



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIKA IZUMI

TRYPANOSOMA CRUZI:
ESTUDOS SOBRE O EFEITO DO PARTENOLÍDEO

Londrina
2007

ERIKA IZUMI

TRYPANOSOMA CRUZI:
ESTUDOS SOBRE O EFEITO DO PARTENOLÍDEO

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

Orientação: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Co-Orientação: Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Londrina
2007

ERIKA IZUMI

TRYPANOSOMA CRUZI:
ESTUDOS SOBRE O EFEITO DO PARTENOLÍDEO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 27 de fevereiro de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pela vida, por tudo.
À minha mãe, pai e irmão, por acreditarem em mim, pelas palavras e pelo silêncio, ambos na hora certa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança depositada em mim e pelo novo caminho que temos pela frente.

À Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, pela co-orientação neste trabalho, pelo apoio e incentivo em todos esses anos, desde a iniciação científica.

Aos professores Tânia Ueda-Nakamura e Benedito Prado Dias Filho, pelo auxílio e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, pelo acompanhamento de parte do trabalho, assim como seus alunos Aparecida D. Malvezi, Celso L. Borges e Vera Tatakihara.

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

Aos amigos próximos e distantes, que sempre me incentivaram a seguir em frente, pelo apoio, incentivo, ajuda e momentos memoráveis.

A todos os companheiros de laboratório, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Em especial agradeço aos de convívio quase diário ou que a semelhança do trabalho permitiu um contato maior: (UEM) Erika R.F. Ramos, Thelma Onozato, Kelly Ishida, Rodrigo H. Valdez, Simone E. D. Hernandez, Adriana O. Santos, Raíssa B. Pedroso, Nil L.R. Bittencourt, Karin J. Pelizzaro Rocha, Eliana H. Endo, Patrícia R. Santos, Flaviano J. Marçal, Jackeline T. Guinoza Siraichi, Mariele C. M. N. Puhl; (UEL) Paulo R. C. Corrêa, Tatiana A. C. B. Souza, Natália S. Botelho, Narjara C. Oliveira, Viviane K. G. Souza, Fernando C. Bizerra, Graziela Navarro, Janaína A. S. Ferro, Vanessa D. Raimo.

A todos que estiveram do meu lado durante essa longa caminhada...

MUITO OBRIGADO!

“Não sei o que posso parecer para o mundo, para mim mesmo, porém, pareço ter sido somente como um menino que brinca à beira do mar, tendo me distraído em encontrar vez por outra um seixo mais liso ou mais bonito que o comum, enquanto o imenso oceano de verdade se estende à minha frente, inteiramente desconhecido.”

Isaac Newton

“O senhor é meu pastor e nada me falta...”

Salmo 22

IZUMI, Erika. *Trypanosoma cruzi*: estudos sobre o efeito do partenolídeo. 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e é a doença endêmica de maior abrangência na América Latina, com aproximadamente 100 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. Assim como outras doenças causadas por protozoários parasitas, a única droga disponível para o tratamento dos doentes apresenta muitos efeitos colaterais, e no caso da doença de Chagas, também baixa eficácia na fase crônica. Uma alternativa visada atualmente é o estudo de substâncias extraídas de fontes naturais, como as plantas, para substituir drogas convencionais e conhecidamente tóxicas no tratamento de inúmeras doenças e disfunções. *Tanacetum parthenium* é uma planta medicinal usada há anos no tratamento de enxaqueca, febre e inflamações. Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito dos extratos brutos, frações e substância purificada partenolídeo, sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*, bem como avaliar o efeito tóxico em hemáceas de mamíferos e células de linhagem. O partenolídeo foi estudado quanto sua ação na viabilidade de formas tripomastigota e amastigota, alterações ultraestruturais e na interação parasita-hospedeiro. Ao longo do processo de purificação, o efeito tripanocida foi aumentando, resultando em inibição de 50% após 96 h, na faixa de 3,0 – 280 µg/ml para os extratos brutos, 2,1 – 79,0 µg/ml para as frações e 0,5 µg/ml para o partenolídeo, em formas epimastigotas. As concentrações citotóxicas de 50% também foram determinadas entre 3,2 – 432,5 µg/ml em células de mamífero e 240 - 700 µg/ml em hemáceas. A partir das concentrações obtidas foi determinado o índice de seletividade de 1,5 – 12,6, 0,9 – 80,9 e 6,4, para extratos brutos, frações e partenolídeo, respectivamente. A viabilidade das formas tripomastigotas, a temperatura de 4 °C e 37 °C após 24 h, e amastigotas a 4 °C, foi de aproximadamente 60-65%, na concentração de 20 µg/ml. A 37 °C, as concentrações efetivas de 50% e 90% em amastigotas foram determinadas em 2,2 e 6,8 µg/ml, respectivamente. Na interação parasita-hospedeiro, após 96 h de tratamento com partenolídeo, o índice de internalização foi reduzido em 51% na concentração de 2 µg/ml e 96,6% a 4 µg/ml. Foram visualizadas alterações morfológicas e ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET) em epimastigotas e amastigotas tratadas com partenolídeo. Na MET mostrou alterações em algumas organelas como núcleo, reservossomos, mitocôndria, também formação de vacúolos e estruturas concêntricas. Alterações morfológicas foram visualizadas por MEV nas duas formas replicativas do parasita, principalmente distorções no corpo celular.

