicas. No entanto, existem algumas alternativas de controle que estão principalmente focadas para a prevenção da transmissão vetorial, diminuindo ou eliminando o vetor dos domicílios pelo tratamento químico das habitações infestadas ou pelo melhoramento físico das moradias e do peridomicílio. Essas

ações são acompanhadas de campanhas educativas nas comunidades e também por ciclos de vigilância entomológica orientada a avaliar os resultados das estratégias de controle. No entanto, a falta de continuidade em programas de erradicação, a adaptação de novas espécies silvestres em ambientes domésticos, a baixa sensibilidade em técnicas para detectar o vetor e a resistência aos inseticidas, têm dificultado o controle total da transmissão vetorial (WHO, 2007).

Para prevenir a transmissão transfusional são feitos exames sorológicos no sangue e hemoderivados, que podem ser acompanhados de outras técnicas confirmatórias mais sensíveis e que conferem maior segurança. O controle em bancos de sangue também está focado para o emprego de substâncias profiláticas para o tratamento de sangue contaminado. Assim, o principal agente profilático usado até o momento é o cristal violeta que elimina o parasita, mas tem a desvantagem de dar coloração azul ao sangue e tecidos (Urbina; Docampo, 2003). Referente ao controle da transmissão congênita são feitos exames sorológicos nas crianças de mães chagásicas, a partir do sexto mês de vida e posterior tratamento dos casos soropositivos (Dias et al., 2002).

Com a iniciativa do Cone Sul, países como Uruguai, Chile, Brasil e Argentina aplicaram diversas medidas de controle obtendo bons resultados na erradicação do vetor das áreas domiciliares e na diminuição da transmissão transfusional, reduzindo a incidência da doença e certificando estes países como livres da transmissão vetorial por *T. infestans* (PAHO, 2009).

Para a doença de Chagas não existe vacina ou tratamento quimioterápico eficiente (Dias et al., 2002), mas os tratamentos disponíveis estão dirigidos a eliminação do parasita na fase aguda e a diminuição dos sintomas gerados na fase crônica. Para a eliminação do parasita são utilizados dois medicamentos: Nifurtimox e Benzonidazol com tratamento contínuo de 60 dias, apresentando bons resultados durante a fase aguda, principalmente nos casos de infecção congênita e acidentes laboratoriais.

No Brasil, o tratamento etiológico dessa enfermidade é analisado utilizando-se o benzonidazol. A eficácia desse fármaco é dependente de vários fatores como: fase da doença, período de tratamento, dose, idade e origem geográfica dos pacientes. Além disso, outros problemas associados à quimioterapia da doença de Chagas são: a grande variabilidade genética das populações de parasitas (Brener et al., 1976), a existência de cepas naturalmente resistentes aos

fármacos (Filardi, Brener, 1987) e a falta de interesse no desenvolvimento de novos fármacos pelas indústrias farmacêuticas.

O mecanismo de ação do Nifurtimox e Benzonidazol está relacionado com a produção de compostos eletrofílicos e/ou radicais livres que o sistema de detoxificação do parasita não pode eliminar, então, estes radicais se ligam a proteínas e lipídios do parasita, danificando sua estrutura (Temperton et al., 1998). A efetividade destes medicamentos depende das características da cepa e das condições fisiológicas do paciente, além disso, estes medicamentos são tóxicos e produzem efeitos colaterais. No caso do Nifurtimox, podem ocorrer náuseas, alergias, alterações psíquicas, perda de peso e de apetite, já o Benzonidazol produz dermatites, dor muscular, febre, depressão na medula óssea, agranulocitose e polineuropatia (Coura; De Castro, 2002).

1.1.5 Desenvolvimento de Novos Quimioterápicos

1.1.6 Potenciais Alvos no Parasita

Diferentes alvos têm sido identificados para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente relacionados às características metabólicas de *T. cruzi*. Dentre os principais alvos estão: metabolismo de purinas, biossíntese do ergosterol, inibidores da cruzipaina, via glicolítica de *T. cruzi* e metabolismo da tripanotona.

Os tripanossomatídeos apresentam incapacidade para sintetizar purinas de novo, o que não acontece no hospedeiro vertebrado. No entanto, o parasita tem a habilidade de concentrar purinas exógenas e incorporá-las aos ácidos nucléicos (Hammond et al., 1981). Uma enzima essencial neste processo é a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) que tem como substrato natural a hipoxantina (Marr, 1991). O Alopurinol é um medicamento que atua como substrato alternativo da hipoxantina e pode ser incorporado ao RNA do parasita através da HGPRT (Apt et al, 1998).

A via de biossíntese do ergosterol é similar para fungos e tripanossomatídeos, e fundamental para o desenvolvimento e proliferação celular destes organismos (Urbina; Docampo, 2003). Além disso, pode ser alvo específico, já que o ergosterol não faz parte da célula do hospedeiro. Neste sentido, inibidores sintéticos da biossíntese do ergosterol dos grupos triazóis (Cetoconazol, Posaconazol e Itraconazol) e bis-triazóis utilizados contra fungos, têm sido avaliados contra *T. cruzi*. Destes inibidores, o D0870 (Zeneca Pharmaceuticals) e o Posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute) mostraram atividade na fase aguda e crônica da doença de Chagas em modelo animal. Este último já foi registrado como um medicamento antimicótico nos Estados Unidos, Austrália e alguns países da Europa, o que possibilita sua avaliação como agente útil no tratamento da doença (Santa-Rita et al., 2005). Outros compostos como os análogos de lisofosfolípídios são agentes anticancerígenos que também apresentaram ação tripanocida relacionada com a inibição da síntese do ergosterol. Dentro destes compostos, Edelfosina, Miltefosina e Ilmofosina causam alterações na membrana plasmática nas três formas evolutivas do parasita (Santa Rita et al., 2000). A Edelfosina quando combinado com Cetoconazol provoca modificações na mitocôndria e formação de estruturas membranosas concêntricas dentro das organelas de formas epimastigotas (Santa Rita et al., 2005). Outros compostos do grupo triazol com ação tripanocida *in vitro* e *in vivo* são: Ravuconazol, BMS 207 147, TAK-187, UR-9825 e CYP51 (Urbina; Docampo, 2003). O efeito deste último é aumentado quando combinado com Terbinafina, um derivado do grupo das alilaminas (Wilkinson; Kelly, 2009).

