



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRIPANOCIDA DO
EUPOMATENÓIDE-5 POR MEIO DE ABORDAGENS DE
BIOLOGIA CELULAR E BIOQUÍMICA: UM POSSÍVEL
MECANISMO DE AÇÃO**

Londrina
2010

KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRIPANOCIDA DO
EUPOMATENÓIDE-5 POR MEIO DE ABORDAGENS DE
BIOLOGIA CELULAR E BIOQUÍMICA: UM POSSÍVEL
MECANISMO DE AÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P384a Pelizzaro-Rocha, Karin Juliane. Avaliação do efeito tripanocida do eupomatenóide-5 por meio de abordagens de biologia celular e bioquímica : um possível mecanismo de ação / Karin Juliane Pelizzaro-Rocha. – Londrina, 2010.
77 f. : il.

Orientador: Celso Vataru Nakamura.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Tripanosoma cruzi – Teses. 2. Chagas, Doença de – Teses. 3. Protozoários patogênicos – Teses. 4. Piperacea – Uso terapêutico – Teses. 5. Microbiologia médica – Teses. I. Nakamura, Celso Vataru. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.61

KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TRIPANOCIDA DO EUPOMATENÓIDE-5 POR
MEIO DE ABORDAGENS DE BIOLOGIA CELULAR E BIOQUÍMICA:
UM POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
UEL - Londrina – PR

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

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
Unicamp – São Paulo - SP

Londrina, 23 de Fevereiro de 2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, que me iluminou em todos os momentos. Aos meus pais Nivaldo e Sandra, e minha irmã Kaline pelo amor, atenção e incentivo constante e principalmente por acreditarem em mim.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos e no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho nunca é realizado com o esforço de uma única pessoa, mas sim com o apoio de uma equipe, e por isso o sucesso alcançado com o resultado não é mérito apenas de um, mas de todos que contribuíram com muito carinho, atenção e incentivo na conquista deste trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Celso Vataru Nakamura pela orientação, amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho, assim como o incentivo no aperfeiçoamento contínuo e aprimoramento dos meus estudos.

À Profa. Dra. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager pela co-orientação, pelo apoio e confiança depositada em mim.

Aos professores Tânia Ueda-Nakamura, Benício Alves de Abreu Filho, Benedito Prado Dias Filho e Valdecir Farias Ximenes, pelos conselhos valiosos e pela ajuda oportuna.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuírem para minha formação profissional e aos colegas do mestrado, pela companhia nos bons e maus momentos.

À Kaline Cristiane Pelizzaro Rocha, Érika Izumi e Simone Rochtaschel Foss pela valorosa amizade, convivência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Adriana Oliveira dos Santos, Andréa Mayumi Koroishi, Ângelo de Oliveira Caleare, Bruna Milagres Ribeiro, Cleyton Eduardo Mendes de Toledo, Eliana Harue Endo, Elizandra Aparecida Britta, Francielle Pelegrin Garcia, Gabrielle Araújo Pedroso, Gislaine Franco de Moura Costa, Helena Teru Takahashi, Jackeline Tiemy Guinoza Siraichi, Jesieli Beraldo, Jonathan Gabriel Pinheiro, Josiane Barros Chiaramonte, Karine Zanoli, Kelly Silvério Góes, Letícia Maria Bandeira, Ligia Fernanda Ceole, Marco Antonio Costa, Milene

Valeria Lopes, Patrícia Regina Santos, Phercyles Veiga dos Santos, Raissa Bocchi Pedroso, Rodrigo Hinojosa Valdez, Samara Requena Nocchi, Tatiana Shioji Tiuman pelo adorável convívio, companheirismo e incentivo, por compartilhar momentos importantes para nossas vidas, assim como pela amizade, alegria e momentos de descontração no dia a dia de laboratório.

A todos da minha família, meus pais Nivaldo e Sandra e minha irmã Kaline, que com amor e compreensão, torceram por mim, ajudando a vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado e grande amigo João Eduardo que sempre estive ao meu lado e me incentivou com carinho caminhar para a realização dos meus sonhos.

As Instituições Financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), PRONEX/Fundação Araucária pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

E a todos que contribuíram para a concretização deste sonho, muito obrigada!

“Em todos os níveis, o maior obstáculo à transformação do mundo é que nos falta a clareza e imaginação para imaginar que poderia ser diferente.”

Roberto Unger

ROCHA, Karin Juliane Pelizzaro. **Avaliação do efeito tripanocida do eupomatenóide-5 por meio de abordagens de biologia celular e bioquímica: um possível mecanismo de ação.** 2010 77 f Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada por atingir milhões de pessoas, mas não dispor de um tratamento eficaz e adequado. O agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi* que apresenta um ciclo de vida complexo, alternando entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Na busca por medicamentos mais efetivos e menos tóxicos, a pesquisa de princípios ativos para a produção de formulações farmacêuticas se torna necessária e prioritária. Nos últimos tempos, o uso de plantas medicinais para este fim tem crescido em todo o mundo, inclusive no Brasil. Dentre as diversas plantas utilizadas como remédios pela população, pode-se citar a espécie *Piper regnellii* var. *pallescens* popularmente conhecida como “pariparoba”. São diversos os efeitos terapêuticos populares de extratos de *P. regnellii* encontrados na literatura, como, desobstruents, diuréticos, emolientes, e cicatrizante de feridas. Estudos recentes mostraram a atividade antiproliferativa de quatro neolignananas purificadas de extratos de folhas de *P. regnellii* var. *pallescens* contra *T. cruzi*. Dentre as neolignananas o eupomatenóide-5, na concentração de 23,8 µM, provocou alterações morfológicas e ultraestruturais importantes e apresentou mais ativo e menos tóxico do que o benzonidazol, droga utilizada no tratamento da doença de Chagas. A proposta do presente trabalho foi avaliar o efeito do eupomatenóide-5 em formas tripomastigotas e investigar o possível mecanismo de ação em *T. cruzi*. A substância apresentou atividade sobre as formas tripomastigotas, na qual análises ultraestruturais mostraram efeito na membrana e a formação de vacúolo, confirmando seu potencial tripanocida. Epimastigotas tratadas com 23,8 µM de eupomatenóide-5 apresentaram inibição de crescimento de 41,8% e quando desafiadas com concentrações não-tóxica (20 µM) e tóxica (100 µM) de H₂O₂ uma inibição do crescimento de 50,6 e 92,4% foi observado, respectivamente, com 120 h de incubação. Além disso, o tratamento com eupomatenóide-5 causou lipoperoxidação em ambas as formas tripomastigota e epimastigota comparado com o controle. Análise de citometria com rodamina 123 mostrou que o eupomatenóide-5 levou a despolarização da membrana mitocondrial em formas epimastigotas. A substância também aumentou a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase seguida do consumo de H₂O₂ em formas epimastigotas tratadas com 34,0; 85,0 e 170,0 µM por 24 h. Nossos resultados indicam que a ação tripanocida do eupomatenóide-5 pode estar associada com o comprometimento do sistema antioxidante do parasita, levando ao aumento das espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente a morte do parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Eupomatenóide-5. Espécies reativas de oxigênio. Glicose-6-fosfato desidrogenase. Despolarização da membrana mitocondrial.

ROCHA, Karin Juliane Pelizzaro. **Evaluation of the trypanocidal effect of eupomatenoid – through approaches of cell biology and biochemistry: a possible mechanism of action.** 2010 77 f Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Chagas disease is considered a neglected disease that affects millions of people, but does not have an appropriate and effective treatment. The etiologic agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* that presents a complex life cycle alternating between a vertebrate host and an invertebrate. In the search for more effective and less toxic drugs, the research for active compounds to pharmaceutical formulations is necessary and a priority. Recently, the use of medicinal plants with this aim has grown around the world, including Brazil. Among the various plants used as medicines by the population, *Piper regnellii* var. *pallescens* (pariparoba) can be mentioned. There are several popular therapeutic effects of *P. regnellii* extracts found in the literature, as unblocker, diuretic, emollient, and wound healing. Recent studies have shown the antiproliferative activity of four neolignans extracts purified from leaves of *P. regnellii* var. *pallescens* against *T. cruzi*. Among the neolignans, eupomatenoid-5 caused important morphological and ultrastructural alterations and was more active and less toxic than Benznidazole, a drug used to treat Chagas disease. The aim of this study was to evaluate the effect of eupomatenoid-5 in trypomastigote forms and to investigate the possible mechanism of action on *T. cruzi*. The compound was active against trypomastigotes, where ultrastructural analysis showed effect on the membrane and vacuoles formation, confirming their potential trypanocidal. Epimastigotes treated with 23.8 μM of eupomatenoid-5 showed growth inhibition of 41.8% and when challenged with non-toxic concentrations (20 μM) and toxic (100 μM) H_2O_2 an inhibition of 50.6 and 92.4% was observed, respectively, with 120 h of incubation. Furthermore, treatment with eupomatenoid-5 caused lipoperoxidation in both trypomastigote and epimastigote forms compared to control. Cytometric analysis with rhodamine 123 showed that the eupomatenoid-5 led to depolarization of the mitochondrial membrane potential of epimastigotes. The compound also increased the activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) followed by the consumption of H_2O_2 in epimastigote treated with 34.0, 85.0, and 170.0 μM for 24 h. Our results indicate that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 may be associated with impairment of the antioxidant system of the parasite, leading to increased reactive oxygen species and consequently to parasite death.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Eupomatenoid-5. Reactive oxygen species. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Depolarization of mitochondrial membrane potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*. A. Repasto sanguíneo. B. Multiplicação das formas epimastigota no trato digestivo do vetor. C. Liberação das formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com as fezes em decorrência do repasto. D. Multiplicação de amastigotas no interior da célula hospedeira. E. Liberação das formas sanguíneas. Fonte: www.eca.usp.br, acessado em 08/01/2010 19
- Figura 2** – Esquema do metabolismo de hidroperóxidos mediado pela tripanotiona. TR, tripanotiona redutase; T(SH)₂, tripanotiona; TXN, triparedoxina; Prx, triparedoxina peroxidase; ROOH, alquil hidroperóxidos (Krauth-Siegel e Comini, 2008)..... 25
- Figura 3** – Aspecto das folhas da espécie vegetal *P. regnellii* var. *pallenscens*. As folhas são alternas, pecioladas, grandes, com limbo cordiforme, de base simétrica, medindo, quando adultas, de 12,0 a 14,0 cm de largura e de 10,0 a 12,0 cm de comprimento, levemente sulcados próximos a base do limbo (Macrae e Towers, 1984) 29
- Figura 4** – Estrutura química do eupomatenóide-5 [2-(4'-hydroxy-5'-methoxyphenyl)-3-methyl-5(E)-propenylbenzofuran] isolado de *Piper regnellii* var. *pallenscens*..... 31

ANEXO A

- Figure 1** – Chemical structure of eupomatenoid-5, the neolignan isolated from *Piper regnellii* var. *pallenscens* 47
- Figure 2** – Effects of eupomatenoid-5 on the viability of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. The protozoa were cultured for 2 h in the presence or absence of eupomatenoid-5 in concentrations of 3.4, 17.0, 34.0, 85.0, and 170.0 µM. From these results, an

effective concentration (EC₅₀) of 40.5 μM was calculated. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. The results were analyzed as percentages of non-viable cells in relation to untreated parasites. Bars represent standard errors. All results were significant at p≤0.05 compared to the control group53

Figure 3 – Morphological alterations caused by eupomatenoid-5 in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. (A) SEM image of an untreated parasite, showing the typical elongated morphology. (B-C) SEM images of parasites treated with 34.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h reveal apparent leakage of cytoplasmic contents (white arrow). Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. Bars = 1 μm54

Figure 4 – Ultrastructural alterations caused by eupomatenoid-5 in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. (A) TEM image of an untreated parasite, showing the typical elongated morphology with normal kinetoplast (K), flagellum (F), and nucleus (N). (B-D) TEM images of parasites treated with 34.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h reveal separation between the membrane and cytoplasm (arrow) and vacuoles (asterisks). Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. Bar = 1 μm.....54

Figure 5 – Flow cytometry analysis of Rh 123-labeled epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with 34.0 and 51.0 μM of eupomatenoid-5 for 96 h. Arrows correspond to doses tested. Control group is also shown. Typical histograms of at least three independent experiments are depicted56

Figure 6 – G6PD, 6PGD activity, and H₂O₂ consumption by epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5. Cells were incubated in LIT medium with different concentrations of eupomatenoid-5 for 24 h (A) or 96 h (B), G6PD (gray bars), 6PGD (black bars), and H₂O₂ consumption (line). Statistical analyses for enzyme activity: G6PD activity in the treatment with 170.0 μM of eupomatenoid-5 compared to the control and 34.0

μM , $p < 0.05$. 6PGD activity in the treatment with 170.0 μM of eupomatenoid-5 compared to the control, 34.0 μM , and 85.0 μM , $p < 0.01$ at 24 h. Statistical analyses for H_2O_2 consumption: at 24 h, 85.0 μM was significantly different from the control, $p < 0.001$, while 170.0 μM was significantly different from the control and 34.0 μM . At 96 h, 34.0 and 51.0 μM was significantly different from the control, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times.....57

Figure 7 – Trypanocidal action of eupomatenoid-5. The effect of eupomatenoid-5 on *Trypanosoma cruzi* resulted in impairment of the antioxidant system (solid arrow), leading to lipid peroxidation and change in mitochondrion stability (dashed arrow)59

ANEXO B

Figura 1 – Curva de calibração (BSA-albumina bovina) para dosagem de proteína, método de Bradford (Bradford et al., 1976).....73

Figura 2 – Curva de calibração para dosagem de H_2O_2 não-metabolizado por formas epimastigota de *T. cruzi* tratadas ou não com eupomatenóide-5. A-Primeiro experimento. B-Segundo experimento. C-Terceiro experimento75

SUMÁRIO

1	REVISAO BIBLIOGRAFICA	14
1.A	DOENÇA DE CHAGAS E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	14
1.B	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
1.C	SISTEMA ANTIOXIDANTE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> , E SUA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
1.D	PRODUTOS NATURAIS.....	26
1.E	FAMÍLIA PIPERACEA E EUPOMATENÓIDE-5.....	28
2	OBJETIVOS	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – ARTIGO – TRYPANOCIDAL ACTION OF EUPOMATENOID-5 IS RELATED TO THE IMPAIRMENT OF THE ANTIOXIDANT MECHANISM OF <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	45
	ANEXO B – METODOLOGIAS E PARÂMETROS AVALIADOS	66
	CONCLUSÃO	77

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.A DOENÇA DE CHAGAS E *TRYPANOSOMA CRUZI*

A Tripanossomíase Americana, também conhecida como doença de Chagas, foi descrita pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909) quando encontrou vestígio de um parasito flagelado na corrente sanguínea de uma criança em Minas Gerais. Em sua descoberta, Chagas conseguiu estabelecer todos os aspectos epidemiológicos e patológicos da doença, como etiologia, ciclo parasitário, diagnósticos, reservatórios domésticos e silvestres.

A doença de Chagas tem uma grande relevância na saúde pública da América Latina, sendo a segunda enfermidade (após a malária) associada a vetor, em prevalência e mortalidade. A forma pela qual a doença se distribuiu pelo continente está diretamente relacionada com a conquista e colonização das Américas, bem como, o comércio que levou a aglomeração e intensa migração humana, contribuindo na ocupação de novos nichos ecológicos e disseminação do inseto vetor (Dias, 2007). A migração de pessoas infectadas para outras áreas do mundo como Europa e América do Norte, contribuem também para a disseminação da doença nessas áreas.

Um século após a descoberta, estima-se que na América Latina cerca de 15 milhões de pessoas são acometidas por esta enfermidade e que 28 milhões de pessoas estejam vivendo em áreas de riscos (WHO, 2006). No Brasil em torno de 1,6 milhões de pessoas são portadoras da doença. Nos últimos anos foram notificados mais de 500 casos no país, sendo que 90% deles ocorreram na Amazônia Legal (Ministério da Saúde do Brasil, 2007).

Os casos de infecção humana, ou de outros vertebrados, é consequência do contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos contaminados por *T. cruzi*. Outras vias de transmissão incluem: 1) transfusões de sangue ou transplantes de órgãos de doadores infectados, atualmente controlada por legislação; 2) transmissão congênita de mães infectadas, neste caso a transmissão ocorre quando existem ninhos de amastigotas na placenta, e em consequência tripomastigotas originários destes ninhos que podem alcançar a

circulação fetal; 3) transmissão oral que ocorre pela ingestão de alimentos ou substâncias infectadas com fezes ou urina de triatomíneos infectados.