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*. *Tanacetum parthenium*. Partenolídeo. Interação parasita-hospedeiro. Ultraestrutura.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBS	–	Tampão salina-fostato
pH	–	Potencial de Hidrogênio
x g	–	Giros
ml	–	Mililitro
µl	–	Microlitro
µm	–	Micrômetro
nm	–	Nanômetro
g	–	Gramas
µg	–	Micrograma
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
M	–	Molar
mM	–	Milimolar
°C	–	Graus Celsius
DMSO	–	Dimetil Sulfóxido

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS E <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
1.2 PROTEASES DE PARASITAS	14
1.3 COMPOSTOS NATURAIS.....	16
2 OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS	21
ARTIGOS	26
Artigo 1 – Antiprotozoal activity of <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) on epimastigote forms of <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Artigo 1 - <i>Trypanosoma cruzi</i> : Activity of parthenolide on proliferative and infective forms	45
ANEXOS	26
Anexo – Artigo 1 “Antiprotozoal activity of <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) on epimastigote forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> ”	32
Anexo – Artigo 2 “ <i>Trypanosoma cruzi</i> : Activity of parthenolide on proliferative and infective forms”	50

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS E *TRYPANOSOMA CRUZI*

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi inicialmente descrita em 1909 por Carlos Chagas. A partir da descoberta da doença, foi possível identificar o agente etiológico, o vetor e o ciclo silvestre e doméstico do parasita. Os principais sintomas e conseqüências da doença também foram descritas em seres humanos, contribuindo para que o diagnóstico do mal que afetava a população na época pudesse ser feito mais seguramente, e hoje, quase 100 anos depois, estima-se cerca de 18 milhões de pessoas infectadas, quase que a totalidade na América latina (WHO, 2002).

A doença representa um problema sério de saúde pública em todos os países no qual está presente, aumentando os custos do sistema com gastos no tratamento dos doentes e provocando a invalidez de indivíduos ainda em idade produtiva. No Brasil, estima-se que mais de dois milhões de pessoas estejam infectadas, cerca de 1,5% da população (Brener, 2000).

Estudos em paleoepidemiologia ainda não possibilitaram determinar com exatidão quando os seres humanos entraram no ciclo do parasita, servindo como hospedeiros e se tornando susceptíveis à doença de Chagas. Entretanto, alguns estudos moleculares com tecidos extraídos de múmias da região Andina mostraram a presença do parasita em populações locais de aproximadamente 9000 anos atrás (Aufderheide e cols., 2004).

A transmissão pode ocorrer de duas maneiras. Naturalmente através de excretas contaminadas de insetos triatomíneos hematófagos, também por via oral e transplacentária. O avanço da medicina proporcionou a transmissão artificial por transfusão sanguínea e também transplante de órgãos infectados, segundo casos relatados em épocas anteriores ao controle realizado atualmente.

A doença de Chagas é considerada a parasitose endêmica latino-americana de maior impacto socioeconômico, já que a transmissão natural está diretamente relacionada às condições de vida da população nas áreas de risco. Felizmente, nas últimas décadas, a taxa de infecção mediada pelo vetor vem decaindo nas regiões anteriormente consideradas endêmicas devido à melhoria das habitações. Entretanto, ao mesmo tempo, observa-se um

aumento significativo de casos em regiões de colonização recente, como a região de floresta amazônica (Akhavan, 2000).

A partir dos anos 70, iniciaram-se programas de erradicação da doença em vários países. Um desses programas consistiu no controle do vetor por pulverização de habitações e áreas circunvizinhas, o qual resultou em alguns acordos entre países para controlar, em ambos os lados da fronteira, as espécies mais importantes para a transmissão. O esforço em grande parte foi recompensado, visto que em 1997 e 1999, Uruguai e Chile foram respectivamente certificados como livres de transmissão da doença. De 1975 a 1995, o governo brasileiro investiu aproximadamente 420 milhões de dólares no controle da doença de Chagas. Como consequência disso, em março de 2000, vários estados da nação previamente considerados endêmicos foram também certificados como livres da transmissão vetorial (Akhavan, 2000).