A cruzipaina, conhecida também como cruzaina ou GP57/51, é uma cisteína protease responsável pela atividade proteolítica em todas as etapas do ciclo de vida do parasita. Os inibidores desta enzima reduzem *in vitro* a proliferação das formas epimastigotas e amastigotas do parasita, inibindo também o processo de metaciclogênese. Um inibidor seletivo da cruzipaina é o peptídeo K-777 que provocou redução na parasitemia e aumento da sobrevivência em modelos animais em fase aguda e crônica da doença (Scharfstein; Lima, 2008).

Diferentes enzimas da via glicolítica têm sido focos para o desenvolvimento de inibidores, tanto pela importância destas enzimas na produção de ATP como pelas diferenças bioquímicas quando comparadas com as enzimas no hospedeiro vertebrado. Além disso, as sete primeiras enzimas da glicólise em

tripanossomatídeos se encontram nos glicosomas, diferente de outros organismos cujas enzimas localizam-se no citosol (Opperdoes, 1987). Para algumas destas enzimas têm sido desenvolvido inibidores de alta seletividade afetando o crescimento do parasita e sem efeitos para a célula hospedeira (Verlinde et al., 2001).

Outro alvo é a tripanotiona, sintetizada pela conjugação de duas moléculas reduzidas de glutatona e espermidina, presente somente em tripanossomatídeos e essencial ao seu metabolismo (Irigoin et al., 2008). Inibidores das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo redox da tripanotiona, especialmente a enzima tripanotiona redutase, podem ser usados em estudos para o controle da doença (Saúde-Guimarães; Faria, 2007). A tripanotiona redutase é uma flavoproteína NADPH-dependente que mantém a tripanotiona na sua forma reduzida, metabolizando os radicais livres e mantendo o estado reduzido intracelular (Coura et al., 2002). Um dos inibidores da tripanotiona redutase é a tioridazina que apresenta atividade tripanocida *in vitro*, mas sem estudos que mostrem atividade seletiva *in vivo* (WHO, 2007).

Organelas como os acidocalcissomas também têm sido testados como possíveis alvos quimioterápicos. Estas estruturas armazenam íons divalentes de cálcio e magnésio e também alguns pirofosfatos envolvidos na osmorregulação, transdução de energia e resposta do parasita ao estresse ambiental. Os pirofosfatos são essenciais nestes processos, especialmente em sistemas de fluxo de Ca^{2+} , regulado por enzimas como farnesil-pirofosfato sintetase, esqualeno sintetase ou próton pirofosfatase. Alguns análogos sintéticos dos pirofosfatos (como os bifosfatos) podem se acumular seletivamente nos acidocalcissomas do parasita e inibir a atividade dessas enzimas (Urbina; Docampo, 2003).

1.1.7 Substâncias Naturais com Atividade Antitripanossoma

Compostos de origem natural têm sido avaliados quanto a sua atividade antitripanossoma, em sua maioria de origem vegetal e em alguns casos animal. Estas substâncias são testadas como extratos brutos, frações e também como análogos semi-sintéticos. Na última década têm sido estudadas mais de 300

espécies vegetais pertencentes a aproximadamente 100 famílias, como possíveis fontes de substâncias para o tratamento da doença de Chagas (Quadro 1). Várias partes da planta são utilizadas no processo de extração com solventes de diferentes polaridades (Izumi et al., 2011). No entanto, existem poucos estudos sobre o mecanismo de ação, testes in vivo e tratamento de casos clínicos (Maya et al., 2007). Dentro dos principais grupos químicos obtidos de plantas estão: naftoquinonas, naftoimidazóis, alcalóides, terpenoides, catequinas, hidrocarbonetos, flavonoides, neolignananas, quinonas, xantonas, e taxoides (Izumi et al., 2011).

| Grupo | Substância | Origem | Forma evolutiva | Mecanismo de ação |
|---------------|--------------------|---|--------------------------------|--|
| Naftoquinonas | β -lapachona | <i>Tabebuia</i> sp. | Tripomastigota | - Fragmentação do DNA. - Interferência com o metabolismo energético. (Menna-Barreto et al., 2009) |
| | | | Epimastigota | - Danos na mitocôndria, aparelho de Golgi e reservossomas. - Inibição da enzima succinato citocromo-c reductase. - Inibição da metaciclo gênese. (Menna-Barreto et al., 2007) |
| | Naftoimidazol | Derivado sintético | Epimastigota | Inibição da biossíntese do ergosterol e proteínas, montagem do citoesqueleto, e modulação de chaperonas. (Menna-Barreto et al., 2010). |
| Alcalóides | Piperina | <i>Piper nigrum</i> | Epimastigotas | Inibição de topoisomerasas. (Maya et al., 2007; Freire de Lima et al., 2008) |
| Flavonóides | Catequinas | <i>Camellia sinensis</i> | Tripomastigota Amastigota | Inibição da enzima arginina quinase |
| | Própolis | | Epimastigotas | Danos na mitocôndria e reservossomas. (Dantas et al., 2006; Menna-Barreto et al., 2009; Salomão et al., 2009; Soeiro et al., 2009) |
| Neolignananas | | <i>Aristolochia taliscana</i> <i>Piper</i> sp. | Epimastigotas | - Inibição da metaciclo gênese <i>in vitro</i> . - Vacuolização citoplasmática e danos no cinetoplasto. (Abe et al., 2002; Luize, 2006; Nocito et al., 2007). |
| Ácido úsnico | | <i>Cladonia substellata</i> | Epimastigota Tripomastigota | Danos na mitocôndria e cinetoplasto. Vacuolização citoplasmática. (De Carvalho et al., 2005). |
| Ácidos graxos | Xantonas | <i>Chrysochlamys tenuis</i> | Epimastigota | Intercalação no DNA. (Dua et al., 2009) |

Quadro 1 – Exemplo de alguns grupos químicos de origem natural com atividade antitripanossoma.

Substâncias de origem animal, como alguns venenos de anfíbios e répteis também já foram testados quanto sua atividade antitripanossoma *in vitro*. No estudo de Adade (2010) foi testado o veneno de *Crotalus viridis viridis* exibindo atividade *in vitro* contra todas as formas evolutivas do parasita, produzindo alterações na membrana plasmática e na mitocôndria. Efeitos similares foram obtidos empregando o veneno de *Bothrops jararaca* (Goncalves et al., 2002; Deolindo et al., 2005). Por outro lado, a partir de secreções do anfíbio *Rhinella jimi* foi isolada a substância hellebrigenina, um esteróide que apresentou atividade na inibindo a proliferação de formas tripomastigotas (Tempone et al, 2008).