A transmissão da doença de Chagas pela via oral tem sido recentemente o foco de atenção. No Brasil, após o controle da transmissão de *T. cruzi* por *T. infestans* e por transfusão de sangue, o modo mais importante e mais freqüente de transmissão é por via oral (Coura, 2006). Surto da doença de Chagas aguda por contaminação de alimentos tem ocorrido em regiões distintas do país nos últimos cinco anos. Esta via de transmissão é bem estabelecida e documentada (Shikanai-Yasuda et al., 1991, Valente et al., 1999, Camandaroba et al., 2002, Rodríguez-Morales, 2008). O desafio atualmente é a prevenção da transmissão oral através da ingestão de bebidas como o suco de açaí (*Euterpe oleracea*, *E. catínga*) na Amazônia brasileira. Em outros casos documentados de surtos por transmissão oral, o alimento contaminado foi servido em festas de família e em circunstâncias que eram imprevisíveis, como ocorreu em Santa Catarina, no Brasil (Shikanai-Yasuda et al., 1991), e em Caracas, Venezuela (Rodríguez-Morales, 2008). A abordagem para a prevenção destes surtos é baseado na vigilância, prevenção e gestão, semelhante ao controle das doenças transmitidas pelos alimentos.

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasito pertencem à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, e são os chamados hospedeiros invertebrados. Os triatomíneos têm hábito noturno e são hematófagos em todos os estágios da vida, após o repasto sanguíneo defecam liberando juntamente com as fezes as formas infectantes do parasito, sendo, portanto, transmissores em potencial da doença de Chagas.

Três gêneros foram identificados como responsáveis pela transmissão: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*, que juntos abrangem mais de 100 espécies distribuídas por todo o território latino-americano. No Brasil, das 44 espécies identificadas, as mais importantes pelo seu grau de contágio, ou seja, espécies primárias são: *T. infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *P. megistus*, sendo que as espécies *R. neglectus*, *R. nasutus*, *T. rubrovaria* e *T. vitticeps* são consideradas espécies secundárias (Silveira, 1983).

A Organização Mundial de Saúde mostrou em estudos a diminuição de casos pela transmissão vetorial, bem como a diminuição significativa do número

de espécies transmissoras, isso decorre da melhoria nas condições habitacionais e o controle populacional dos vetores pelo uso de inseticidas em áreas circunvizinhas as comunidades em risco (Moncayo, 2003). Em função dessas ações de controle vetorial a partir da década de 1980, em 2006 o Brasil recebeu a Certificação Internacional pela interrupção da Transmissão de doença de Chagas por *T. infestans*, espécie responsável pela maior parte da transmissão vetorial no passado.

A doença de Chagas apresenta-se como uma importante patologia de contexto social, uma vez que constitui uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante. Duas fases são características da doença, uma aguda, correspondente à infecção e disseminação do protozoário no organismo, e uma crônica, relacionada à reprodução sistêmica do parasito. Na fase aguda da doença é comum o paciente apresentar uma lesão inflamatória no local de entrada do parasito chamado chagoma. Quando a entrada deste ocorre pela mucosa do olho, pode-se visualizar após pouco tempo o assim chamado sinal de Romaña, caracterizado pelo inchaço de um dos olhos. A fase aguda, que em geral dura poucas semanas, pode apresentar quadro febril discreto, náuseas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia e em casos mais graves podem ocorrer taquicardia, arritmias cardíacas, podendo evoluir a óbito do paciente (Tanowitz et al., 1992). A evolução da doença para a fase crônica tem início logo após a fase aguda e pode-se distinguir em duas formas, a determinada e a indeterminada. A forma determinada da fase crônica atinge cerca de 10 a 30% dos indivíduos infectados que manifestam os sintomas entre 10 a 20 anos após a infecção como tromboembolia, falência cardíaca, arritmias, aneurismas, mionecroses e hipertrofia miocelular, levando aos casos chagásicos típicos de dilatação no coração, cólon e esôfago (Viotti et al., 1994). A maioria dos casos de doença de Chagas crônica não é sintomática, ocasionando a forma indeterminada que consiste na presença da infecção comprovada por sorologia, porém sem apresentar sinais e sintomas clínicos como alterações cardíacas e digestivas (Dias et al., 2002).

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da tripanossomíase americana. Os protozoários pertencem ao Reino Protista, sub-reino Protozoa e são organismos eucariotos constituídos por uma única célula, caracterizam-se, ainda, por apresentarem as mais variadas morfologias, formas de locomoção, reprodução, bem como processos e nutrição distinta. De acordo com

Neves (2003), o sub-reino Protozoa compreende cerca de 60.000 espécies conhecidas dentre as quais, 10.000 são parasitas de vários animais, plantas e somente algumas dezenas de espécies são capazes de infectar o homem.

Atualmente, os protozoários se dividem em sete filos: Sarcomastigophora, Apicomplexa, Ciliophora, Microspora, Labrinthomorpha, Ascetospora e Myxospora. Dentre os quais, apenas quatro desses apresentam importância quanto à parasitologia humana. No filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, encontram-se protozoários com 1 ou 2 flagelos que se originam de uma abertura, conhecida como bolsa flagelar, normalmente contendo uma estrutura paraflagelar e uma estrutura proeminente, conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de ácido desoxirribonucléico (DNA) localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo corpo do protozoário (De Souza, 2000). Organelas especiais do tipo peroxissoma, conhecidas como glicossomos e microtúbulos subpeliculares são também estruturas características (De Souza, 2000).

A família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida) compreende um grande número de protozoários, alguns dos quais são agentes de importantes doenças, tais como Leishmaniose (*Leishmania*), doença do sono (*Trypanosoma brucei*) e doença de Chagas (*T. cruzi*), afetando homens e animais de interesse veterinário. Outros gêneros são capazes de infectar plantas (*Phytomonas*) ou insetos (*Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina* e *Herpetomonas*). Além disso, os tripanossomatídeos apresentam algumas características especiais que fazem com que eles se constituam em excelentes modelos para o estudo de questões biológicas básicas, incluindo edição e “*trans-splicing*” do RNA mensageiro, organização do DNA extracelular e variação antigênica (De Souza e Motta, 1999).

T. cruzi apresenta, além do cinetoplasto, algumas organelas distintas que desempenham papel importante durante o processo de diferenciação celular, bem como no processo de infecção (Engel et al., 1998). Dentre elas estão o acidocalcissoma, que armazena íons como cálcio, fósforo, sódio, zinco e magnésio para posterior utilização na célula (Docampo e Moreno, 1999); o glicossomo, que possui em seu interior enzimas da via glicolítica entre outras (Michels et al., 2006); e o reservossomo, responsável pelo armazenamento de lipídeos e proteínas, em especial as cisteínas proteases denominadas cruzipaínas.

Este parasita é representado por um conjunto de populações que circulam em hospedeiros mamíferos e insetos vetores. Estas populações, também denominadas isolados ou cepas, apresentam grande heterogeneidade de comportamento biológico como, por exemplo, diferentes graus de virulência para animais experimentais e humanos, variações na sensibilidade aos fármacos e tropismo tissular (Zingales, 1999). A caracterização molecular do parasita tem sido proposta baseada na subdivisão em dois grupos, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII), sendo essa última subdividida em 5 grupos (a-e). Acredita-se que essas subdivisões estejam relacionadas com a evolução dos protozoários juntamente com seus hospedeiros mamíferos principais e também seu potencial patogênico (Zingales, 1999). A TcI estaria presente principalmente no ciclo silvestre e os hospedeiros mais comum seriam mamíferos marsupiais, enquanto que a TcII seria principalmente do ciclo doméstico tendo os tatus como principais hospedeiros. Uma avaliação da distribuição geográfica caracteriza TcI predominante nos países da região amazônica e a TcII nos países do cone sul (Yeo et al., 2005).

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve muitos estágios morfologicamente distintos (Kollien e Schaub, 2000). Com base na forma geral da célula (esférica, piriforme ou alongada), na posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral ou posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral), definem-se as seguintes formas evolutivas para *T. cruzi*: amastigota, epimastigota e tripomastigota. O ciclo de vida é complexo, alternando entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado, com mudanças na sua morfologia de acordo com a fase do ciclo e com o hospedeiro, conforme indicado na Figura 1.

As formas tripomastigotas sanguíneas do parasita podem ser ingeridas pelos triatomíneos, quando se encontram na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. A diferenciação das formas tripomastigota sanguíneas para as formas epimastigota dentro do inseto vetor começa poucas horas após a ingestão e então ocorre a multiplicação do parasita (Kollien e Schaub, 2000). Depois desta multiplicação, a diferenciação de epimastigota a tripomastigota metacíclica (a forma infectiva do parasita no inseto vetor) ocorre no reto do triatomíneo. As formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes ou urina do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Através de uma ferida na pele ou diretamente da mucosa, as formas tripomastigotas metacíclicas podem infectar um variado número de células

do hospedeiro vertebrado. Esta forma rapidamente diferencia-se em amastigotas, que sofrem diversos ciclos de divisão no interior das células do hospedeiro. As amastigotas finalmente diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos que são liberados durante a ruptura da célula infectada podendo infectar outras células do hospedeiro vertebrado, incluindo macrófagos e células do miocárdio, ou reiniciar o ciclo de vida dentro do inseto vetor se for ingerida com o sangue (Garcia e Azambuja, 1991).

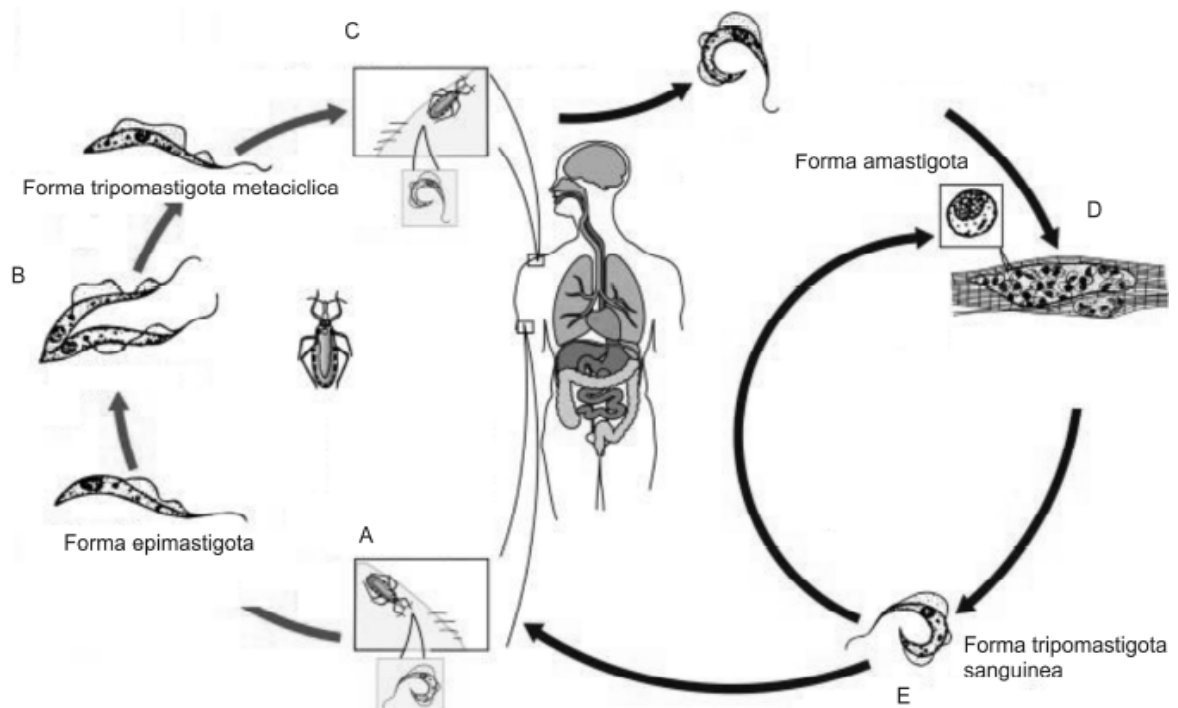


Figura 1 – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*. A. Repasto sanguíneo. B. Multiplicação das formas epimastigota no trato digestivo do vetor. C. Liberação das formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com as fezes em decorrência do repasto. D. Multiplicação de amastigotas no interior da célula hospedeira. E. Liberação das formas sanguíneas. Fonte: www.eca.usp.br, acessado em 08/01/2010.

1.B TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Várias pesquisas têm sido realizadas desde o início do século XX a fim de se obter um medicamento eficaz para o tratamento da doença. Muitas

substâncias sejam de origem natural, sintética ou semi-sintética apresentaram atividade tripanocida *in vitro*, mas estão longe de se tornarem um fármaco aprovado em todos os testes clínicos (Maya et al., 2007). Apesar de imensos esforços investigativos, nenhum fármaco tornou-se disponível para o tratamento da doença desde 1970 quando foram introduzidos os dois fármacos atuais no mercado Benzonidazol (Rochagan[®]) e Nifurtimox (Lampiti[®]) (Coura et al., 2002).

Na falta de vacinas eficazes, a quimioterapia ainda desempenha um papel crucial no tratamento dessa doença. O uso destes fármacos (Benzonidazol e Nifurtimox) é aceito para tratar a fase aguda da doença, entretanto, sua utilização na fase crônica é controverso (Tanowitz et al., 1992). Esses fármacos podem causar toxicidade sistêmica e efeitos adversos que incluem anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão, dermatite, vertigem, entre outros sintomas (Kirchhoff, 2000). Além disso, existem estudos que mostram atividade mutagênica e de danos ao DNA (Zahoor et al., 1987), assim como interferência em diversos processos metabólicos normais das células (Castro et al., 2006). Outro fator que pode também influenciar na ação do fármaco é a resistência ao tratamento por parte das diferentes cepas (Filardi e Brener, 1987). Portanto, há uma necessidade de se encontrar drogas mais eficazes e seguras para o tratamento da doença de Chagas.

O mecanismo de ação do Benznidazol e Nifurtimox parece envolver a produção de radicais nitroreduzidos altamente reativos que mediam a formação de anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (Repetto et al., 1996). Em quantidade muito maior do que a produzida pelo Benznidazol, as espécies reativas de oxigênio produzidos pelo Nirfutimox causam sérios efeitos colaterais (Giulivi et al., 1988).

Atualmente sabe-se que os efeitos tóxicos do Nifurtimox e do Benzonidazol são consequências da diminuição significativa nos níveis de glutathiona e de tripanotiona causados pela conjugação com metabólitos de ambos os fármacos. A concentração de tripanotiona e de glutathiona seria reduzida a um ponto que, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos pelo ciclo redox, ou os radicais livres produzidos no metabolismo normal da célula, aumentariam causando danos as macromoléculas celulares (Maya et al., 1997, Krauth-Siegel et al., 2003). Dessa forma, novos quimioterápicos são urgentemente necessários para

a prevenção e o controle dessa doença parasitária. Uma das principais oportunidades é através da descoberta de novos agentes antiparasitários de origem natural (loset, 2008).

Contra a transmissão transfusional, a Organização Mundial de Saúde (OMS) indica a utilização do cristal violeta nos Bancos de Sangues do Brasil de acordo com Nussenzweig et al. (1953) que relataram a ação tripanocida deste composto. O cristal violeta possui ação fotodinâmica (Docampo et al., 1988), onde a luz visível causa sua fotorredução a um radical livre centrado no carbono (Reszka et al., 1986). Este radical se auto-oxida sob condições aeróbicas gerando ânion superóxido (O_2^-), e conseqüentemente, por dismutação, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reszka et al., 1986; Docampo et al., 1988).

Para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficientes é importante a seleção do alvo terapêutico, o que permite uma busca por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. O maior foco para descoberta de novos fármacos anti-tripanosomias nas últimas décadas tem sido a identificação e caracterização bioquímica, estrutural e molecular dos alvos (Croft et al., 2005). Os protozoários, por serem eucariotos, apresentam processos metabólicos que se assemelham mais aos das células do hospedeiro humano do que aqueles apresentados pelos patógenos bacterianos. Dessa forma, os fármacos anti-protozoários causam sérios efeitos tóxicos para os hospedeiros (Murray et al., 2002), particularmente em células com alta atividade metabólica, tais como: células neuronais, tubulares renais, intestinais e germinativas na medula óssea (Harvey et al., 1998; Delorenzi et al., 2001).

A pesquisa por novos compostos capazes de gerar estresse oxidativo em *T. cruzi* é um alvo atrativo, visto a deficiência do mecanismo de defesa contra espécies reativas por parte do parasita, quando comparado ao hospedeiro mamífero, e a diferença substancial desse sistema com o da célula hospedeira. Outro alvo interessante que tem sido explorado por pesquisadores é a cruzipaina, uma protease lisossomal de *T. cruzi* que participa na nutrição, diferenciação e interação do parasito com a célula hospedeira (Cazzulo, 2002; Aparicio et al., 2004).