1.1.8 *Pseudomonas*

Pseudomonas é um grupo de bacilos Gram-negativos caracterizados por sua versatilidade metabólica, geralmente possuem respiração aeróbica e se movimentam por um ou vários flagelos polares (Haas; Défago, 2005). É um dos grupos mais diversos, com espécies distribuídas em ambientes terrestres ou aquáticos, em associação com plantas e animais (Spiers et al., 2000). Estes microrganismos têm importância ecológica por participar da degradação de um número considerável de compostos naturais e também produtos industriais devido a produção de diferentes metabólitos.

As espécies de *Pseudomonas* mais estudadas quanto à produção de metabólitos secundários são *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. cichorii* e *P. syringae*. Os metabólitos secundários produzidos por estas espécies podem ser classificados em seis tipos: lipídios e compostos relacionados, ácido pseudomônico, fenazinas, derivados de indóis, pirolnitrinas e peptídeos ou aminoácidos.

Metabólitos secundários produzidos por espécies de *Pseudomonas* têm sido testados no controle de patógenos, como agentes bactericidas, fungicidas, nematicidas, acaricidas e inseticidas (Battu; Reddy, 2009). (Neidig et al., 2010).

Os metabólitos secundários também têm um papel importante na ação contra protozoários. As cepas CHA0 e DSS73 de *P. fluorescens* têm sido estudadas quanto à produção de metabólitos secundários e sua ação contra

protozoários amebóides dos reinos Rhizaria e Amoebozoa e não amebóides dos reinos Excavata e Chromalveolata (Pedersen et al., 2010).

2 OBJETIVOS

O tratamento da doença de Chagas apresenta dificuldades, já que os dois medicamentos usados atualmente, nifurtimox e benzonidazol são efetivos somente na fase aguda da doença e apresentam efeitos tóxicos que dificultam tratamentos longos (Maya et al., 2007). Assim, a necessidade de novos tratamentos para a doença de Chagas tem motivado a pesquisa para identificação de novos alvos para quimioterápicos e a procura de novos agentes com atividade antitripanossoma.

No estudo de novos agentes quimioterápicos tem sido usadas substâncias tanto sintéticas como naturais que apresentam similaridade estrutural com outros medicamentos de atividade reconhecida para o tratamento da doença de Chagas (Coura; De Castro, 2002). Quanto às substâncias de origem natural, diferentes compostos são testados *in vitro* contra as diferentes formas evolutivas do parasita, e estes compostos podem ser isolados a partir de plantas, animais e microrganismos.

Dentro da pesquisa para o isolamento de agentes com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias, Oliveira et al (2011) isolaram substâncias a partir do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas* sp que mostraram atividade antibiótica contra *Xanthomonas citri*, o agente etiológico do cancro cítrico. Além da atividade antibiótica *in vitro*, os resultados *in vivo* mostraram diminuição nas lesões causadas pelo patógeno.

Na tentativa de verificar o espectro de ação das substâncias produzidas por *Pseudomonas* sp cepa LV, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade biológica da fração F3D etil-acetato sobre *Trypanosoma cruzi*, tendo como objetivos específicos:

- Determinar a atividade tripanocida *in vitro* da fração F3D obtido a partir do sobrenadante de uma cultura de *Pseudomonas* sp. cepa LV
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do extrato contra células LLCMK₂.

- Identificar as modificações estruturais causadas pelo extrato em formas epimastigotas por meio de microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. (2007). Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 102, p. 57-69.
- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, S.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.*, v. 25, p. 1188-1191.
- ADADE, C. M.; CONS, B.; MELO, P.A.; SOUTO-PADRÓNE, T. (2010). Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.*, v. 138, p. 46-58.
- ANDREWS, N.W. (2002). Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *The Journal of Cell Biology.*, v. 158, p. 389-394.
- ANON (1999). Recommendations from a Satellite Meeting International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 94, p. 429-432.
- AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; DA SILVA, F.M.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E. S.; STOL, A. M.; RAMIREZ, J. L.; TEIXEIRA, M. M. G. (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Tropical Medicine and International Health.*, v. 9, p. 1319-1326.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. (1998). Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 59, p. 133–138.

- BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; O LAZZARI, J.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 362, p. 1469–80.
- BATTU, P.; REDDY, M. S. (2009). Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its characterization. *Asian journal research Chemistry*. v. 2, p. 26-29.
- BOTERO, L. A.; MEJÍA, A. M.; TRIANA, O. (2007). Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica*, v. 27, p. 64-74.
- BRENER, Z.; COSTA, C. A.; CHIARI, E. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 11, p. 245-249.
- BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 104, p. 219-232.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, p. 95-105.
- CARCAVELLA, R. U.; GALINDEZ-GIRON, I.; JUBERG, J.; LENT, H. (1998). *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 1, p. 159-218.
- COURA, J.; DE CASTRO, S. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 97, p. 3-24.

- COURA, J.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology.*, v. 18, p. 171-175.
- DANTAS A. P.; SALOMÃO K.; BARBOSA H. S.; DE CASTRO S. L. (2006). The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 101, p. 207-211.
- DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREIDO, R.C.B.Q. (2005). Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. *Micron.*, v. 36, p. 155-161.
- DE SOUZA, W. (2000). O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener. Z., Andrade, Z. A., Barral-Netto, M., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 88-123.
- DE SOUZA, W. (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research.*, v. 88, p. 1013-1025.
- DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E.; ARNHOLDT A.C.; DE SOUZA. W.; ALVES, E.; DAMATTA, R. (2005). Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 100, p. 33-38.
- DIAS, J. C. P. (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 39, p. 370-375.
- DIAS, J. C. P. (2000). Epidemiologia da doença de Chagas. In: Brener. Z., Andrade, Z.A., Barral-Netto, M., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 48-74.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C. J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 97, p. 603-612.

- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. (2005). Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nature reviews-Microbiology*. v. 3, p. 251-261.
- DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*., v. 163, p. 196-206.
- DUA, V.; VERMA, G.; DASH, A. (2009). In vitro antiprotozoal activity of some Xanthones isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. *Phytother. Research*, v. 23, p. 126–128.
- FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A.P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*., v. 118, p. 161-166.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. , v. 81, p. 755-759.
- FREIRE DE LIMA, L.; RIBEIRO, T. S.; ROCHA, G.M.; BRANDÃO, B. A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; LIMA, M. E. F.; CAVALHO, T. M. U.; HEISE, N. (2008). The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitology Research*, v. 102, p. 1059-1067.
- GARCIA, M. H.; SOUZA, L.; DE SOUZA, R.; PAULA, A.; BORGES, E. C.; BARBOSA, S. E.; SCHOFFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L. (2005). Occurrence and variability of *Panstrongylus lutzi* in the State of Ceará, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 38, p. 410-415.
- GONÇALVES, A.; SOARES, M.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R.; ALVES, E. (2002). Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and

- Leishmania major induced by Bothrops jararaca venom. Parasitology Research, v. 88, p. 598-602.
- HAMMOND, D.J.; GUTTERIDGE, W.E.; OPPERDOES, F.R., 1981. A novel location for two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and Leishmania. FEBS Letters., v. 128, p. 27–29.
- HAAS, D.; DÉFAGO, G. 2005. Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology., v. 3, p. 307–319.
- HERRERA, H. M.; LISBOA, C. V.; PINHO, A.P.; OLIFIERS, N.; BIANCHI, R. C.; ROCHA, F.L; MOURÃO, G.M.; JANSEN, A. M. (2008). The coati (Nasua nasua, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of Trypanosoma cruzi in the Pantanal region, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene., v. 102, p. 1133-1139.
- IRIGOIN, F. ; CIBILIS, L. ; COMINI, M.A. ; WILKINSON, S.R. ; FLOHÉ, L. ; RADU, R. (2008). Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Radical Biology & Medicine. v. 45, p. 733–742.
- IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C.V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against Trypanosoma cruzi. Natural Product Reports, 28: 809-823.
- KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G.A. (2000). The Development of Trypanosoma cruzi in Triatominae. Parasitology Today., v. 16, p. 381-387.
- LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G.; MIRANDA, A. (1965). Chagas disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation., v. 14, p. 1035-1060.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX G.; GRAIN J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE F.C.; POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. Journal of Eukaryotic Microbiology., v. 27, p. 37-58.

- LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MORGADO-DIAS, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. (2006). Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 100, p. 31-37.
- MARR, J.J.(1991). Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 118, 111-119.
- MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKE, J. (2001). Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 96, p. 397-402.
- MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDE, M.; GALANTIA, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, v. 146, p. 601-620.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; BEGHINIB, D.; FERREIRA, A.; PINTO, A.; OLIVEIRA, M.; DE CASTRO, S. L.; PERALES. J. (2010). Proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Journal of proteomics.*, v. 73, p. 2306-2315.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONCALVES, R. L. S.; COSTA, E.; SILVA, R.; PINTO, A.; OLIVEIRA, M.; DE CASTRO, S.L. (2009). The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 47, p. 644–653.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; CORRÊA, J. R.; PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S.L. (2007). Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitology Research*, v. 101, p. 895-905.

- MORRIS, S. A.; HERBERT, B.T.; WITTNER, M.; BILEZIKIAN, J.P. (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation.*, v. 82, p. 1899-1909.
- NEIDIG, N.; PAUL, R.; SCHEU, S.; JOUSSET, A. (2011). Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. *Microbiology: Ecology*, in press. DOI 10.1007/s00248-011-9821-z
- NOCITO, I.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S.A.; SERRA, E. (2007). Activity of 8.O.4'-neolignans against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 101, p. 1453-1457.
- OPPERDOES, F.R. (1987). Compartmentalization of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 127-151.
- PAHO (2009). Pan American Health Organization. www.paho.org. PEDERSEN, A.L., WINDING, A., ALTENBURGER, A., EKELUND, F. (2011). Protozoan growth rates on secondary-metabolite-producing *Pseudomonas* spp. correlate with high-level protozoan taxonomy. *Microbiology Letters*, v. 316, p. 16-22.
- RASSI, A. ; RASSI, A.J.R. ; RASSI, G.G. (2000). Fase aguda da doença de Chagas. In: Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral-Netto, M., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 231–45.
- SALOMÃO. K.; SOUZA, E. M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. (2009). Brazilian green propolis: effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, in press. DOI:10.1093/ecam/nep014
- SANTA-RITA, R. M.; LIRA, R.; BARBOSA, H. S.; URBINA, J. A.; CASTRO, S. L. (2005). Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, v. 55, p. 780-784.

- SANTA-RITA, R. M.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. S.L; DE CASTRO,S. (2000). Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.*, v. 75, p. 219-228.
- SAÚDE-GUIMARÃES, D.; FARIA, A. (2007). Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* v. 17, p. 455-465.
- SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.P. (2008). Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Subcellular Biochemistry*, v. 47, p. 140-54.
- SCHOFIELD, C. J. (2000). *Trypanosoma cruzi*: The vector-parasite paradox. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 95, p. 535-544.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica.*, v. 110, p. 88-100.
- SCHMUNIS, G.A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 102 (Suppl. I), p. 75-85.
- SCHMUNIS, G. A. (2000). "A tripanossomiase Americana e seu impacto na saúde pública das Américas." In: Brener. Z., Andrade, Z.A., Barral-Netto, M., eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1-15.
- SCHMUNIS, G. A. (1999). Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 94, p. 93-101.
- SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology.*, v. 146, p. 2345-2350.
- SOEIRO, M.N; DE CASTRO S. L. (2009). *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opinion Their Targets.*, v. 13, p. 105-21.

- SOUTO, R.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology.*, v. 83, p. 141-152.
- STEVENS, R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. (2001). The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in parasitology.*, v. 48, p. 1-53.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.*, v. 101, p. 463-491.
- TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; KELLY, J.M., (1998). Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular Biochemistry Parasitology.* 96, 167–176.
- TEMPONE, A. G.; PIMENTA, D.; LEBRUN, I.; SARTORELLI, P.; TANIWAKI, N.; DE ANDRADE, H. F.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. (2008). Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon.*, v. 52, p. 13-21.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology.*, v. 31, p. 472-481.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitology.*, v. 19, p. 495-501.
- VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PERIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W.G.H.; MICHELS, P.A.M. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates.*, v. 4, p. 50-65.
- WHO. (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Organización mundial de la Salud. Buenos Aires, Argentina. 104 pp.

WHO. (2010). Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization. Fact sheet N°340.

WILKINSON, S.R.; KELLY, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert reviews in molecular medicine & Cambridge University., v. 11, p. e31.

YOSHIDA, N. 2007. Trypanosoma cruzi infection by oral route How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitology International., v. 57, p. 105-109.

4 ARTIGO

4.1 TITLE – TRYPANOSOMA CRUZI: ANTITRYPANOSOMAL ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUNDS PRODUCED BY PSEUDOMONAS SP. LV STRAIN.

César Armando Lancheros Contreras, Danielle Kian, Admilton Gonçalves de Oliveira, Galdino Andrade Filho, Celso Vataru Nakamura, Lucy Megumi Yamauchi, Sueli Fumie Yamada Ogatta

*
Corresponding author: Sueli Fumie Yamada-Ogatta
Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788.
E-mail address: ogatta@uel.br

TITLE – TRYPANOSOMA CRUZI: ANTITRYPANOSOMAL ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUNDS PRODUCED BY PSEUDOMONAS SP. LV STRAIN.

César Armando Lancheros Contreras¹, Danielle Kian¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino Andrade Filho¹, Celso Vataru Nakamura², Lucy Megumi Yamauchi¹, Sueli Fumie Yamada Ogatta¹

Abstract

Chagas' disease, caused by *Trypanosoma cruzi* is a neglected disease distributed in Latin America. Current treatment of Chagas' disease has toxic effects and limited efficacy. This problems lead to search of new chemotherapeutic agents against this disease. This study reports at the first time the biological activity of substances secreted in the supernatant of *Pseudomonas* sp. LV cultures. Tripanocidal activity against epimastigote forms was observed after 72 h of treatment and concentrations of 17.5 and 22.5 µg/ml showed 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) of growth inhibition, respectively. No growth was detected when the parasites were treated with concentrations higher than 30 µg/ml. There was a decrease in the percentage of infected LLCMK₂ cells, but no significant difference was observed for both, concentration and the time of incubation. In the cytotoxic assay, about 81.67% of the cells remain viable even at the highest concentration of the extract (2000 µg/ml). Scanning electron microscopy of epimastigotes treated with the IC₅₀ and IC₉₀ concentrations showed significant morphological alterations when compared with untreated cells.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Tripanocidal activity. Growth inhibition. *Pseudomonas* sp.

1 INTRODUCTION

Chagas disease (Chagas, 1909), a vector-borne illness caused by the heteroxenic trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*, continues to be an important health problem, particularly in South and Central America. However, this disease is emerging in non-endemic countries mainly due to the increase in international migration of people from the endemic areas (Schmunis & Yadon, 2010).

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, 86051980, Londrina, Paraná, Brazil. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788. E-mail address: ogatta@uel.br

² Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, 87020900, Maringá, Paraná, Brazil.

Despite the considerable advances in the knowledge of the genetic, biochemistry, cellular and molecular biology of *T. cruzi*, only two medicines (nifurtimox and benznidazole, where only the last one is available in Brazil) are currently available for the specific treatment of Chagas disease. They have significant activity in acute and short-term chronic infections which is dependent on parasite strains drug susceptibilities (Filardi & Brener, 1987; Urbina, 2010). However, the efficacy of both medicines diminishes during the chronic phase of the disease, and in addition, they have significant side effects which can lead to discontinuation of the treatment (Urbina, 2010). Therefore, new and more efficacious compounds for specific treatment of all chagasic patients, regardless of stage of disease development, are urgently needed.

Species of *Pseudomonas* are ubiquitous in the natural world as a consequence of their remarkable metabolic diversity. These bacteria produce a wide range of secondary metabolites, some of them presenting antibiotic activity (Gross & Loper, 2009). Several authors have been shown the efficacy, in vitro and in vivo, of antibiotics produced by bacteria against trypanosomatids that cause leishmaniasis and African trypanosomiasis (Aguiar et al., 2009; Delespaux et al., 2010; Niitsuma et al., 2010; Pimentel-Elardo et al., 2010). In this study, we report for the first time the antitrypanosomal activity of extracellular compounds produced by *Pseudomonas* sp. LV strain against *T. cruzi*. The in vitro cytotoxic activity of the compounds was also evaluated against mammalian cell line.

MATERIALS AND METHODS

Parasite and mammalian cell culture

T. cruzi Y strain (Silva & Nussenzweig, 1953) were maintained by weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964) supplemented with 10% of fetal bovine serum at 28 °C. Log-phase epimastigote forms were obtained from four-day incubation culture. Trypomastigotes were obtained from the supernatant of infected LLCMK₂ cell line after 120 h post-infection at 37 °C. LLCMK₂ cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) heat-

inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2.5 µg/ml amphoterecin B and 5% CO₂ at 37 °C.

Pseudomonas sp. extracellular compounds

The F3D ethyl acetate fraction (F3D-EA) was obtained from the supernatant of 15-day incubation culture of *Pseudomonas* sp. LV strain in nutrient broth supplemented with 100 mg/L CuCl₂.2H₂O according to the procedure described by Oliveira et al. (2011). Stock solution of F3D-EA was prepared in 10% dimethylsulfoxide (DMSO, v/v) to a concentration of 10 mg/mL and added aseptically only once to growth medium at determined concentrations. The DMSO final concentration did not exceed 1%.

Antitrypanosomal activity

Epimastigotes of *T. cruzi* in logarithmic growth phase (1×10^6 cells/mL) were added in glass tubes containing growth medium with 2.5 -30 µg/mL F3D-EA. The cultures were incubated at 28 °C, and cell growth was estimated by direct counting in a hemocytometer (Improved Double Neubauer) after 72 h. The results were expressed as the minimal concentrations of the extract that cause 50% (IC_{50/72h}) and 90% (IC_{90/72h}) of growth inhibition compared to the control. Tubes containing only medium and medium plus 1% DMSO served as growth and sterility controls. Benznidazole was used as the reference drug. The experiment was performed in duplicate in two different occasions.

Interaction with host cells

The LLCMK₂ cells were added to a round cover glass in a 24-well culture plate containing growth medium at a density of 2.5×10^5 cells/well and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Trypomastigotes at a protozoan cell ratio of 20:1 were inoculated into the monolayer and the plate was incubated for 24 h. After this period, the plates were washed three times with sterile 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.0 to remove the extracellular parasites. The

fresh culture medium containing 5 and 10 µg/mL of F3D-EA was added to the cell culture, and the plates were incubated for a maximum period of 72 h. The cover glasses of controls and tests were fixed with methanol after 24, 48 and 72 h (Merck, Brazil), stained with Giemsa and prepared in ERV-Mount resin. The percentage of infected host cells and the internalization index (number of infected cells X mean of amastigotes per cell) were determined by direct counting 200 cells in a light microscopy.