Utilizando estas estratégias, nos últimos anos a busca de princípios ativos derivados de compostos naturais com ação tripanocida tem aumentado, principalmente pela vantagem de mostrar eficiência e baixa ou nenhuma

citotoxicidade (Nagafuji et al., 2004; Luize et al., 2006a; Sülsen et al., 2006; Izumi et al., 2007). Diversos produtos têm mostrado atividade tripanocida, como o extrato aquoso de *Camellia sinensis* que parece inibir a enzima arginina quinase do parasita, interferindo assim com seu metabolismo (Paveto et al., 2004). Neolignanas isoladas de folhas de *Piper regnellii* (Luize et al., 2006a), extrato etanólico obtido de *Populus nigra* (Dantas et al., 2006), óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* (Santoro et al., 2007), e ainda isoquinolinas isoladas de *Ocotea lancifolia* que possuem intensa atividade sobre tripomastigotas (Fournet et al., 2007).

1.C SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TRYPANOSOMA CRUZI E SUA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* é exposto a diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs), de enxofre (EREs) e de nitrogênio (ERNs) geradas pelo metabolismo aeróbico do parasita, pela resposta imune do hospedeiro e, ocasionalmente, aquelas espécies reativas liberadas ou geradas pelos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas (Turrens, 2004). As EROs podem levar à ruptura da membrana celular, inativação de enzimas essenciais, mutagênese e danos à maquinaria de reparo de DNA. *T. cruzi* possui diferentes mecanismos de detoxificação para manter a homeostase redox, a maioria deles baseados na via tripanotiona (Fairlamb et al., 1985).

O sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* é caracterizado por uma capacidade limitada em metabolizar peróxidos, e, portanto abre oportunidades terapêuticas através do dano mediado por EROs (Docampo, 1990; Wilkinson et al., 2002). O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade antioxidante da célula. O acúmulo de EROs leva ao estresse oxidativo nas quais as células respondem ativando vários mecanismos de defesa, ou, morrendo. Em baixos níveis, EROs agem como moléculas sinalizadoras em vários processos intracelulares, exercendo importante papel fisiológico na sinalização celular e proliferação (Davies et al., 1995; Wiese et al., 1995; Mitsumoto et al., 2001; Kim et al., 2001). Enquanto que altos níveis de

EROs pode levar ao dano de constituintes celulares, como lipídeos, proteínas e DNA e assim ameaçar a integridade da célula, EROs de origem mitocondrial têm sido descritos como moléculas sinalizadoras de autofagia, quer para sobrevivência ou morte celular (Scherz-Shouval e Elazar, 2007).

A autofagia é um processo pelo qual as células eucarióticas degradam e reciclam macromoléculas e organelas, e, portanto apresentam um papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo. Este processo é crucial para manter o equilíbrio metabólico e a reciclagem das estruturas celulares durante o crescimento e desenvolvimento celular (Reggiori e Klionsky, 2005) e o desequilíbrio desencadeia um caminho de morte celular.

Em mamíferos, o estresse oxidativo é prevenido por quatro enzimas antioxidantes: (I) Cu/Zn-Superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD) (McCord and Fridovich, 1969; Fridovich, 1995), essa enzima é responsável pela conversão do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio, localiza-se no citoplasma e no espaço inter-membrana da mitocôndria (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001); (II) Mn-SOD (Fridovich, 1995), que tem a mesma ação da enzima Cu/Zn-SOD, mas é encontrada apenas na matriz mitocondrial; (III) glutathiona peroxidase, responsável pela redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido que utiliza glutathiona reduzida como doador de elétrons (Ursini et al., 1995); e (IV) catalases, que são responsáveis pela dismutação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Chance et al., 1979). Além dessas, uma série de outras moléculas reagem com oxigênio e previnem a oxidação de importantes biomoléculas (vitamina E, vitamina C, ácido úrico, ubiquinona).

O parasita *T. cruzi*, bem como outros tripanosomatídeos, apresenta algumas peculiaridades bioquímica, morfológica e genética em relação à célula hospedeira que se destacam na busca por um alvo terapêutico, dentre elas o metabolismo redox. Estudos de sequenciamento do genoma de *T. brucei* (Berriman et al, 2005), *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005) e *Leishmania major* (Ivens et al., 2005) tem revelado que os tripanossomatídeos perderam genes para glutathiona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR) bem como, para catalase e glutathiona peroxidase dependente de selênio. Enquanto em muitos organismos eucariotos o sistema glutathiona (GSH)/GR e tioredoxina (Trx)/TrxR mantém a homeostase redox

intracelular, nos tripanosomatídeos o sistema tripanotiona é essencial para a sobrevivência deste parasito (Ariyanayagam e Fairlamb; 2001; Turrens, 2004).

O sistema tripanotiona constitui-se de um metabolismo redox baseado em moléculas de baixo peso molecular N1,N8-bis(glutathionil)espermidina; T(SH)₂ (Fairlamb et al., 1985) e tripanotiona redutase (TR), que mantém T(SH)₂ na forma reduzida. Neste sistema, a glutathione (GSH), principal composto antioxidante sulfidrilado das células de mamíferos, está presente no parasito em baixas concentrações, estando a maior parte (cerca de 70%), na forma de tripanotiona (T(SH)₂). A T(SH)₂ é um tiol de baixo peso molecular consistindo de duas moléculas GSH ligadas covalentemente por uma espermidina (Irigoín et al., 2008). A síntese de T(SH)₂ é catalisada por uma enzima dependente de ATP restrita aos tripanosomatídeos, a tripanotiona sintetase (Holwill e McGregor, 1975).

A ausência desse sistema tripanotiona nos mamíferos juntamente com a perda de algumas enzimas antioxidantes pelo parasito, bem como sua capacidade limitada em lidar com o estresse oxidativo, quando comparado com o da célula hospedeira torna essa via metabólica um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos.

Resumidamente, este sistema (Figura 2) é mediado por uma série de reações em cascata na qual inicialmente o dissulfeto de tripanotiona (TS₂) é reduzido a dihidrotriplanotiona (T(SH)₂) pela tripanotiona redutase (TR), que é dependente de NADPH. Numa etapa final Triparedoxina (TXN), reduz hidroperóxidos com gasto de T(SH)₂, mas somente na presença de triparedoxina peroxidase (TXNP_x) (Lopez et al., 2000) que é uma proteína antioxidante e sua atividade peroxidásica confere capacidade para participar da detoxificação de hidroperóxidos (Flohé et al., 1999). Esta cascata de reação é característica de todos os tripanosomatídeos (Ariyanayagam e Fairlamb; 2001; Turrens, 2004) e distinta de qualquer sistema de detoxificação de hidroperóxidos do organismo hospedeiro.

O NADPH utilizado no processo de detoxificação é gerado a partir das reações catalisadas por glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) na via das pentoses fosfato. G6PD é essencial para a sobrevivência de células de mamíferos quando o dano é produzido por EROs. Essa enzima (G6PD) que catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconolactona com a produção concomitante de NADPH, é a primeira

enzima do ramo oxidativo na via das pentoses, e sua atividade é regulada pela relação $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Igoillo-Esteve e Cazzulo, 2006). Acredita-se que a G6PD é parte de um mecanismo indutivo, pelo qual a célula responde ao estresse oxidativo, uma vez que em diferentes tipos de células há indução da G6PD, por uma variedade de agentes químicos que aumentam a concentração intracelular de radicais de oxigênio (Ursini et al., 1997; Salvemini et al., 1999; Filosa et al., 2003).

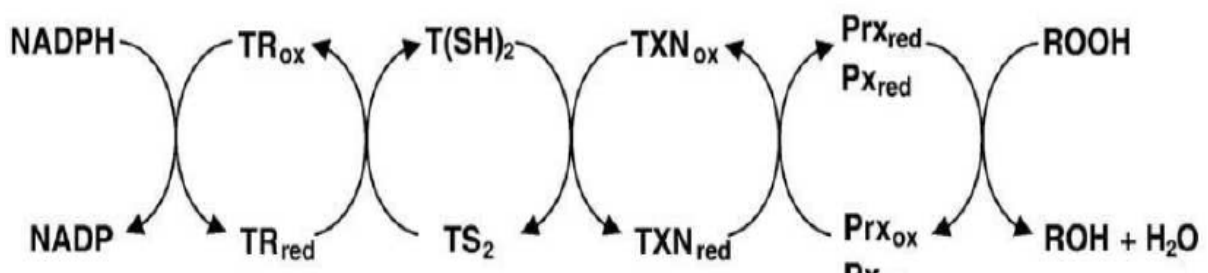


Figura 2 – Esquema do metabolismo de hidroperóxidos mediado pela tripanotona. TR, tripanotona redutase; T(SH)₂, tripanotona; TXN, triparedoxina; Prx, triparedoxina peroxidase; ROOH, alquil hidroperóxidos (Krauth-Siegel e Comini, 2008).

A triparedoxina (TPN), uma proteína relacionada à tioredoxina, catalisa a redução da triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPx) às custas da tripanotona. Para *L. Infantum* uma homóloga a TPN está localizada na mitocôndria (Castro et al., 2004) e apesar de ter sido identificada em *T. cruzi* e em *T. brucei* (Wilkinson e Kelly, 2003) sua localização ainda não foi confirmada.

As peroxidredoxinas de tripanossomatídeos diferem dos mamíferos por serem dependentes de tripanotona. As triparedoxina peroxidases tem sido estudada nos protozoários *Crithidia fasciculata* (Montemartini et al. 1998), *T. brucei* (Tetaud et al. 2001), *Leishmania* spp. (Castro et al. 2002; Lin et al. 2005), e *T. cruzi* (Wilkinson et al. 2000; Lopez et al. 2000). Em *T. cruzi* estão localizadas no citosol (TcCPx) e na mitocôndria (TcMPx) (Wilkinson et al, 2000). A compartimentalização protege a célula contra o efeito tóxico de peróxidos exógenos e endógenos de maneira diferente. Devido a essa localização TcCPx pode ser importante durante o estresse oxidativo gerado pelo meio externo, enquanto que em eventos de estresse oxidativo gerados pela própria célula a TcMPx seria mais ativa (Lyer et al., 2008).

Outras enzimas compõem ainda o sistema antioxidante do parasita. Dentre elas está a enzima superóxido dismutase ferro dependente (Fe-SOD) que atua na dismutação de ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Piacenza et al., 2009) e difere da enzima homóloga do hospedeiro por ser dependente de Cu/Zn ou Mn. Outro tiol, denominado ovotiol (N^1 -metil-4-mercaptohistidina), foi identificado em *Leishmania* spp, *C. fasciculata*, *T. cruzi* e *T. brucei*, agindo como sequestrante não enzimático de H_2O_2 (Ariyanayagam e Fairlamb, 2001) dependente do sistema tripanotiona / tripanotiona redutase. Em *T. cruzi* sua atividade exerce um papel minoritário no metabolismo de peróxidos quando comparados ao sistema envolvendo peroxidases dependente da tripanotiona presente nesses organismos (Ariyanayagam e Fairlamb, 2001).

Em 2006, Miranda e colaboradores sugeriram a participação da enzima arginina quinase em sistemas de resposta ao estresse oxidativo, em *T. cruzi*. Esta é uma enzima-chave na gestão da energia celular e também está envolvida no controle de pH e mecanismo de resposta nutricional.

1.D PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana (Schenkel et al., 2003). O conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em seus ritos pagãos, bem como das propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais, acompanha o homem há muitos milênios. A medicina chinesa tem contribuído desde muito tempo para a descoberta de novos produtos naturais bioativos. Um exemplo clássico desta importante contribuição pode ser ilustrado pelo isolamento de terpenos polioxigenados do extrato de árvore conhecida como ginkgo (*Ginkgo biloba*).

Inicialmente, o emprego das plantas no tratamento das doenças se dava de maneira empírica, cujos conhecimentos foram passados ao longo do tempo de geração (Cunha et al., 2003). Diante das limitações dos fármacos existentes, a utilização desses conhecimentos folclóricos para a síntese de substâncias derivadas

de plantas tornou-se uma alternativa bastante promissora, principalmente das populações de países em desenvolvimento, onde segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80% das pessoas fazem uso de ervas medicinais (Calixto, 2000). Dessa forma, observa-se que apesar do grande avanço na medicina moderna, as plantas contribuem significativamente nos cuidados com a saúde.

Nos últimos 15 anos, o interesse em plantas medicinais aumentou em todo o mundo (Calixto, 2000). A fitoterapia, notadamente nos últimos anos, constitui uma forma de terapia medicinal que tem despertado grande interesse, sobretudo na indústria farmacêutica e companhias multinacionais. Em consequência, o mercado mundial de pesquisas e consumo de produtos fitoterapêuticos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares por ano (Yunes et al., 2001).

As florestas tropicais oferecem enormes prospectos para a descoberta de novos fármacos. Devido à imensa flora e dos aspectos culturais o uso das plantas na forma de extrato, infusão ou emplastos, são uma prática usual para tratar infecções comuns no Brasil (Calixto, 2000). Entretanto, há ainda uma falta de estudos científicos experimentais que confirmam as propriedades antibióticas de muitos destes remédios. Os métodos de seleção antimicrobiana *in vitro* fornecem as observações preliminares que são necessárias para selecionar, entre os produtos das plantas, aqueles com propriedades potenciais úteis para indústria farmacêutica.

Historicamente, os produtos naturais derivados de fungos e plantas têm-se revelado uma fonte fecunda de novos agentes terapêuticos, destacando-se no campo dos fármacos antimicrobianos, anticancerígenos e imunossupressores. Exemplos familiares incluem penicilinas, estreptomicina, ciclosporina e alguns alcalóides (Rates, 2001).

A preferência por produtos sintéticos para o tratamento farmacológico é em decorrência direta do desenvolvimento tecnológico propiciado pela Revolução Industrial. Todavia, nem sempre esses medicamentos são eficazes, podendo, muitas vezes, serem até mesmo tóxicos e, conseqüentemente, ocasionarem efeitos colaterais. Além disso, ressalta-se para o fato de que inúmeros medicamentos dessa natureza selecionam parasitas resistentes aos mesmos, tornando-os ineficazes, sobretudo naqueles tratamentos que demandam um longo prazo para um controle satisfatório da doença. Cumpre assinalar por fim, que o seu

alto custo inviabiliza seu uso pela população de baixa renda (Calixto, 2000; Rates, 2001; Simoes et al., 2004).

Nesse contexto, a busca por novos princípios ativos isolados de plantas, bem como modelos para síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, que podem ser obtidas mais facilmente e a custos menores, tem fomentado o investimento de muitas indústrias farmacêuticas, em estudos envolvendo plantas (Simoes et al., 2004). Dentro desta perspectiva, o Brasil é um país privilegiado, pelo fato de deter extensa e diversificada flora, sobretudo em algumas regiões, tais como: Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (Souza Brito e Souza Brito, 1992; Calixto, 2000; Yunes et al., 2001).

1.E FAMÍLIA PIPERACEA E EUPOMATENÓIDE-5

A família Piperaceae pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, subordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales (Macrae e Towers, 1984; Santos et al., 2001). Encontra-se distribuída desde o México até o sudeste da Argentina (Figueiredo e Sazima, 2000), sendo constituída pelos gêneros *Peperomia*, *Ottonia*, *Pothomorphe* e *Piper* que possuem propriedades medicinais largamente empregadas pela população (Costa, 1972).

O gênero *Piper* inclui um grande número de espécies que se caracterizam pelo uso no tratamento de diversas doenças e pela importância econômica e comercial na produção de óleos essenciais de interesse nas indústrias farmacêuticas e de inseticida (Maia et al., 1987; Silva e Machado, 1999). Vários estudos têm mostrado a atividade biológica de diversas espécies do gênero *Piper*, dentre as quais *Piper aduncum* mostrou atividade contra *Neisseria gonorrhoeae* e poliovírus (Cáceres et al., 1995; Devehat et al., 2002), atividade antifúngica de *P. methysticum* (Locher et al., 1995), atividade do óleo essencial de *P. angustifolium* contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Trillini et al., 1996).

Vários compostos fisiologicamente ativos têm sido isolados de espécies de Piperaceae podendo ser destacados as amidas, os alcalóides, as

lignanas, as neolignanas, os terpenos, os esteróides, as chalconas e os flavonóides (Sengupta e Ray, 1987; Parmar et al., 1997; Santos et al., 2001).

Dentre as diversas plantas utilizadas como remédios pela população está a espécie vegetal *Piper regnellii* var. *pallescens*, conhecida popularmente por caapeba, capeba ou pariparoba (Corrêa, 1984). Trata-se de um arbusto de aproximadamente 1,5 m de altura (Macrae e Towers, 1984) que cresce em regiões tropicais e subtropicais (Figura 3).