Citotoxicity assay

The LLCMK₂ cell line was cultured into 96 well culture plate (Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 2.5×10^4 cells/well as described above, and incubated for 24 h. At confluence, non-adherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of F3D-EA (1 to 2,000 µg/mL) were added to each well containing the cells, and the plates were incubated for 72 h. Cells cultured in growth medium alone or in the presence of 1% DMSO were used as controls. Cell viability was determined by the MTT [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA)] method according to the manufacturer's recommendation. The concentration of the compounds needed to inhibit the viable cells up to 50% by regression analysis correspond the 50% cytotoxic concentration (CC_{50/72h}) and the selectivity index (SI) were calculated using this equation: $SI = CC_{50}/IC_{50}$.

Electron microscopy

Epimastigotes treated with F3D-EA at IC_{50/72h} and IC_{90/72h} were fixed for 2 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. For scanning electron microscopy, small drops of the sample were placed on the poly-L-lysine coated coverslips, dehydrated in different concentrations of graded ethanol, critical-point dried in CO₂, coated with gold and observed in a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

Statistical analysis

The results were evaluated by Student's t-test using the software GRAPHPAD PRISM version 4.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). A P value less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Epimastigotes growth inhibition and cytotoxicity for mammalian cells

The inhibitory effects of F3D-EA on replicating epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain are presented in Figure 1. A dose-dependent antitrypanosomal effect was observed and total growth inhibition was detected when the epimastigotes were treated with concentrations over than 30 $\mu\text{g/ml}$. The $\text{IC}_{50/72\text{h}}$ and $\text{IC}_{90/72\text{h}}$ calculated for F3D-EA was 17.5 $\mu\text{g/ml}$ and 22.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The $\text{IC}_{50/72\text{h}}$ for benznidazole was 2.5 $\mu\text{g/ml}$. It was not possible to determine the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) of F3D-EA to LLCMK₂ cells since with the highest concentration tested (2,000 $\mu\text{g/ml}$) around 84% (Figure 2) of the cells were viable, according to the MTT assay. The CC_{50} of benznidazole was 200 $\mu\text{g/ml}$. The selectivity indexes were > 114.3 and 80 for F3D-EA and benznidazole, respectively.

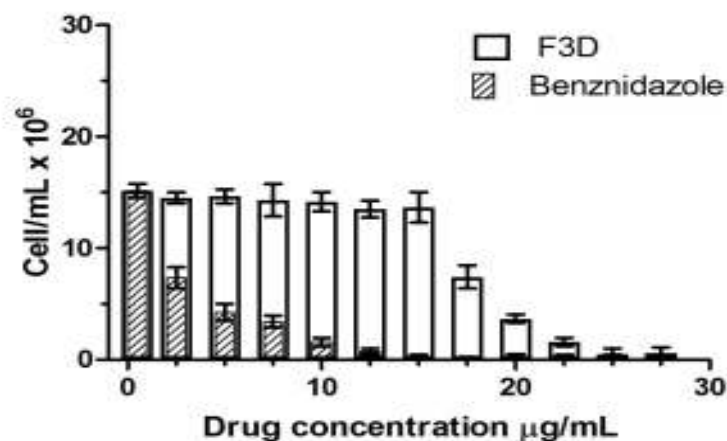


Figure 1 – Effect of different concentrations of the extract obtained from *Pseudomonas* sp. on the proliferation of epimastigotes, after 72 h of treatment. Epimastigotes were incubated for 72 h at 28 °C.

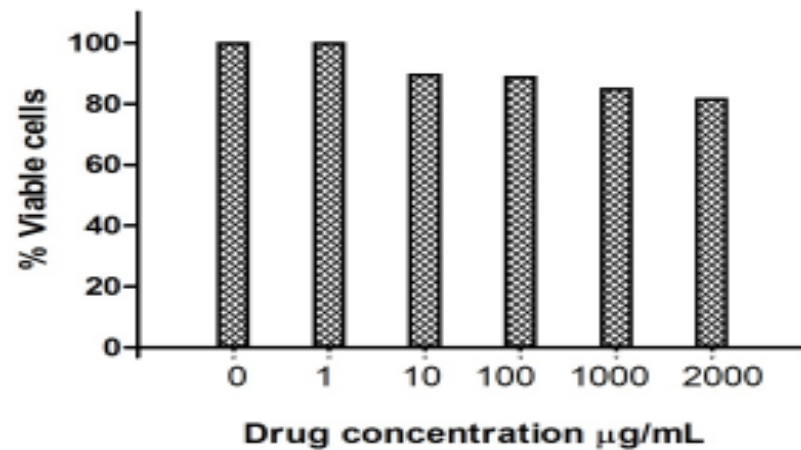


Figure 2 – Cytotoxicity analysis with the MTT method in LLCMK₂ cells after 72 h of treatment. The *Pseudomonas* extract was added in different concentrations of 1 – 2000 µg/ml.

Interactions with the host cell

The effect of F3D-EA on the intracellular amastigotes was determined by treating infected LLCMK₂ cells during 24, 48 and 72 h of incubation. There was a decrease in the percentage of LLCMK₂-infected and treated cells as compared to control (Figure 3) No significant difference was observed for both, F3D-EA concentration and the time of incubation. On the other hand, no significant difference was observed in the number of amastigotes per infected cell.