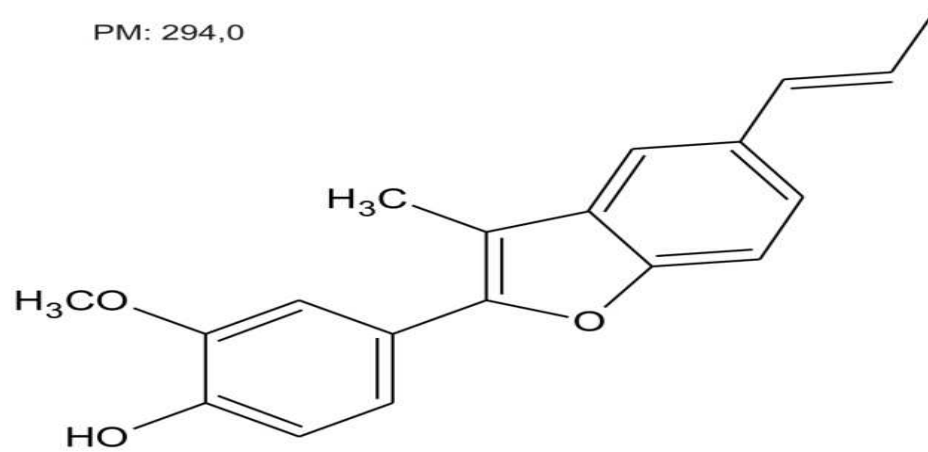
Figura 3 – Aspecto das folhas da espécie vegetal *P. regnellii* var. *pallescens*. As folhas são alternas, pecioladas, grandes, com limbo cordiforme, de base simétrica, medindo, quando adultas, de 12,0 a 14,0 cm de largura e de 10,0 a 12,0 cm de comprimento, levemente sulcados próximos a base do limbo (Macrae e Towers, 1984).

São diversos os efeitos terapêuticos populares de extratos de *P. regnellii* encontrados na literatura, podendo-se citar: antiblenorrágicos, desobstruentes, diuréticos, emolientes, cicatrizante de feridas, para irritações na pele, além das sementes terem ação em casos de pleurite (Caminhoá, 1877; Balbach, 1974). Holetz e colaboradores (2002) mostraram que o extrato bruto de *P. regnellii* var. *pallescens* apresenta atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e contra os fungos *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Pessini et al. (2003) isolaram pela primeira vez a partir dessa espécie de planta quatro neolignanas dihidrobenzofurânicas: conocarpano, eupomatenóide-3,

eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, já descritas na literatura para a espécie vegetal *P. regnellii* var. *regnellii* e que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. Em 2008, Koroishi e colaboradores, mostraram a atividade antifúngica de extratos e neolignanas obtidos a partir das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*.

Trabalhos do nosso grupo mostraram a atividade antiproliferativa do extrato hidroalcoólico, frações e neolignanas obtidas de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* contra *Leishmania amazonensis* (Nakamura et al., 2006; Vendrametto et al., 2010) e *T. cruzi* (Luize et al., 2006a, 2006b). Dentre as neolignanas, o eupomatenóide-5 (Figura 4) revelou ter um efeito inibitório no crescimento de epimastigotas na concentração de 7,0 µg/mL (IC₅₀ 23,8 µM) além de provocar alterações morfológicas e ultraestruturais importantes no parasita como: arredondamento das células, células binucleares, intensa vacuolização citoplasmática, inchaço mitocondrial, condensação anormal da cromatina, presença de figuras de mielina e processos de autofagia. Na concentração de 10 µg/mL o eupomatenóide-5 inibiu 100% do crescimento das formas epimastigotas sendo significativamente mais ativo e menos tóxico do que o benznidazol, já que a toxicidade do composto sobre células LLCMK₂ e sobre hemácias de carneiro só foi observada em concentrações acima da necessária para inibir o crescimento do protozoário. O eupomatenóide-5 também interferiu na multiplicação das formas amastigotas intracelulares. Tais dados levaram a um interesse em desvendar o possível mecanismo de ação do eupomatenóide-5 sobre *T. cruzi*.

Os resultados apresentados até o momento (Luize et al., 2006a, 2006b) apontam para uma forte atividade antiproliferativa do eupomatenóide-5, além disso, corroboram com a idéia de que um processo autofágico leva a morte celular nos parasitas tratados. Sabe-se ainda que, a autofagia corresponde a um processo natural, na qual as células degradam e reciclam seus constituintes celulares, e que exerce uma importante função na resposta ao estresse oxidativo (Scherz-Shouval & Elazar, 2007). Dessa forma, a atividade do eupomatenóide-5 pode estar associada a um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e EROs que pode desencadear uma condição de estresse oxidativo levando a morte celular.



Eupomatenóide-5

Figura 4 – Estrutura química do eupomatenóide-5 [2-(4'-hydroxy-5'-methoxyphenyl)-3-methyl-5(E)-propenylbenzofuran] isolado de *Piper regnellii* var. *pallescens*.

2 OBJETIVOS

2.A OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do eupomatenóide-5 obtido das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* na viabilidade, morfologia e ultraestrutura de formas tripomastigota de *T. cruzi*, bem como, investigar o possível mecanismo de ação.

2.B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a- Obter eupomatenóide-5, a partir das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*;
- b- Avaliar o efeito do eupomatenóide-5 na viabilidade, morfologia e ultraestrutura das formas tripomastigota;
- c- Avaliar a oxidação de lipídeos no parasito tratado com eupomatenóide-5.
- d- Verificar por citometria de fluxo, alteração no potencial de membrana mitocondrial;
- e- Avaliar o efeito do eupomatenóide-5 sobre a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD);
- f- Avaliar o efeito do eupomatenóide-5 no consumo de H₂O₂ pelo parasita.

REFERÊNCIAS

- APARICIO, I.M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.P. **2004**. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 5892–5902.
- ARIYANAYAGAM, M.R.; FAIRLAMB, A.H. **2001**. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 115, p. 189-198.
- BALBACH, A. **1974**. 3ª Edição. “A flora nacional na medicina doméstica”. A Edificação do lar. São Paulo.
- BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D.C. et al. **2005** The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, v. 309, p. 416–422.
- CACERES, A.; MENENDEZ, H.; MENDEZ, E.; COHOBON, E.; SAMOYA, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILHO, G. **1995**. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted disease. *J Ethnopharm.*, v. 48, p. 85-88.
- CALIXTO, J.B. **2000**. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 179-189.
- CAMANDAROBA ELP, PINHEIRO LIMA CM, ANDRADE SG **2002**. Oral transmission of Chagas' disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, v. 44, p. 97-103.
- CAMINHOÁ, J.M. **1877**. Elementos de botânica geral e médica. **Typographia Nacional**. Rio de Janeiro.
- CASTRO, H.; SOUSA, C.; SANTOS, M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A; FLOHE, L.; TOMAS, A.M. **2002**. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 33, p. 1552–1562.
- CASTRO, H.; SOUSA, C.; NOVAIS, M.; SANTOS, M.; BUDDE, H.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; FLOHÉ, L.; TOMÁS, A.M. **2004**. Two linked genes of *Leishmania infantum* encode tryparedoxins localized to cytosol and mitochondrion. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 136, p. 137-147.

- CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. **2006**. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 9, p. 471.
- CAZZULO, J.J. **2002**. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas Disease. *Curr Top Med Chem.*, v. 2;2, p. 1261–1271.
- CHAGAS, C., **1909**. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 1, p. 159-218.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. **1979**. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v. 59, p. 527–605.
- COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. **2002**. Emerging Chagas Disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 171-176.
- COURA, J.R. **2006**. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 39 (Suppl. 3): p. 113-117.
- CORRÊA, M.P. **1984**. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro: *Imprensa Nacional.*, v. 5, p. 177-183.
- COSTA, A.F. **1972**. Farmacognosia (Farmacognosia Experimental). Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*, v.III, p. 380.
- CROFT, S.L.; BARRETT, M.P.; URBINA, J.A. **2005**. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 21, p. 508–512.
- CUNHA, P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **2003**. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Editora Lisboa: *Fundação Calouste Gulbenkian*.
- DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; BARBOSA, H.S. **2006**. The effect of bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 101, p. 207-211.
- DAVIES, J. M. S.; LOWRY, C. V.; DAVIES, K. J. **1995**. A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys.*, v. 317, p. 1–6.

- DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; CUNHA PINTO, A.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E.M.B. **2001**. Antileishmanial activity of índole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 1349-1354.
- DE SOUZA, W.; MOTTA, M.C.M. **1999**. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microb Let.*, v. 173, p. 1-8.
- DE SOUZA, W. **2000**. O parasita e sua interação com os hospedeiros In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 7, p. 88-123.
- DEVEHAT, F.L.; BAKHTIAR, A.; BEZIVIN, C.; AMOROSOS, M.; BOUSTIE. **2002**. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. *Fitoterapia*, v. 73, p. 400-405.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. **2002**. The impact of Chagas disease control in Latin America -A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 603-612.
- DIAS J.C.P. **2007**. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102 (Suppl. I), p. 11-18.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J.; CRUZ, F.S. **1988**. Enhancement of the cytotoxicity of Crystal Violet against *Trypanosoma cruzi* in the blood by ascorbate. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 27, p. 241-248.
- DOCAMPO, R. **1990**. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact.*, v. 73, p. 1-27.
- DOCAMPO, R; MORENO, S.N. **1999**. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol. Today*. v, 11, p. 443-448.
- EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G. et al., **2005**. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*, v. 309, p. 409-415.

- ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; BAINTON, D.F.; MCKERROW, J.H. **1998**. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, v. 111, p. 597-606.
- FAIRLAMB, A.H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B.T.; CERAMI, A. **1985**. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, v. 227, p. 1485–1487.
- FIGUEIREDO, R.A.; SAZIMA, M. **2000**. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany Company*, v. 58, p. 455-460.
- FILARDI, L.S.; BRENER, Z. **1987**. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, p. 755-759.
- FILOSA, S.; FICO, A.; PAGLIALUNGA, F. et al. **2003**. Failure to increase glucose consumption through the pentose phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem. J.*, v. 370, p. 935–943.
- FLOHÉ, L.; HECHT, H.J.; STEINERT, P. **1999**. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 27, p. 966-984.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS DE ARIAS, A.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. **2007**. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitot.*, v. 78, p. 382-384.
- FRIDOVICH, I. **1995**. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 64, p. 97–112.
- GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. **1991**. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasit Tod.*, v. 7, p. 240-244.
- GIULIVI, C.; TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. **1988**. Chemiluminescence enhancement by tripanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzyme in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.30, p. 243-252.
- HARVEY, R.C.; CHAMPE, P.C. **1998**. Farmacologia ilustrada. 2° Edicao. **Artmed**. São Paulo.

- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. **2002**. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97(7), p.1027-1031.
- HOLWILL, M.E.; MCGREGOR, J.L. **1975**. Control of flagellar wave movement in *Crithidia oncopelti*. *Nature*, v. 255(5504), p. 157–158.
- IGOILLO-ESTEVE, M.; CAZZULO, J. J. **2006**. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol.*, v. 149, p. 170–181.
- IOSET, J.R. **2008**. Natural products for neglected diseases: a review. *Curr. Org. Chem.*, v. 12, p. 643–666.
- IRIGOIN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M.A.; WILKINSON, S.R.; FLOHE, L.; RADI, R. **2008**. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 45, p. 733–742.
- IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M. et al. **2005**. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, v. 309, p. 436–442.
- IZUMI, E.; MORELLO, L.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; NAKAMURA, C.V.; **2007**. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.*, v. 118, p. 324-330.
- KIM, B.Y.; HAN, M.J.; CHUNG, A.S. **2001**. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 30, p. 686–698.
- KIRCHHOFF, L. **2000**. *Trypanosoma* species (American Trypanosomiasis, Chagas Disease): Biology of Trypanosomes. In G. Mandell, J. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. (5th Edition) (pp. 2845-2851). New York: Churchill Livingstone.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. **2000**. The development of *Trypanosoma Cruzi* in Triatominae. *Parasit Tod.*, v. 16, p. 381-387.

- KOROISHI, A.M.; FOSS, S.R.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. **2008**. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *J Ethnopharm.*, v. 117, p. 270-277.
- KRAUTH-SIEGEL, R.L.; MEIERING, S.K.; SCHMIDT, H. **2003**. The parasite-specific trypanothione metabolism. *Biol. Chem.*, v. 384:4, p. 539-549.
- KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COMINI, M. **2008**. A redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1780(11), p. 1236-1248.
- LIN, Yi-Chun; HSU, Ju-Yu; CHIANG, Su-Chi; LEE, Sho Tone. **2005**. Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 142, p. 66–75
- LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN, D.A.B.; VLIETINCK, A.J. **1995**. Antimicrobial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J Ethnopharm.*, v. 49, p. 23-32.
- LOPEZ, J.A.; CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W.; FLOHE, L.; GUERRERO, S.A.; MONTERNARTINI, M.; KALISZ, H.M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W. **2000**. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 28, p.767-772.
- LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. **2006a**. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. *var. pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, p. 2126-2130.
- LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. **2006b**. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, v. 100, p. 31-37.
- LYER, J.P.; KAPRAKKADEN, A.; CHOUDHARY, M.L.; SHAHA, C. **2008**. Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol. Microbiol.*, v. 68, p. 372-391.

- MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. **1984**. *Biological activities of lignans. Phytochem.*, v. 23(6), p. 1207-1220.
- MAIA, J.G.S.; SILVA, M.L.; LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M.G.B.; RAMOS, L.S. **1987**. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. *Química Nova*. v. 10(3), p. 200-204.
- MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J.M.; TLLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. **1997**. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasit.*, v. 86, p. 101-106.
- MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. **2007**. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 146, p. 601-620.
- MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. **1969**. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, v. 244, 6049–6055.
- MICHELS, P.A.M.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. **2006**. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1763, p. 1463–1477.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, **2007** http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27874, acessado em 21/09/09
- MIRANDA, M.R.; CANEPA, G.E.; BOUVIER, L.A.; PEREIRA C.A. **2006**. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol.*, v. 114, p. 341– 344.
- MITSUMOTO, A.; TAKANEZAWA, Y.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAKAGAWA, Y. **2001**. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 30, p. 625–635.
- MONCAYO, A. **2003**. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 577-591.
- MONTEMARTINI, M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; STEINERT, P.; FLOHE, L.; KALISZ, H. M. **1998**. Sequence analysis of the trypanredoxin peroxidase gene from

Crithidia fasciculata and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 4864–4871.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **2002**. 3ª Edição. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro, v. 18, p. 187-195.

NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ABE, F. **2004**. Trypanocidal constituents in plants – withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 27, p. 193-197.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. **2006**. Atividade leishmanicida do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* var *pallenscens*. *Rev Bras de Farmacog.*, v. 16, p. 61-66.

NEVES, D.P. **2003**. 10ª Edição. Parasitologia humana. **Atheneu**. São Paulo

NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; PEDREIRA DE FREITAS, J.L.; AMATO NETO, V.; KLOETZEL, J. **1953**. Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* “*in vitro*”. Emprego de violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. *Hospital (Rio de Janeiro)*, v. 44, p. 731-744.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. **1997**. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem.*, v. 46, p. 597.

PAVETO, C.; GUIDA, M.C.; ESTEVA, M.I.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.; FLAWIÁ, M.M.; TORRES, H.N. **2004**. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 69-74.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. **2003**. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 98(8), p. 1115-1120.

PIACENZA, L.; ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; RADI, R. **2009**. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 12, p. 415–421.

- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. **2001**. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 38388–38393.
- RATES, S.M.K. **2001**. Plants as source of drugs. *Toxicol.*, v. 39, p. 603-613.
- REGGIORI, F.; KLIONSKY, D.J. **2005**. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr. Opin Cell Biol.*, v. 17, p. 415-422.
- REPETTO, Y.; OPAZO, E.; MAYA, J.D.; AGOSIN, M.; MORELLO, A. **1996**. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effects of drugs. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 115B, p. 281-285.
- RESZKA, K.; CRUZ, F.S.; DOCAMPO, R. **1986**. Photosensitization by the trypanocidal agent crystal violet – type I versus type II reactions. *Chem. Biol Interact.*, v. 58, p. 161-172.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A.J. **2008**. Chagas disease: an emerging food-borne entity? *J Infect Dev Ctries.*, v. 2, p. 149-150.
- SALVEMINI, F.; FRANZE, A.; IERVOLINO, A.; FILOSA, S.; SALZANO, S.; URSINI, M.V. **1999**. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increase glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 2750–2757.
- SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L. **2007**. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzigium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, v. 116, p. 283-290.
- SANTOS, P.R.D.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. **2001**. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytochem.* V. 58, p. 547-551.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **2003**. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. 5° Edição. Porto Alegre: UFRGS: Florianópolis: UFSC, 2003. Cap.15, P. 371-400.
- SCHERZ-SHOVAL, R.; ELAZAR Z. **2007**. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *TRENDS Cell. Biol.*, v. 17, p. 422-427.

- SENGUPTA, S.; RAY, A.B. **1987**. The chemistry of Piper species: A review. *Fitoterapia*, v. 58, p. 147-166.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, A.S.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.P.; AMATO-NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JÚNIOR, E.R.; LOPES, M.H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. **1991**. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 33, p 351-357.
- SILVA, E.M.J.; MACHADO, S.R. **1999**. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). *Rev. Bras. Bot.*, v. 22(2), p. 117-124.
- SILVEIRA, C.A. **1983**. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *Saúde Brasil*, v. 1, p. 212-218.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **2004**. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^o Edição. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC.
- SOUZA BRITO, A.R.M.; SOUZA BRITO, A.A. **1992**. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J. Ethnopharm.*, v. 39, p. 53-67.
- SÜLSEN, V.; GÜIDA, C.; COUSSIO, J.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. **2006**. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol. Res.*, v. 98, p. 370-374.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. **1992**. Chagas's Disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 5, p. 400-419.
- TETAUD, E.; GIROUD, C.; PRESCOTT, A.R.; PARKINA, D.W.; BALTZ, D.; BITEAU, N.; BALTZ, T.; FAIRLAMB, A.H. **2001**. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 116, p. 171-183.
- TURRENS, J.F. **2004**. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.*, v. 25, p. 211-220.
- TRILLINI, B.; VELASQUEZ, E.R.; PELLEGRINO, R. **1996**. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med.*, v. 62, p. 372-373.

- URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; AUMANN, K.D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; FLOHE, L. **1995**. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.*, v. 252, p. 38–53.
- URSINI, M.V.; PARRELLA, A.; ROSA, G.; SALZANO, S.; MARTINI, G. **1997**. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.*, v. 323, p. 801–806.
- VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. **1999**. Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Considerações sobre a epidemiologia e a transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop.* v 32 (Supl. 2), p 51-55.
- VENDRAMETTO, M.C.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. **2010**. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*, *Parasitol Int*, doi:10.1016/j.parint.2009.12.009.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO C.; ARMENTI H.; SEGURA E. **1994**. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long term follow-up. *Am. Heart J.*, v. 127, p. 151-162.
- YEO, M.; ACOSTA, N; LLEWELLYN, M.; SANCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.J.; LOPEZ, E.; GONZALEZ, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W.; ARIAS, A.R.; MILES, M.A. **2005**. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural host of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 225-233.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. **2001**. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da história de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, p. 147-152
- WILKINSON, S.R.; TEMPERTON, N.J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J.M. **2000**. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 8220-8225
- WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J.; TAYLOR, M.C.; BROMLEY, E.V.; MILES, M.A.; KELLY, **2002**. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or trypanredoxin. *J. Biol. Chem.*, 277, p. 17062–17071.

- WILKINSON, S.R.; KELLY, J.M. **2003**. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol. Chem.*, v. 384 (4), p. 517-525.
- WIESE, A.G.; PACIFICI, R.E.; DAVIES, K.J. **1995**. A. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.*, v. 318, p 231–240.
- WHO/TDR -World Health Organization **2006**. Report of the Scientific Working Group on Chagas disease, Buenos Aires, Geneva, p. 7.
- ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M.V.; KNIGHT, R.C.; LOMAN, H.; EDWARDS D.I. **1987**. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.*, v. 36, p. 3299–3304.
- ZINGALES, B. **1999**. As cepas de *Trypanosoma cruzi* sao divididas em 2 grupos principais que apresentam características epidemiológicas distintas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, p. 61-62.

ANEXO A – ARTIGO: TRYPANOCIDAL ACTION OF EUPOMATENOID-5 IS RELATED TO THE IMPAIRMENT OF THE ANTIOXIDANT MECHANISM OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

**Karin J. Pelizzaro-Rocha, Phercyles Veiga-Santos, Tania Ueda-Nakamura,
Benedito P. Dias Filho, Valdecir F. Ximenes, Sueli O. Silva, Celso V.
Nakamura**

ANEXO A – ARTIGO: TRYPANOCIDAL ACTION OF EUPOMATENOID-5 IS RELATED TO THE IMPAIRMENT OF THE ANTIOXIDANT MECHANISM OF *TRYPANOSOMA CRUZI*

**Karin J. Pelizzaro-Rocha^a, Phercyles Veiga-Santos^b, Tania Ueda-Nakamura^{b,c},
Benedito P. Dias Filho^{a,b,c}, Valdecir F. Ximenes^d, Sueli O. Silva^{b,c}, Celso V.
Nakamura^{a,b,c*}**

Abstract:

Because of its severe side effects and variable efficacy, the current treatment for Chagas disease is unsatisfactory. Natural compounds are good alternative chemotherapeutic agents for the treatment of this infection. Recently, our group reported the antiproliferative activity and morphological alterations in epimastigotes and intracellular amastigotes of *T. cruzi* treated with eupomatenoid-5, a neolignan isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. Here, we report the results of a further investigation of the activity of eupomatenoid-5 on trypomastigotes, the infective forms of *T. cruzi*, and the possible mechanism of action of this compound. Eupomatenoid-5 exhibited strong activity against the infective forms of the parasite (EC₅₀ 40.5 µM), and led to ultrastructural alteration in the cell membrane, with apparent leakage of cytoplasmic contents. Additionally, eupomatenoid-5 induced lipoperoxidation, depolarization of the mitochondrial membrane, and increased G6PD activity, followed by H₂O₂ consumption in *T. cruzi*. These findings indicate that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 may be associated with the impairment of the antioxidant system, which leads to oxidative stress and can trigger destructive effects on biological molecules such as lipids and proteins, leading to parasite death. In conclusion, the results presented here point to the change in the redox status of the parasite as a significant route of trypanocidal action of eupomatenoid-5.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Chemotherapy. Eupomatenoid-5. Reactive oxygen species. Antioxidant system. Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

^a Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Pr, 86051-990, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Bloco B-08, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil., Phone number: +55 44 3041-5012, Fax: +55 44 3011-4860. E-mail address: cvnakamura@uem.br

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Pr, 87020-900, Brazil

^d Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Unesp - Univ Estadual Paulista., Bauru, SP, 17033-360, Brazil

Introduction

Chagas disease, an array of clinical conditions triggered by infection by *Trypanosoma cruzi*, affects millions of people around the world, particularly in Latin America [1]. In the absence of effective vaccines, chemotherapy based on two nitroheterocycle drugs ((Nifurtimox and Benznidazole) is still the only available treatment. However, these substances cause severe side effects, and their efficacy during the chronic phase is still controversial [2]. Therefore, there is an urgent need for new, safe and effective drugs for the treatment of Chagas disease. One of the more promising lines of investigation is the discovery of new antiparasitic agents of natural origin (reviewed in [3]).

Natural products are valuable sources of chemotherapeutic agents, and have been traditionally used by native cultures to treat infectious diseases. In the last few years, research on natural products has intensified, hence it is not surprising that many plant-derived compounds have been demonstrated to have antiprotozoal activity [4-8]. Recently, our research group reported the antiproliferative activity of four neolignans isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens* against parasitic forms of *T. cruzi* [9,10]. Among the neolignans, eupomatenoid-5 (Figure 1) showed an inhibitory effect on the growth of epimastigotes and intracellular amastigotes, and also induced important morphological and ultrastructural alterations. Moreover, eupomatenoid-5 has been reported to possess a variety of biological activities including insecticidal, antibacterial, and antifungal, as well as leishmanicidal activity [11-14].

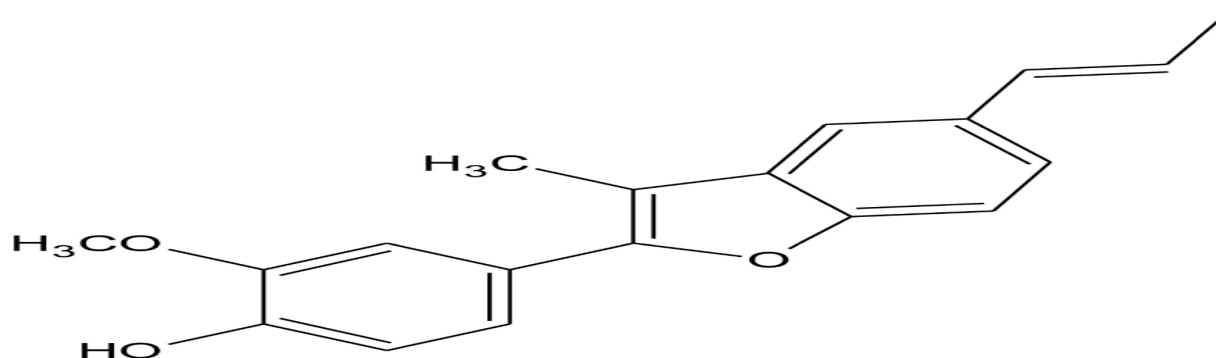


Figure 1 – Chemical structure of eupomatenoid-5, the neolignan isolated from *Piper regnellii* var. *palescens*.

During its life cycle, *T. cruzi* is exposed to a pool of reactive oxygen species (ROS) generated by different pathways. The main sources of ROS seem to be its own aerobic metabolism and the response triggered by the host immune system. The production of ROS has also been proposed as an important component of the mechanism of action of nitroheterocycle drugs, because of the presence of nitroreductases, which are unique to the parasite [15,16]. Although *T. cruzi* possesses different ROS detoxifying mechanisms, most of them based on the trypanothione pathway [17], its defense mechanisms against oxidative stress are deficient compared to those of mammals, making this parasite especially sensitive to oxidative-stress conditions [18]. Therefore, the parasite detoxifying systems can be considered as a target for drug development. We hypothesized that the alterations caused by eupomatenoid-5 in *T. cruzi* [10], may be due to the impairment of antioxidant systems, which would cause oxidative stress and consequent destructive effects on biological molecules such as lipids, proteins, and nucleic acids [19], leading to parasite death.

The present study was designed to assess the effects of eupomatenoid-5 in trypomastigotes, and also to gain insight into the mechanism of the trypanocidal action of eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens* on *T. cruzi*. The results presented herein strongly support the hypothesis that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 may be associated with the impairment of the antioxidant mechanisms of the parasite.

Materials and methods

Chemicals:

Horseradish peroxidase (HRP), leupeptin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (NADP), glucose-6-phosphate (G6P), 6-phosphogluconate (6PG), bovine albumin, rhodamine 123, and thiobarbituric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA); hydrogen peroxide (H_2O_2) from Merck (Darmstadt, Germany); protein assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA, USA); and fetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) from Gibco Invitrogen Corporation, NY, USA. All other reagents were analytical grade.

Isolation of Eupomatenoid-5 from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*:

Eupomatenoid-5 was isolated from leaves of *P. regnellii* collected in the Prof. Irenice Silva Garden of Medicinal Plants on the campus of the State University of Maringá. A voucher specimen (No. HUM 8392) was deposited at the Herbarium of the State University of Maringá, Paraná, Brazil. The dry plant material was extracted by exhaustive maceration at room temperature in the dark in ethanol:water (90:10). The fractionation was performed from the ethyl-acetate crude extract to obtain the hexane fraction, and a neolignan dihydrobenzofuranic, eupomatenoid-5 was isolated from this fraction, as described previously [9]. The compound was purified by absorption-chromatographic methods and identified by spectral analyses of UV, IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HETCOR, gNOESY, HMBC, HETRL, and GC/MS. The data were compared with the literature [11]. Stock solutions of eupomatenoid-5 were prepared aseptically in dimethyl sulfoxide (DMSO -Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and diluted in culture medium so that the DMSO concentration did not exceed 1% in the experiments.

Parasites and cell cultures:

All experiments were performed with the Y strain of *T. cruzi*. Epimastigote forms were maintained axenically at 28 °C with weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at pH 7.4 [20]. Trypomastigote forms were obtained from the supernatant of an infected LLCMK₂ cell monolayer (epithelial cells of monkey kidney, *Macaca mulatta*) in DMEM medium in a 5% CO₂ air mixture at 37 °C. LLCMK₂ cells were maintained in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, and 50 mg/l gentamicin, and buffered with sodium bicarbonate.

Effect of eupomatenoid-5 on viability and ultrastructure of trypomastigote forms:

Trypomastigote forms (1×10^7 cells/ml) were treated with eupomatenoid-5 in a range of 3.4 to 170.0 μM for 2 h at 37 °C. The number of viable cells was determined by direct counting using the dye exclusion method (Erythrosine B) [21], and the samples were processed for electron microscopy. For this, parasites

treated with 34.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C. For transmission electron microscopy (TEM), cells were post-fixed in a solution containing 1% OsO_4 , 0.8% potassium ferrocyanide, and 10 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in an increasing acetone gradient, and embedded in Epon® resin. Next, ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and images were obtained on a FEI TECNAI 12 TEM. For scanning electron microscopy (SEM), parasite cells were fixed as before. Next, small drops of the sample were placed on a specimen support with poly-L-lysine. The samples were dehydrated in graded ethanol, critical-point dried in CO_2 , coated with gold, and observed on a Shimadzu SS-550 SEM.

Lipid peroxidation assay:

Epimastigotes (2×10^6 cells/ml) were incubated in the LIT medium supplemented with 10% FBS, and eupomatenoid-5 was added to the growth medium in concentrations of 34.0, 85.0, or 170.0 μM . Cells were incubated at 28 °C for 24 h. When trypomastigote forms were used in the assay, the same treatment was performed, but the incubation was at 37 °C for 2 h. The extent of lipid peroxidation was determined as the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in terms of malondialdehyde (MDA). After incubation, samples (0.2–0.5 mg protein) were heated in a solution containing 0.37% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, and 0.25 N HCl at 95 °C for 45 min. After cooling, the absorbance was read at 532 nm and the concentration of TBARS was calculated based on a ϵ value of 153 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [22]. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times.

Flow cytometry:

Epimastigote forms (2×10^6 cells/ml) treated or untreated with 34 and 51 μM at 28 °C for 96 h, were washed and incubated with 5 $\mu\text{g/ml}$ rhodamine 123 (Rh123) for 15 min at 37 °C to evaluate the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$). All the material was kept on ice until analysis. Data acquisition and analysis

were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with the CellQuest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to the parasites. Alterations in the fluorescence of Rh123 were quantified as the percent of reduction of the fluorescence compared with the control.

Glucose-6-phosphate (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) assay:

After 5 days (early stationary phase), epimastigotes (2×10^6 cells/ml) were collected by centrifugation, washed with PBS, and the treatment was performed in the presence or absence of eupomatenoid-5 (34.0, 85.0, and 170.0 μM) for 24 h, or with 34.0 and 51 μM for 96 h at 28 °C. Different concentrations of eupomatenoid-5 were used in different periods, due to the different IC_{50} for each period. Then, cells were pelleted and resuspended in PBS in the presence of a protease inhibitor. The combined activities of G6PD and 6PGD were measured by the addition of 5×10^6 cells/ml to the reaction mixture (50 mM Tris–HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 250 μM NADP⁺, 2 mM MgCl₂, 1 mM 6-phosphogluconate, and 1 mM glucose-6-phosphate), and the course of NADP⁺ reduction was followed at 340 nm [23]. G6PD activity was obtained by subtracting the measured activity of 6PGD from the combined activities of 6PGD and G6PD. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times.

Hydrogen peroxide consumption:

Hydrogen peroxide consumption was measured using Phenol red and horseradish peroxidase (HRP). Epimastigote forms were treated as described above, in G6PD and 6PGD activity. Then, the parasites were harvested by centrifugation, washed twice with IB medium containing 0.05 mg/ml phenol red, and resuspended in the same buffer at a concentration of 10^7 cells/ml. Then the epimastigotes were exposed to oxidative stress by the addition of H₂O₂ in a final concentration of 20 μM . After 1 h, the initial concentration of H₂O₂ in the medium, and

its decay were measured. Aliquots of 1,000 μl of cell suspension were taken, and 10 μl of horseradish peroxidase (1 mg/ml) was added and the mixture incubated for 5 min at room temperature, and the samples were then centrifuged at $7,000\times g$ for 2 min. Twenty μl of 2 N NaOH were added to 1,000 μl of the supernatant, and the absorbance at 610 nm was measured. Values were assessed according to a calibration curve achieved between 0.05 and 25 μM H_2O_2 in IB buffer. Data were expressed as percent of H_2O_2 consumed relative to the control. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times.

Statistical analyses:

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ANOVA followed by Tukey's test was used, and p-values less than 0.05 were regarded as significant. Results were expressed as mean \pm standard deviation.

Results

Effect of eupomatenoid-5 on viability and ultrastructure of trypomastigote forms:

Previous studies have demonstrated the strong antiproliferative activity and ultrastructural alterations shown by eupomatenoid-5 against the epimastigote and intracellular amastigote forms of *T. cruzi* [9,10]. In this study, first we proposed to assess the effects of eupomatenoid-5 on trypomastigotes, the infective forms of *T. cruzi*.

The percentages of non-viable cells compared to the control when trypomastigotes were treated with 3.4, 17.0, 34.0, 85.0, and 170.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h, were 7.5, 28.6, 46.9, 66.1, and 97.9%, respectively (Figure 2). This suggests that eupomatenoid-5 also has a strong activity against the infective forms of the parasite. From these results, an effective concentration (EC_{50}) of 40.5 μM was calculated.