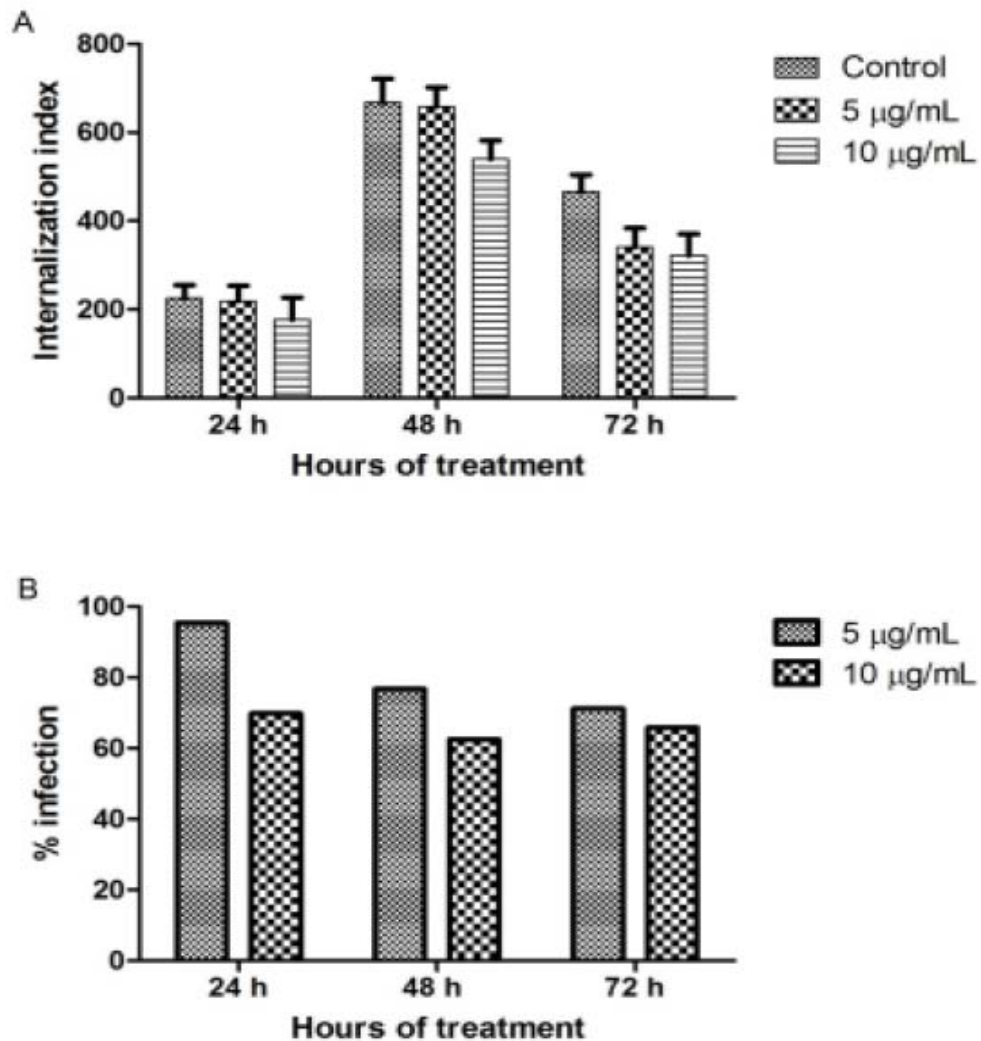


Figure 3 – Effect of the extract obtained from *Pseudomonas* sp. on the proliferation of amastigote form, after 24, 48 and 72 h of treatment. Two concentrations were used 5 and 10 µg/ml. The internalization index (A) and percent of infection (B) was calculated. The control is estimated as 100%.

Morphological and changes

The morphological alterations provoked by F3D-EA were visualized by scanning electron microscopy and are showed in Figure 4. The treatment of epimastigotes with $IC_{50/72h}$ and $IC_{90/72h}$ of the extract resulted in alteration of the cell shape. The concentration of IC_{50} caused distortion of the parasite body and blebs formation near the basal body region. The treatment with IC_{90} also caused a decrease in cell length.

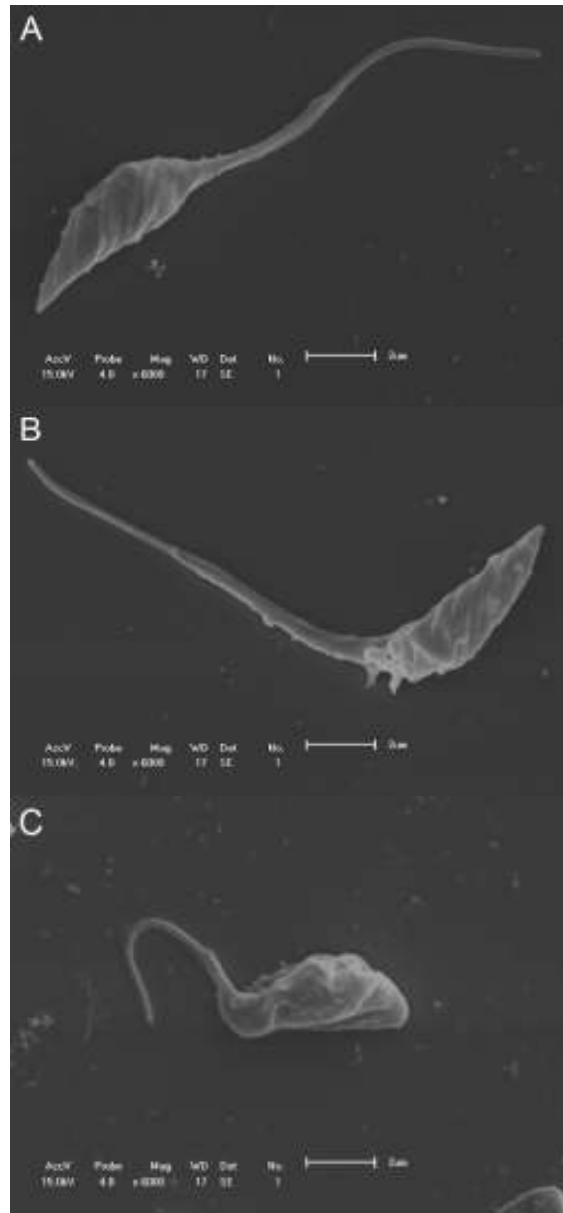


Figure 4 – Scanning electron microscopy of epimastigote forms of *T. cruzi* after 72 h of treatment. (A) Untreated control; (B) IC_{50} treatment; (C) IC_{90} treatment. Bars = 2 μ m.

DISCUSSION

As there is no vaccine against *T. cruzi* infection, chemotherapy remains one important measure for the control of Chagas disease. However, as mentioned before, there are significant limitations of currently available medicines. In attempts to find more effective and safer medicines for Chagas disease, many natural and synthetic compounds have been assayed against *T. cruzi* (Urbina, 2010;

Izumi et al., 2011). However, only a limited number of synthetic compounds (such as, azoles derivatives) have moved to clinical trial (Dujardin et al., 2010).

Today, most of the antibiotics in medical use are derivatives of natural products of microorganisms (Rokem et al., 2007). Several bacteria metabolites, alone or in association with others compounds, have been shown the potential antitrypanosomal activities against trypanosomatid members, as mentioned before (Aguiar et al., 2009; Delespaux et al., 2010; Niitsuma et al., 2010; Pimentel-Elardo et al., 2010). This study demonstrates for the first time the biological activity of compounds obtained from the supernatant of *Pseudomonas* sp. growth medium, against *T. cruzi*.