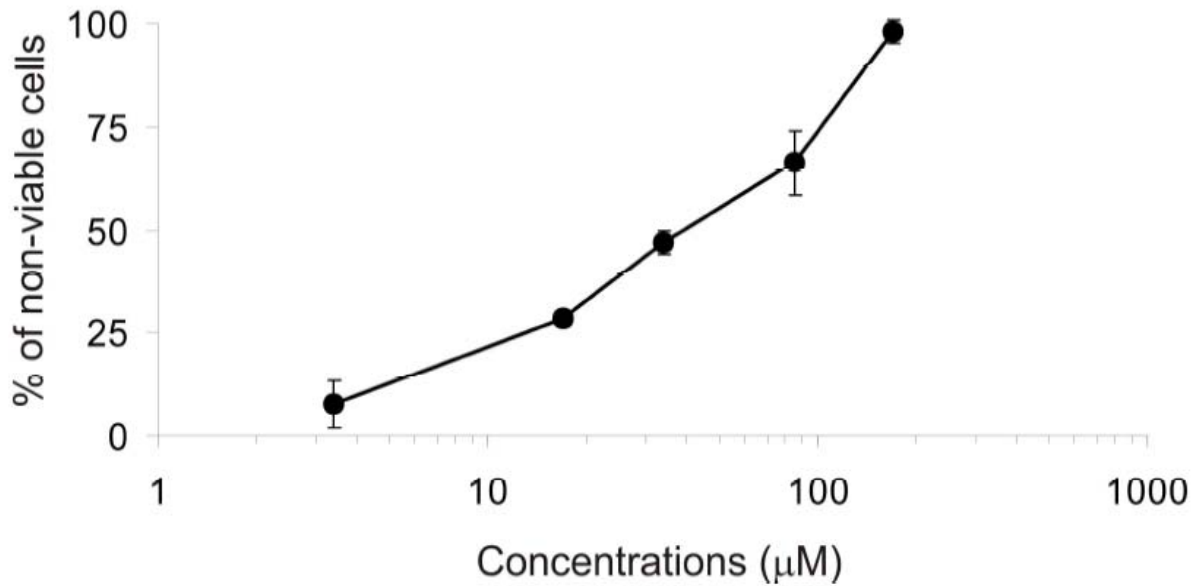


Figure 2 – Effects of eupomatenoid-5 on the viability of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. The protozoa were cultured for 2 h in the presence or absence of eupomatenoid-5 in concentrations of 3.4, 17.0, 34.0, 85.0, and 170.0 μM . From these results, an effective concentration (EC_{50}) of 40.5 μM was calculated. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. The results were analyzed as percentages of non-viable cells in relation to untreated parasites. Bars represent standard errors. All results were significant at $p \leq 0.05$ compared to the control group.

The morphological analyses by SEM showed changes in the integrity of cell membrane, with apparent leakage of cytoplasmic contents (Figure 3B-C), when compared to untreated cells (Figure 3A). Ultrastructural analysis by TEM of trypomastigotes treated with eupomatenoid-5 (34 μM) for 2 h is shown in Figure 4, and demonstrates striking alterations in the treated cells, such as separation of the membrane and intense cytoplasmic vacuolization (Figure 4B-D). These morphological alterations contrasted strongly with the control cells, in which the plasma membrane and organelles showed normal morphology (Figure 4A).

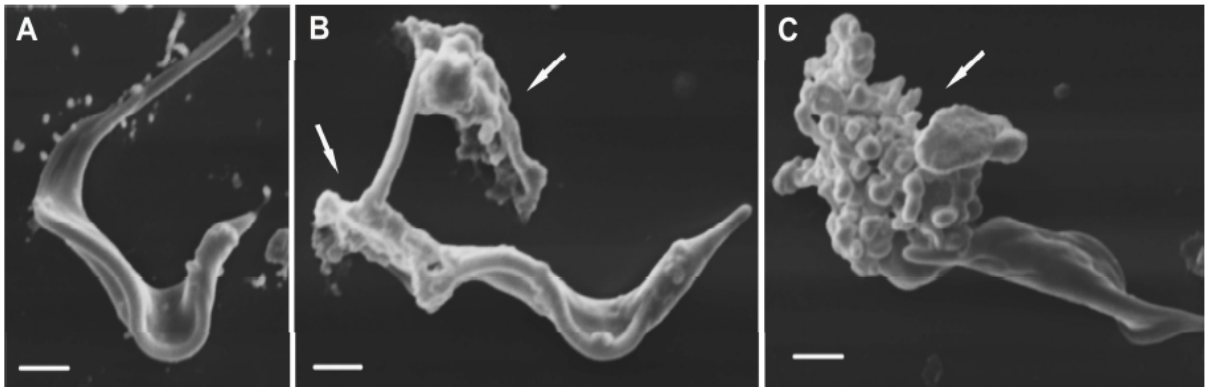


Figure 3 – Morphological alterations caused by eupomatenoid-5 in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. (A) SEM image of an untreated parasite, showing the typical elongated morphology. (B-C) SEM images of parasites treated with 34.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h reveal apparent leakage of cytoplasmic contents (white arrow). Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. Bars = 1 μm .

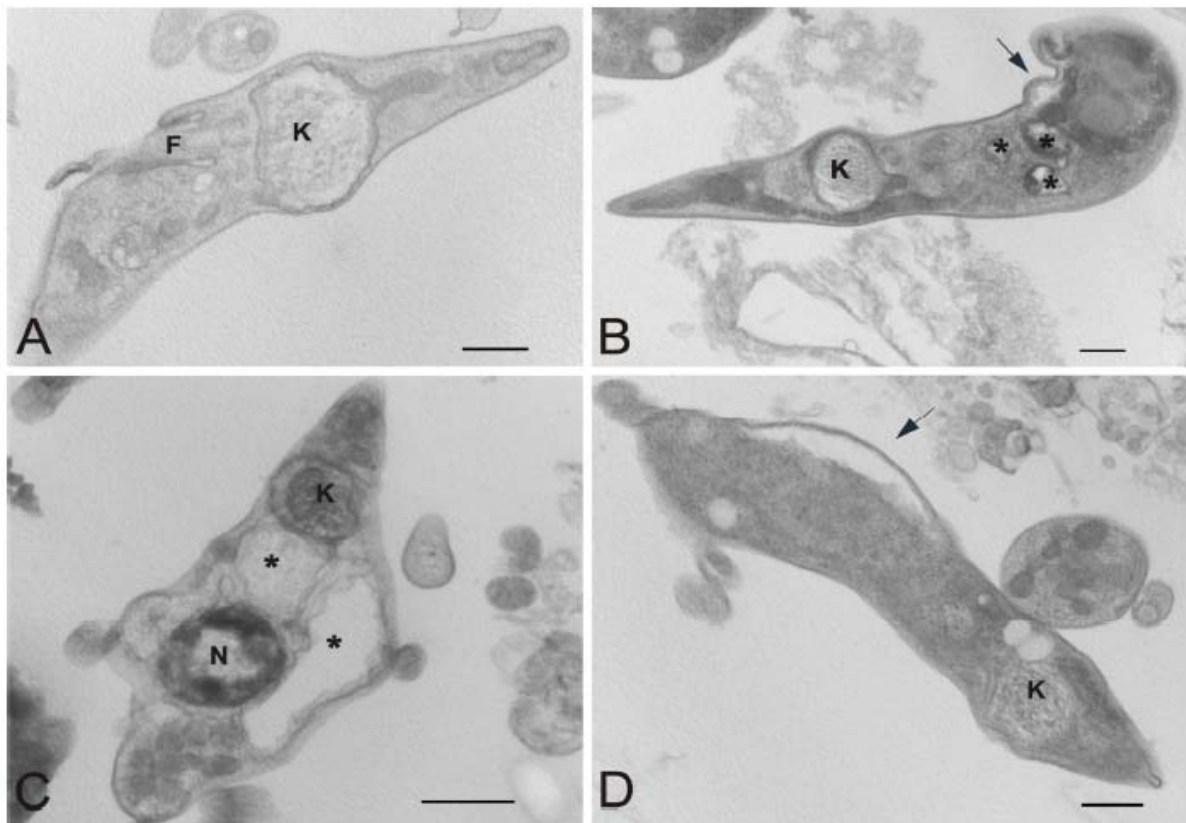


Figure 4 – Ultrastructural alterations caused by eupomatenoid-5 in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. (A) TEM image of an untreated parasite, showing the typical elongated morphology with normal kinetoplast (K), flagellum (F), and nucleus (N). (B-D) TEM images of parasites treated with 34.0 μM of eupomatenoid-5 for 2 h reveal separation between the membrane and cytoplasm (arrow) and vacuoles (asterisks). Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times. Bar = 1 μm .

Lipid peroxidation:

The putative oxidative damage in trypomastigotes treated with eupomatenoid-5 was assessed by measuring the production of TBARS, which is frequently used to quantify lipoperoxidation of cell membrane and is expressed as the malondialdehyde produced. This measurement is a good marker for oxidative stress in biological systems [24]. Here, the measurement of TBARS revealed a dose-dependent effect of eupomatenoid-5 on trypomastigotes. The treatments with concentrations of 34.0, 85.0, or 170.0 μM induced 2-, 3.2-, and 6-fold increases in lipoperoxidation compared to the control (Table 1). Epimastigote forms in the exponential growth phase were also studied, and increases of about 1.32-, 1.35-, and 2-fold were observed (Table 1).

Table 1 – Effect of eupomatenoid-5 on lipid peroxidation (production of MDA) of trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.

<i>Treatment</i>	<i>MDA (nmol/mg protein)</i>	
	<i>Trypomastigotes</i>	<i>Epimastigotes</i>
Control	13.9 \pm 4.3	9.6 \pm 0.5
Eupo-5 (34.0 μM)	28.1 \pm 8.2	12.7 \pm 1.0 d
Eupo-5 (85.0 μM)	44.4 \pm 11.5 a	12.9 \pm 0.5 d
Eupo-5 (170.0 μM)	83.5 \pm 31.3 b,c	19.3 \pm 2.7 e

Data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. a-p<0.05 compared to control; b-p<0.001 compared to control and μM ; c-p<0.01 compared to 85.0 μM ; d-p<0.01 compared to control; e-p<0.001 compared to control, 34.0 and 85.0 μM .

Flow Cytometry:

Based on evidence that indicated the effect of eupomatenoid-5 on *T. cruzi* mitochondria [10], we decided to evaluate mitochondrial changes in eupomatenoid-5-treated parasites by flow cytometry. Histograms of total Rh123 fluorescence showed a marked decrease in fluorescence intensity, indicating that the

mitochondria is depolarized in cells treated with 34.0 and 51.0 μM of eupomatenoid-5, where $\Delta\Psi\text{m}$ reductions of 29.0 and 62.8% were observed, respectively (Figure 5).

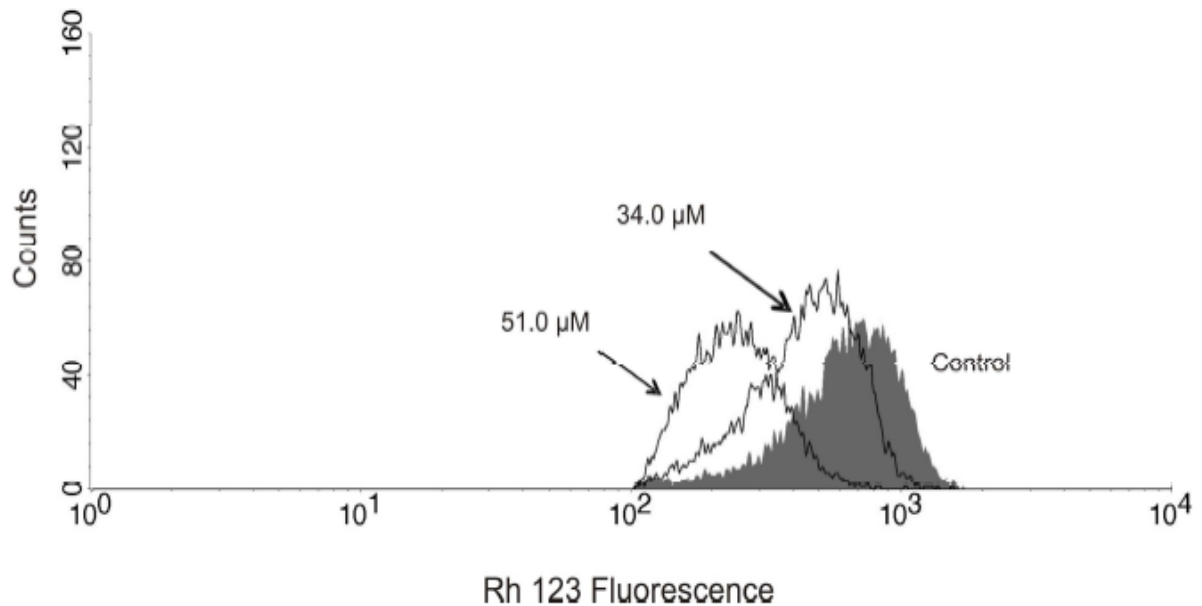


Figure 5 – Flow cytometry analysis of Rh 123-labeled epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with 34.0 and 51.0 μM of eupomatenoid-5 for 96 h. Arrows correspond to doses tested. Control group is also shown. Typical histograms of at least three independent experiments are depicted.

Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase assays:

Based on the evidence that eupomatenoid-5 induces oxidative stress in *T. cruzi*, through the action on its detoxifying system, our next step was to evaluate the activity of G6PD and 6PGD, which are involved with the detoxification system of this parasite. NADPH production by G6PD and 6PGD was measured in parasites treated or untreated with eupomatenoid-5, after 24 h and 96 h. When the parasites were treated with 34.0, 85.0, and 170.0 μM of eupomatenoid-5 for 24 h, increases of 265, 1,403, and 3,601% in the NADPH total production generated by the G6PD, compared to the control, were observed (Figure 6). However, when epimastigotes were treated with 34.0 and 51.0 μM for 96 h, relative decreases in the NADPH produced were observed (39.5 and 50.5% less than the control). With respect to the enzyme 6PGD, an increase in the NADPH production (787%) was found only at a concentration of 170.0 μM of eupomatenoid-5 after 24 h (Figure 6).

Hydrogen peroxide consumption:

To evaluate if NADPH produced by G6PD is related to the detoxification of H_2O_2 , we assessed the ability of epimastigotes to metabolize low concentrations of exogenous H_2O_2 (20 μM) [25]. The H_2O_2 consumption by epimastigotes was more efficient when they were treated with eupomatenoid-5 for 24 h than for 96 h. At concentrations of 34.0, 85.0, or 170.0 μM , the consumption of H_2O_2 was 14, 28, and 34% higher than the control, respectively, at 24 h. After 96 h of incubation with 34.0 and 51.0 μM , the increases in H_2O_2 consumption were 4.9 and 8.5% higher, respectively (Figure 6).

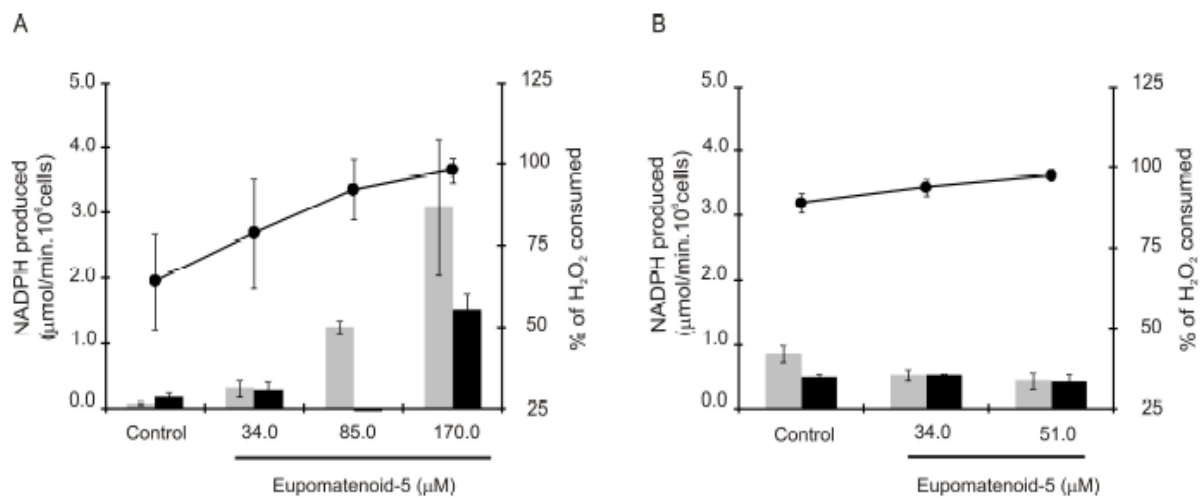


Figure 6 – G6PD, 6PGD activity, and H_2O_2 consumption by epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5. Cells were incubated in LIT medium with different concentrations of eupomatenoid-5 for 24 h (A) or 96 h (B), G6PD (gray bars), 6PGD (black bars), and H_2O_2 consumption (line). Statistical analyses for enzyme activity: G6PD activity in the treatment with 170.0 μM of eupomatenoid-5 compared to the control and 34.0 μM , $p < 0.05$. 6PGD activity in the treatment with 170.0 μM of eupomatenoid-5 compared to the control, 34.0 μM , and 85.0 μM , $p < 0.01$ at 24 h. Statistical analyses for H_2O_2 consumption: at 24 h, 85.0 μM was significantly different from the control, $p < 0.001$, while 170.0 μM was significantly different from the control and 34.0 μM . At 96 h, 34.0 and 51.0 μM was significantly different from the control, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. Each experiment was conducted in duplicate and repeated at least three times.

Discussion

This is the first study describing the effect of eupomatenoid-5 on the viability and ultrastructural alterations in the cytoplasmic membrane of trypomastigotes, the infective form of *T. cruzi*. Taken together, the data presented here point to the change in the redox status of the parasite as a significant route of the trypanocidal action of eupomatenoid-5. As a result, oxidative damage is observed, and it can be evidenced by lipid peroxidation and the change in the stability of the mitochondrion membrane of epimastigotes. Indeed, mitochondrial destabilization and disorganization have previously been described for other trypanocidal drugs [26-30]. In addition, the literature reports that lipid peroxidation may cause damage to cells by alterations in the mitochondrial and endoplasmic reticulum membranes and breakdown of lysosomal membranes [24]. Our data confirmed the reported ultrastructural alterations, such as mitochondrial swelling and intense cytoplasm vacuolization, and an apparent increase in the endoplasmic reticulum observed in epimastigote forms of *T. cruzi* and in promastigote forms of *Leishmania amazonensis* treated with eupomatenoid-5 [10,14].

In this context, the effect of eupomatenoid-5 on *T. cruzi* redox status can be explained by its effect on the ROS detoxification system of this protozoan. As shown here, trypomastigotes were more susceptible to lipoperoxidation than epimastigotes. This may indicate that the latter form is somehow more efficient at detoxifying ROS than trypomastigotes, perhaps because the levels of trypanothione (Try), the main dithiol antioxidant system of this organism, are higher in epimastigotes [31]. The increased activity of the enzyme G6PD may also result from the change in the redox status of cells, since the trypanothione-dependent antioxidant system is dependent on NADPH, provided by G6PD and 6PGD [32]. We suggest that the increased G6PD activity, obtained when the cells were incubated with eupomatenoid-5, could be a strategy of the parasite to survive in a new oxidizing intracellular environment. Corroborating this proposal, G6PD activity is increased in the presence of methylene blue, which oxidizes NADPH, a situation that mimics oxidative stress [33]. Hence, the increased G6PD activity obtained in the lag phase (1 day) may be related to an attempt by the cell to resist the stress caused by the presence of eupomatenoid-5. In the log phase, the decrease observed in G6PD

activity may be a result of the continuous oxidative stress induced by eupomatenoid-5 over time. Different patterns of G6PD and 6PGD activities were also observed among different strains along the growth curve when cells were treated with H₂O₂ [25]. Finally, the different patterns of G6PD activity along the growth curve resulted in different rates of H₂O₂ detoxification, as we found in the H₂O₂ consumption assay.

In conclusion, our results indicate that eupomatenoid-5 is active against trypomastigote forms, in addition to previously reported effects on epimastigotes and intracellular amastigotes of *T. cruzi*. Also, its trypanocidal action may be related to the impairment of the antioxidant system of this parasite, causing an imbalance between the antioxidant system and ROS, and consequently the death of the parasite (Figure 7). Thus, the oxidative defense system of *T. cruzi*, characterized by a limited ability to metabolize peroxides, suggests the possibility of developing therapies via ROS-mediated damage [34, 35].

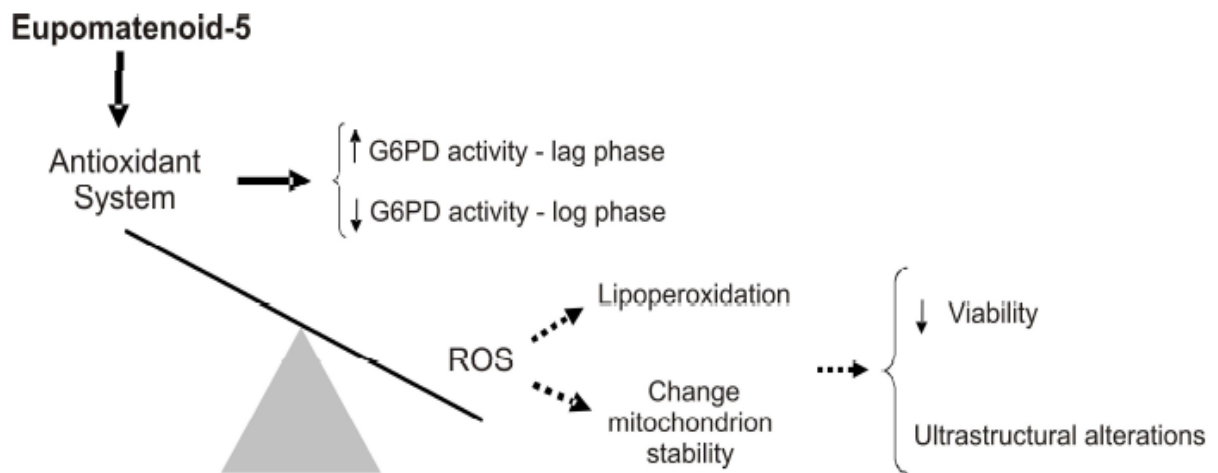


Figure 7 – Trypanocidal action of eupomatenoid-5. The effect of eupomatenoid-5 on *Trypanosoma cruzi* resulted in impairment of the antioxidant system (solid arrow), leading to lipid peroxidation and change in mitochondrion stability (dashed arrow).

Acknowledgements

We thank Erika Izumi and Marco Antonio Costa for excellent technical assistance. This study was supported through grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq, Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES, Financiadora de Estudos e Projetos — FINEP, PRONEX/Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

REFERENCES

- [1] World Health Organization (2005). Report of the Scientific Working Group (SWG) on Chagas Disease, Buenos Aires, Argentina.
- [2] Croft, S.L.; Barrett, M.P.; Urbina, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* **21**: 508 a 512; 2005
- [3] Ioset, J.R. Natural products for neglected diseases: a review. *Curr Org Chem.* **12**: 643– 666; 2008
- [4] Paveto, C.; Guida, M.C.; Esteva, M.I.; Martino, V.; Coussio, J.; Flawiá, M.M.; Torres, H.N. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 69-74; 2004.
- [5] Dantas, A.P.; Salomão, K.; Barbosa, H.S. The effect of bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem. Inst. Oswaldo cruz.* **101**: 207-211; 2006.
- [6] Fournet, A.; Ferreira, M.E.; Rojas De Arias, A.; Guy, I.; Guinaudeau, H.; Heinzen, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitot.* **78**: 382-384; 2007.
- [7] Izumi, E.; Morello, L.G.; Ueda-Nakamura, T.; Yamada-Ogatta, S.F.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Ferreira, I.C.P.; Morgado-Diaz, J.A.; Nakamura, C.V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp. Parasitol.* **118**: 324-330; 2007.
- [8] Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzigium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*: 283-290; 2007.
- [9] Luize, P.S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C.DC. *var. pallescens*

- (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.* **10**: 2126–2130; 2006a.
- [10] Luize, P.S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Morgado-Diaz, J.A.; Souza, W.; Nakamura, C.V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **100**: 31-37; 2006b.
- [11] Chauret, D.C; Bernad, C.B.; Arnason, J.T.; Durst, T. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J. Nat. Prod.* **59**: 152-155; 1996.
- [12] Pessini, G.L.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V.; Cortez, D.A.G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**: 1115-1120; 2003.
- [13] Koroishi, A.M.; Foss, S.R.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *J Ethnopharm.* **117**: 270-277; 2008.
- [14] Vendrametto, M.C.; Santos, A.O.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T..Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*, *Parasitol Int.* doi:10.1016/j.parint.2009.12.009. 2010
- [15] Turrens, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med.* **25**: 211–220; 2004
- [16] Hall, B.S.; Wu, X.; Hu, L.; Wilkinson, S.R. Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrob Agents Chemother.* **54(3)**:1193-1199; 2010.
- [17] Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B.T.; Cerami, A.. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science.* **227**: 1485–1487; 1985.

- [18] Maya, J.D.; Cassels, B.K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs Against *Trypanosoma cruzi* and Their Interaction With the Mammalian Host. *Comp. Biochem. Physiol.* **146**: 601-620; 2007.
- [19] Kiššová I.; Deffieu, M.; Samokhvalov, V.; Velours, G.; Bessoule, J. J.; Manon, S.; Camougrand, N. Lipid oxidation and autophagy in yeast. *Free Radic Biol & Med.* **41**: 1655–1661, 2006.
- [20] Camargo, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origem of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop.* **6**: 93-100; 1964.
- [21] Hodgkinson, V.H.; Herman, R.; Semprevivo, L. *Leishmania donovani*: Correlation among assays of amastigote viability. *Exp. Parasitol.* **50**: 397-408; 1980.
- [22] Pompella, A.; Maellaro, E.; Casini, A. F.; Ferrali, M.; Ciccoli, L.; Comporti, M.; Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures. *Lipids.* **22**: 206–211; 1987.
- [23] Cronin, C.N.; Derek, P.N.; Voorheis, P.H. The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* **244**: 26-30;1989.
- [24] Osório, R.A.L.; Christofania, J.S.; D’Almeida, V.; Russoa, A.K.; Piçarroa I.C. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C.* **135**: 89–95; 2003.
- [25] Mielniczki-Pereira, A.A.; Chiavegatto, C.M.; Lopez, J.A.; Colli, W.; Alves M.J.M.; Gadelha, F.R. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta Trop* **101**: 54–60; 2007.
- [26] Lazardi, K.; Urbina, J. A.; De Souza, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on

- epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2097–2105; 1990.
- [27] Vivas, J.; Urbina, J.A.; De Souza, W. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* induced by $\Delta(24(25))$ sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Int. J. Antimicrob. Agents* **7**: 235–240; 1996.
- [28] Santa-Rita, R.M.; Lira, R.; Barbosa, H.S.; Urbina, J.A.; De Castro, S.L. Antiproliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 780–784; 2005.
- [29] Menna-Barreto, R.F.S.; Corrêa, J.R.; Pinto, A.V.; Soares, M. J.; De Castro, S.L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol. Res.* **101**: 895–905; 2007.
- [30] Menna-Barreto, R.F.S.; Goncalves, R.L.S.; Costa, E.M.; Silva, R.S.F.; Pinto, A.V.; Oliveira, M.F.; de Castro, S.L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction *Free Radic Biol Med.* **47**: 644–653; 2009.
- [31] Irigoien, F.; Cibils, L.; Comini, M.A.; Wilkinson, S.R.; Flohe, L.; Radi, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 733–742; 2008.
- [32] Barrett, M.P. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* **13**: 11–16; 1997.
- [33] Igoillo-Esteve, M.; Cazzulo, J.J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol Biochem Parasitol.* **149**: 170–181; 2006.
- [34] Docampo, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact.* **73**: 1-27; 1990

- [35] Wilkinson, S.R.; Meyer, D.J.; Taylor, M.C.; Bromley, E.V.; Miles, M.A.; Kelly, J.M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* **277**: 17062– 17071; 2002.

ANEXO B – METODOLOGIAS E PARÂMETROS AVALIADOS

ANEXO B – METODOLOGIAS E PARÂMETROS AVALIADOS

a) Produtos Químicos:

Os reagentes Horsedish peroxidase (HRP), Leupeptina, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (NADP), Glucose-6-Phosphate (G6P), 6-Phosfoglucanate (6PG), Albumin bovine, Rhodamine 123, Digitonin, Antimicin A, Thiobarbituric acid foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA.); peróxido de hidrogênio (H_2O_2), da Merck (Darmstadt, Germany); kit dosagem de proteína da Bio-Rad (Hercules, EUA.); soro fetal bovino (SFB) e Dulbecco's modified Eagle's meio (DMEM) da Gibco Invitrogen (Corporation, NY, EUA.). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

b) Produção e Coleta da Matéria-Prima Vegetal:

Após o plantio e desenvolvimento da planta, as folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* foram coletadas junto ao Horto de plantas medicinais Profa. Irenice Silva, da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil e identificadas por comparação à exsicata que está depositada como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob número de registro HUM 8392. O material coletado foi triturado com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó que foi posteriormente armazenado em freezer (-20 °C).

c) Preparo dos Extratos:

O triturado das folhas foi submetido à extração pelo processo de maceração na proporção 1:10 (material vegetal:solvente) durante 5 dias à temperatura ambiente (Prista et al.,1975) com solução hidroetanólica (etanol:água) preparadas a 90% v/v (9:1). O processo de maceração foi repetido por 5 vezes até completa extração. Ao fim da maceração, o extrato foi filtrado e levado ao evaporador rotatório, à temperatura de 40 °C, sob pressão reduzida para eliminação do solvente. Após a eliminação do solvente foi adicionada água destilada, obtendo-

se uma porção aquosa que foi liofilizada (liofilizador – modelo 2 CHRIST ALPHA). O liofilizado foi armazenado em frascos de plásticos hermeticamente fechados e mantidos em freezer. A parte do extrato insolúvel em água foi solubilizado em acetato de etila (extrato bruto fase acetato 90%), o solvente foi evaporado à temperatura ambiente e armazenado em frascos de vidro em freezer (-20 °C) sob o abrigo da luz (Fluxograma 1).

d) Isolamento do eupomatenóide-5:

-Fracionamento do extrato bruto fase acetato 90%

O extrato bruto fase acetato 90% foi fracionado por cromatografia em coluna (CC) de adsorção sob pressão reduzida, utilizando coluna com 3,0 x 35,0 cm, sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionária e hexano (100%) como fase móvel. A fração hexano foi concentrada em evaporador rotatório e submetida à subfracionamento para isolamento da substância ativa (Fluxograma 1).

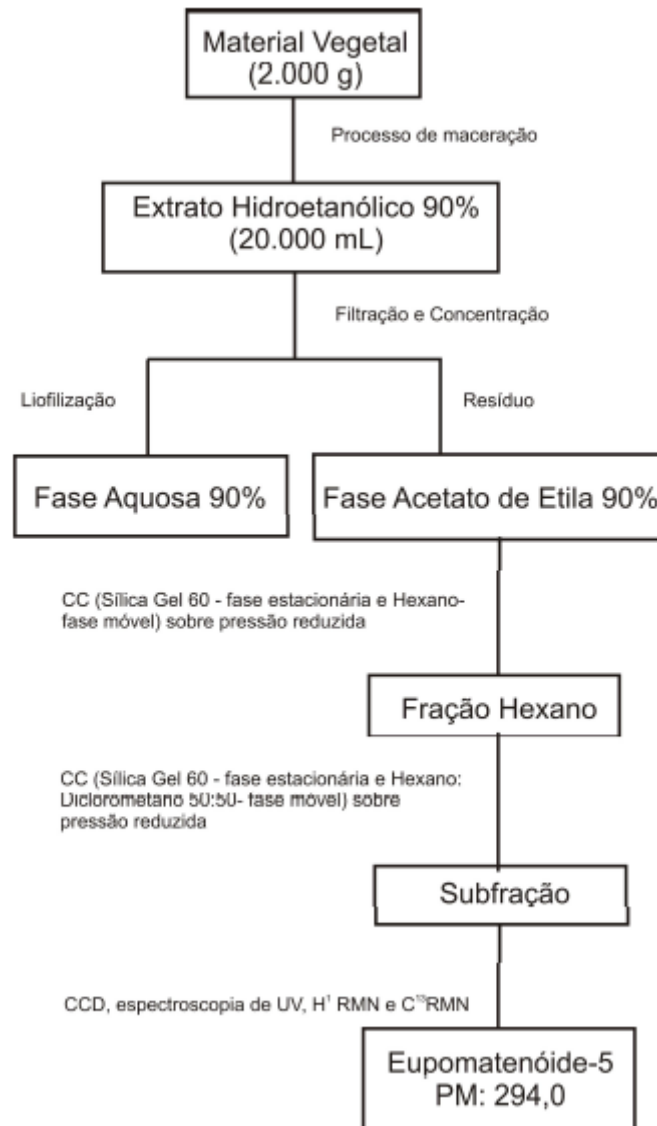
-Fracionamento da fração hexano

A fração hexano foi fracionada por cromatografia em coluna (CC) de adsorção sob pressão reduzida. A fração hexano foi cromatografada com sílica gel 60 (70-230 mesh) em coluna de 3,0 x 35,0 cm, empacotada com hexano. A coluna foi eluída com Hexano:Diclorometano (50:50). As frações correspondentes ao eupomatenóide-5 foram coletadas (Fluxograma 1).