The F3D-EA showed an inhibitory effect on epimastigotes growth. Although the IC_{50} concentration for epimastigote forms of F3D-EA was higher than benznidazole value, the bacterium derivative compounds seems to be more selective for the parasite than host cells. In addition, the F3D-EA provoked a decrease in the number of LLCMK₂ cells infection by the parasite. The F3D-EA caused severe morphological alterations on epimastigotes as observed by scanning electro microscopy. Similar observations were described by Oliveira et al. (2011) for *Xanthomonas citri*, the etiological agent of citrus canker, treated with this fraction. After six hours exposure to F3D-EA, there was a decrease in bacterium length and it seems to be shrunken according to those authors.

Rhizoxins, the 16-membered polyketide macrocyclic lactone produced by *Burkholderia rhizoxinica* (Partida-Martinez & Hertweck, 2005) are known to bind to β -tubulin, interfering with microtubule assembly (Takahashi et al., 1987) being responsible for the antifungal (Iwasaki et al., 1984) and antitumoral (Tsuruo et al., 1986) activities.

Among trypanosomatids, the cell shapes are defined by their internal subpellicular microtubules, which are cross-linked to each other and to the plasma membrane (Gull, 1999). Considering the effects on epimastigotes morphology, we hypothesize that F3D-EA may act on microtubules organization or polymerization. However, further studies are warranted to identify the chemical structure of the active compound and to understand the effects provoked by the treatment with this bacterium derivative compound.

The production of secondary metabolites in *Pseudomonas* spp., is exclusive of specific strains and the genes responsible for their biosynthesis are

located in the flexible genome of the bacterium. In this sense, these gene clusters can be located in different regions of the chromosome as well as in plasmids, bacteriophages or transposable elements (Gross & Loper, 2009). The production of active extracellular metabolites by the *Pseudomonas* sp. LV strain, used in this study, seems to be triggered by copper, since in the absence of this inducer, no biological activity was detected in the bacterium culture supernatant (Oliveira et al., 2011). In *Streptomyces* sp., some essential enzymes from the antibiotic biosynthesis pathway are copper-binding/containing proteins (Worrall & Vijgenboom, 2010). However, the role of copper ions on expression of compounds with antimicrobial activities by *Pseudomonas* sp. strain is unknown.

Altogether, the results highlight the potential of *Pseudomonas* to produce antitrypanosomal compounds and stimulate to move on to the next phases of identification of active molecules. Such studies are underway by our research group and in the future, purified molecules will be tested against *T. cruzi*.

CONCLUSIONS

The present study constitutes the first report on antitrypanosomal activity of extracellular compounds produced by *Pseudomonas* sp. LV strain against *T. cruzi*. The compound F3D-EA showed an inhibitory effect on epimastigote growth and exhibited low cytotoxic activity towards mammalian cells. Thus, these compound is a potential source for the development of new compound for Chagas disease chemotherapy.

REFERENCES

- AGUIAR, M. G.; SILVA, D. L., NUNAN, F. A.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, L. A. (2009). Combined topical paromomycin and oral mitefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**, 1234-1240.
- CAMARGO, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **6**, 93-100.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida no homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1**, 159-218.
- DELESPAUX, V.; VITOULEY, H.S.; MARCOTTY, T.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; ROY, K.; GEERTS, S.; VAN DEN BOSSCHE, P. (2010). Chemosensitization of *Trypanosoma congolense* strains resistant to isometamidium chloride by tetracyclines and enrofloxacin. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **4**, e828.
- DUJARDIN, J.C.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D.; CROFT, S.L.; OLESEN, O.F.; SPÄTH, G.F. (2010). Collaborative actions in anti-trypanosomatid chemotherapy with partners from disease endemic areas. *Trends in Parasitology*, **26**, 395-403.
- FILARDI, L.S.; BRENER, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**, 755-759.
- GROSS, H.; LOPER, J.E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, **26**, 1408-1446.

- GULL, K. (1999). The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annual Review of Microbiology*, **53**, 629-655.
- IWASAKI, S.; KOBAYASHI H.; FURUKAWA, J.; NAMIKOSHI, M.; OKUDA, S.; SATO, Z.; MATSUDA, I.; NODA T. (1984). Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VII. Structure of a phytotoxin "rhizoxin" produced by *Rhizopus chinesis*. *The Journal of Antibiotics*, **37**, 354-362.
- IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, in press. DOI: 10.1039/C0NP00069H.
- NIITSUMA, M.; HASHIDA, J.; IWATSUKI, M.; MORI, M.; ISHIYAMA, A.; NAMATAME, M.; NISHIHARA-TSUKASHIMA, A.; MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; YAMADA, H.; OTOGURO, K.; SHIOMI, K. ; OMURA, S. (2010). Sinefungin VA and dehydrosinefungin V, new antitrypanosomal antibiotics produced by *Streptomyces* sp. K05-0178. *The Journal of Antibiotics*, **63**, 673-679.
- OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; JESUS ANDRADE, C.G.T.; ANDRADE, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, in press. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.008.
- PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; HERTWECK, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, **437**, 884-888.
- PIMENTEL-ELARDO, S.M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T.S.; IRELAND C.M.; MOLL, H. ; HENTSCHEL, U. (2010). Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine Drugs*, **8**, 373-380.
- ROKEM, J. S.; LANTZ, A.E.; NIELSEN, J. (2007). Systems biology of antibiotic productions by microorganisms. *Natural Product Reports*, **24**, 1262-1287.

- SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z.E. (2010). Chagas disease: a Latin America health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, **115**, 14-21.
- SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clinica Biológica*, **20**, 191-207.
- TAKAHASHI, M.; IWASAKI, S.; KOBAYASHI, H.; OKUDA, S.; MURAI, T.; SATO, Y. (1987). Rhizoxin binding tubulin at the maytansine-binding site. *Biochimica et Biophysica Acta*, **926**, 215-223.
- TSURUO, T.; OH-HARA, T.; IIDA, H.; TSUKAGOSHI, S.; SATO, Z.; MATSUDA, I.; IWASAKI, S.; OKUDA, S.; SHIMIZU, F.; SASAGAWA, K.; FUKAMI, M.; FUKUDA, K.; ARAKAWA, M. (1986). Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristineresistant sublines. *Cancer Research*, **46**, 381-385.
- URBINA, J. (2010). Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, **115**, 55-68.
- WORRALL, J. A. ; VIJGENBOOM, E. (2010). Copper mining in *Streptomyces*: enzymes, natural products and development. *Natural Product Reports*, **27**, 742-756.