-Técnicas Cromatográficas

O extrato bruto fase acetato 90%, a fração hexano e as frações de interesse foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso foram utilizadas placas de vidro de 5 x 10 cm preparadas com uma espessura de 0,25 mm de sílica gel GF254, ativadas à 105-110 °C por 30 min ou cromatoplasmas pré-fabricadas de alumínio Kieslgel 60 F254 (MERCK®), 20 x 20 cm com 0,2 mm de espessura. Como fase móvel foi utilizado hexano:acetato de etila (7:3, v/v). A visualização das substâncias nas placas de CCD foi feita pela utilização de

irradiação com luz UV (254 e 366 nm) e posterior revelação em vanilina sulfúrica (2%). A identificação do eupomatenóide-5 (PM: 294) foi feita por análises espectroscópicas de UV, ^1H RMN e ^{13}C RMN e CG/MS.



Fluxograma 1 – Procedimento para isolamento e purificação do eupomatenóide-5 a partir do extrato bruto fase acetato de etila 90% das folhas de *P. regnellii* var. *pallescens*.

e) Manutenção da cultura celular:

Neste estudo foram utilizadas as formas epimastigota e tripomastigota *Trypanosoma cruzi* cepa Y. As formas epimastigota foram cultivadas

a 28 °C em meio LIT (Camargo, 1964) suplementado com 10% SFB. As culturas foram mantidas, realizando-se subcultivo a cada 4 dias. A manutenção de formas tripomastigota foi feita através da infecção de células LLCMK₂, em meio DMEM suplementado com 2% SFB a 37 °C e 5% de CO₂ na razão de 10 tripomastigotas por célula contadas em câmara de Newbauer. Células de linhagem contínua LLCMK₂ (células epiteliais de rim de Macaca mulata) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37 °C em estufa com tensão de 5% de CO₂. Para o cultivo foram utilizadas garrafas de plástico com tampas de rosca e dispositivo para a entrada do CO₂ (TPP). As células foram observadas diariamente em microscópio invertido e o meio foi trocado quando observado pH ácido. Após a formação da monocamada celular, a fim de promover a manutenção das células de linhagem contínua, as células foram tripsinizadas a 37 °C por 1 min ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de SFB e transferidas para novas garrafas.

f) Meios de cultura:

-Preparo do meio LIT

No preparo do meio LIT, foram pesados 4,0 g/L de NaCl; 0,4 g/L de KCl; 6,12 g/L de Na₂HPO₄ anidro; 2,2 g/L de glicose; 5,0 g/L de triptose; 5,0 g/L de infusão de fígado; 15,0 g/L de extrato de levedura; 0,025 g/L de hemina* e 0,010 g/L de ácido fólico*. Em seguida, foram dissolvidos em água destilada e o pH ajustado para 7,4 utilizando NaOH 1 N ou HCl 1 N e imediatamente após, o meio foi esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 min.

* adicionados a partir de uma solução (100 mg/mL) em hidróxido de sódio 0,5 N.

-Preparo do meio DMEM

No preparo do meio Dulbecco's Modified Eagle Medium -DMEM, 3,4 g/l do meio foram dissolvidos em água destilada na temperatura de 15 a 30 °C. Em seguida, foram adicionados 3,7 g/L de NaHCO₃ e 0,29 g/L de L-glutamina e agitado.

O pH foi ajustado para 7,2 usando NaOH 1 N ou HCl 1 N e imediatamente após, o meio foi esterilizado por filtração, utilizando membrana com porosidade de 0,22 µm.

g) Teste de viabilidade em formas tripomastigota pelo método da eritrosina B:

A fim de avaliar a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* frente ao tratamento com eupomatenóide-5, um inoculo de 1×10^7 parasitas/mL obtidos da infecção de cultura de célula LLCMK₂ foram ressuspensos em meio DMEM contendo 10% de Soro fetal bovino e colocadas na presença ou ausência de eupomatenóide-5 nas concentrações de 3,4; 17,0; 34,0; 85,0 e 170,0 µM por 2 h a 37 °C. O número de parasitas viáveis e não viáveis foi determinado pelo método da eritrosina B 0,4% em lâmina e lamínula, na qual 200 células foram contadas (Hodgkinson et al., 1980). O resultado foi expresso em porcentagem de parasitas não viáveis. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

h) Avaliação das alterações ultraestruturais e de morfologia:

-Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Formas tripomastigota foram tratados com eupomatenóide-5 (34 µM) por 2 h e, em seguida processados para microscopia eletrônica. Após o tratamento as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS, e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4 °C. Após a fixação as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2, e pós-fixadas em uma solução contendo 1% tetróxido de ósmio (OsO₄), 0,8% ferrocianeto de potássio por 1 h. Foi realizado a desidratação das amostras em gradiente crescente de acetona e incluídos em resina Epon ®. Em seguida, cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo e coletados em grades de cobre com 400 mesh, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão FEI TECNAI 12.

-Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura, as células controle e tratadas foram fixadas como descrito anteriormente. Posteriormente, pequenas gotas de amostra foram colocadas em um suporte de amostra com poli-L-lisina. As amostras foram então desidratadas em gradiente crescente de etanol, o ponto-crítico em CO₂ foi realizado, as amostras foram revestidas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550.

i) Ensaio de Lipoperoxidação:

Nos ensaios de Lipoperoxidação, um inóculo de 2×10^6 epimastigotas/mL foi incubado em meio LIT suplementado com 10% SFB na presença ou ausência de eupomatenoide-5 nas concentrações de 34,0; 85,0 e 170,0 µM. As células foram incubadas a 28 °C por 24 h. Quando a lipoperoxidação foi avaliada em tripomastigota, o mesmo tratamento foi realizado, mas a incubação foi a 37 °C por 2 h para 1×10^7 tripomastigotas/mL. Após cada período de tratamento as células foram lisadas por congelamento e aquecimento das amostras e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford et al., 1976) utilizando uma curva de calibração com albumina bovina (BSA) (Figura 1). A peroxidação lipídica foi determinada como a quantidade de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em termos de malondialdeído (MDA), para isso 0,2-0,5 mg de proteína por amostra foram aquecidos em uma solução contendo 0,37% de ácido tiobarbitúrico, 15% de ácido tricloroacético e HCl 0,25 N a 95 °C por 45 min. Após o resfriamento a absorbância foi lida a 532 nm em espectrofotômetro (Shimadzu Spectrophotometer UV1700) e a concentração de TBARS calculada (coeficiente de extinção $153\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (Pompella et al., 1987). Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido pelo menos três vezes.

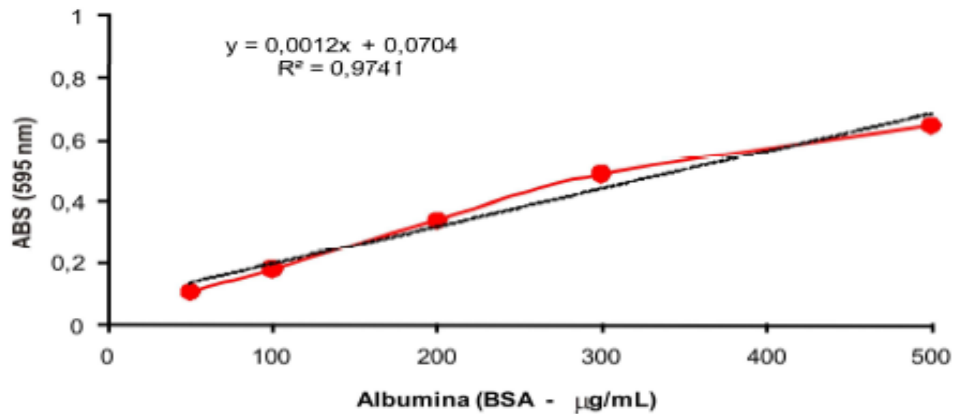


Figura 1 – Curva de calibração (BSA-albumina bovina) para dosagem de proteína, método de Bradford (Bradford et al., 1976).

j) Citometria de fluxo:

Após o tratamento com 34 e 51 μM de eupomatenóide-5 por 96 h a 28 °C conforme descrito anteriormente, epimastigotas (1×10^6 cels/mL) foram incubadas com 5 $\mu\text{g/ml}$ rodamina 123 (Rh123) por 15 min a 37 °C a fim de se verificar o potencial de membrana mitocondrial. Após este período as células foram lavadas com PBS uma vez, e ressuspendida neste ultimo, para análise. Todo o material foi mantido em gelo até a análise. Aquisição de dados e análise foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, E.U.A.) equipado com o software CellQuest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, E.U.A.). Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecido com o parasita.

k) Atividade da glicose-6-fosfatase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD):

As células tratadas e não tratadas com eupomatenóide-5 por 24 e 96 h foram lavadas e ressuspendidas em PBS na presença de 1 mM de PMSF e 13 μM de leupeptina. A ação combinada de G6PD e 6PGD foi medida pela adição de 5×10^6 células/mL em solução contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 50 mM de KCl, 0,1% de triton X-100, 250 μM NADP^+ , 2 mM de MgCl_2 , 1 mM de 6-fosfogluconato e 1 mM de glicose-6-fosfato. A redução de NADP^+ foi monitorada a 340 nm em espectrofotômetro (Shimadzu Spectrophotometer UV1700) (Cronin et al., 1989). A

atividade da G6PD foi determinada subtraindo a atividade da 6PGD da atividade combinada da G6PD e 6PGD.

1) Efeito do eupomatenóide-5 no metabolismo de H₂O₂:

Epimatigotas foram tratadas com eupomatenóide-5 nas concentrações de 34,0; 85,0 e 170,0 μM por 24 h, ou com 34,0 e 51,0 μM por 96 h a 28 °C. Após incubação as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio IB com vermelho de fenol (5mg para cada 100 mL de meio IB). Um inoculo de 5×10^6 cels/mL foi incubado em meio IB a 30 °C, no tempo 0 foi adicionado 20 μM H₂O₂. Após 1 h de incubação alíquotas (1 mL) foram retiradas e adicionadas a 10 μL da enzima HRP (1 mg/mL), centrifugadas a 10000 rpm por 2 min e ao sobrenadante adicionou-se 20 μL de NaOH 2M. A absorbância foi medida a 610 nm para determinar a concentração de H₂O₂ não metabolizado, foi calculada como descrito por Carnieri et al (1993). Este método baseia-se na reação do vermelho de fenol com o peróxido de hidrogênio catalisado pela HRP. A calibração foi realizada com curva de H₂O₂ (Figura 2). Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido em três ocasiões diferentes.

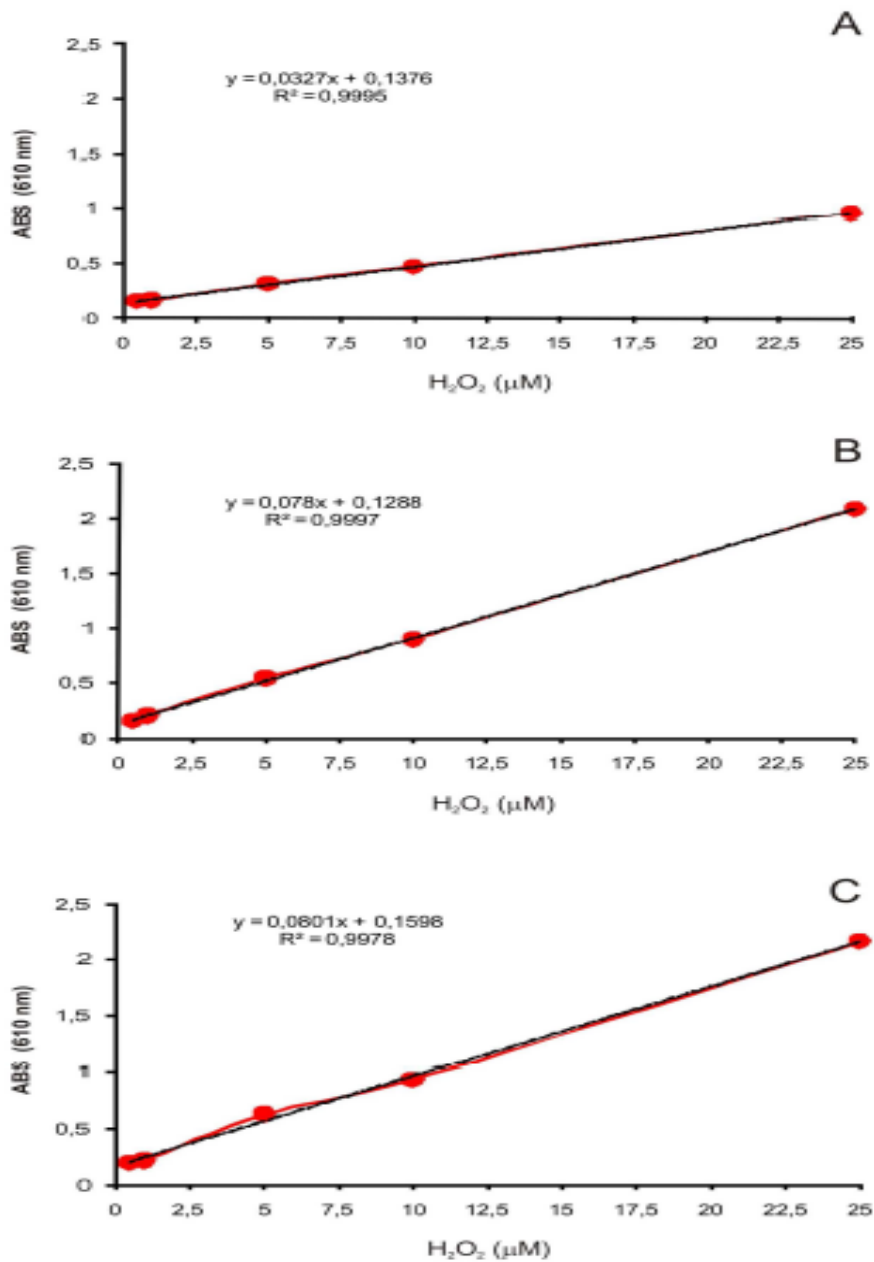


Figura 2 – Curva de calibração para dosagem de H₂O₂ não-metabolizado por formas epimastigota de *T. cruzi* tratadas ou não com eupomatenóide-5. A-Primeiro experimento. B-Segundo experimento. C-Terceiro experimento.

m) Análise Estatística:

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.). ANOVA seguida pelo teste de Tukey foi utilizado e um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados foram expressos como valor médio \pm desvio padrão.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254.
- CAMARGO, E.P. **1964**. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origem of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 6, p. 93-100.
- CARNIERI, E.G.S.; MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R. **1993**. Trypanothione dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 61, p. 79-86.
- CRONIN, C.N.; DEREK, P.N.; VOORHEIS, P.H. **1989**. The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.*, v. 244, p. 26-30.
- HODGKINSON, V.H.; HERMAN, R.; SEMPREVIVO, LLOYD. **1980**. *Leishmania donovani*: Correlation among assays of amastigote viability. *Exp. Parasitol.*, v. 50, p. 397-408.
- LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.; CORTÉZ, D.A.G.; MORGADO-DIAZ, 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*. *Parasitol. Res.* **100**: 31-37.
- POMPELLA, A.; MAELLARO, E.; CASINI, A.F.; FERRALI, M.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. **1987**. Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparison of different procedures. *Lipids*, v. 22, p. 206-211.
- PRISTA, L.N.; CORREIA, A.A.; MORGADO, R. **1975**. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. I, p. 1220

CONCLUSÃO

- (1) O eupomatenóide-5 revelou ser ativo contra a forma infectante do *T. cruzi*, tripomastigotas, levando a diminuição da viabilidade e alterações na morfologia e ultraestrutura.
- (2) Houve um aumento na oxidação de lipídios tanto das formas epimastigotas como tripomastigotas tratadas com eupomatenóide-5, essa lipoperoxidação pode ser em decorrência do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial H_2O_2 .
- (3) Eupomatenóide-5 levou a despotencialização no potencial de membrana mitocondrial, esse dado pode estar associado ao aumento nas espécies reativas de oxigênio que levam ao comprometimento da respiração celular.
- (4) Foi observado também um aumento nas primeiras 24 h na atividade da enzima G6PD, enzima da via glicolítica que está relacionada com a proliferação celular e com a detoxificação de hidroperóxidos pelo parasita, pois fornece NADPH para o sistema tripanotiona-dependente. Essa resposta, pode ser também em decorrência do aumento de EROs, na tentativa da célula em detoxificar.
- (5) Esse aumento na atividade da G6PD foi confirmado com o aumento do consumo de H_2O_2 , observado pela técnica do vermelho de fenol-HRP, na qual o NADPH gerado na via das pentoses pode ser utilizado na via de detoxificação (sistema tripanotiona).
- (6) Nossos resultados indicam que o efeito tripanocida de eupomatenóide-5 pode estar associada com o comprometimento do sistema antioxidante do parasita, levando ao aumento das EROs e conseqüentemente a morte do parasita.