Outros problemas de transmissão, como por transfusão sanguínea, foram detectados a partir de 1935, porém somente na década de 80, com a emergência da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), que se iniciou um exame mais rigoroso dos doadores e o controle dos estoques sanguíneos com drogas antiparasitárias, como cristal violeta. Apesar disso, em 1991, a transmissão por transfusão de estoques contaminados de sangue era ainda um problema sério em vários países endêmicos da América latina, visto que nesta época, apenas Brasil, Argentina e Uruguai possuíam legislação específica para qualidade do sangue (Dias e cols., 2002).

A transmissão congênita do parasita, foi descrita em 1940 e identificada em quase todos os países, com incidência de 0,5 a 10% variando de acordo com a região. O controle se deu através da realização de exames nas gestantes e também no bebê após 6 meses do nascimento, com administração de droga antiparasitária nos casos confirmados. Também houve detecção de casos de infecção através de transplante de órgãos, porém o controle já é realizado com exames dos doadores. Apesar de todos os esforços individuais e conjuntos, o controle da doença apresenta resultados diferentes, visto que os investimentos e a legislação de cada país impedem que a transmissão seja erradicada totalmente e simultaneamente. No Brasil, atualmente, a taxa de transmissão congênita varia entre 1 e 4% (Dias e cols., 2002).

A doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica. A fase aguda pode se apresentar como uma lesão inflamatória (chagoma) no local de entrada do parasita. Quando a entrada do mesmo ocorre pela mucosa do olho, pode-se visualizar após alguns dias o sinal de Romaña, caracterizado pelo inchaço em um dos olhos. No período de duas semanas a um mês, ocorre quadros febris discretos, linfadenopatia, náusea, mal estar geral e

hepatoesplenomegalia. Em casos mais graves pode haver irritação da meninge, taquicardia, arritmias e outras alterações cardíacas, que em casos raros levam o indivíduo à morte (Tanowitz e cols., 1992). Quando a infecção não é detectada e tratada, esta pode evoluir para a fase crônica, na qual a maioria dos infectados permanece por toda a vida sem nenhum sintoma. Porém, quando a doença se manifesta podem aparecer eventos tromboembólicos, falência cardíaca, arritmias, aneurismas, mionecroses e hipertrofia miocelular, levando aos casos chagásicos típicos de dilatações no coração, cólon e esôfago (Koeberle, 1968; Tanowitz e cols., 1992).

O ciclo de vida de *T. cruzi* se passa em dois hospedeiros, um inseto vetor e um mamífero. As formas epimastigotas (estágios replicativos extracelulares) se multiplicam no intestino médio do vetor. Após esta etapa, estas formas migram para o intestino posterior onde se aderem à superfície mucosa e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas, não replicativas). No momento do repasto sangüíneo, o inseto libera as formas infectivas nas fezes que entram no mamífero através de lesões na pele e mucosas. No tecido infectado, os tripomastigotas invadem células do hospedeiro (macrófagos, miócitos) e no seu interior se diferenciam em amastigotas (formas replicativas intracelulares) que se multiplicam e ainda no interior da célula hospedeira se diferenciam em tripomastigotas, os quais são liberados após ruptura celular. Após vários ciclos de infecção e replicação, durante a fase aguda, os tripomastigotas atingem órgãos e outros tecidos do hospedeiro, dispersados através da corrente sangüínea, onde darão origem aos ninhos de amastigotas ou então infectam o inseto vetor, durante um novo repasto (Souza, 2002).

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasita pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e sub-família Triatominae. Os triatomíneos têm hábito noturno e são hematófagos em todos os estágios de vida, tanto o macho quanto a fêmea. Defecam logo após o repasto sangüíneo sendo, portanto, possíveis transmissores da doença de Chagas. A fêmea põe até 500 ovos durante a vida e o tempo de incubação varia de 15 a 30 dias. A duração do ciclo de vida do inseto até seu último estágio adulto depende da temperatura, alimentação, umidade relativa e espécie, variando entre 100 dias a 2 anos (Lent e cols., 1979).

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. A Organização Mundial de Saúde, em um levantamento feito em 1990, reportou as 6 espécies de maior importância: *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *P. megistus*. No ano 2000, 10 anos depois, um novo estudo mostrou apenas 3 espécies ainda significativas: *R. prolixus*, *T. infestans* e *T.*

dimidiata. A diminuição de casos de transmissão vetorial, bem como a diminuição do número de espécies significativas decorre da melhoria nas condições habitacionais e o controle populacional dos vetores em áreas circunvizinhas as comunidades em risco (Moncayo, 2003).

O parasita *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da tripanossomíase americana. Na classificação taxonômica atual pertence à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Os organismos pertencentes a essa ordem possuem um organela conhecida como cinetoplasto, que é uma região diferenciada da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial organizado em mini e maxi-círculos, denominado k-DNA (Levine e cols., 1980). A família é constituída de protozoários parasitas uniflagelados, mono ou heteroxênicos, na qual também estão presentes outros parasitas de importância médica como *Trypanosoma brucei*, responsável pela tripanossomíase africana (doença do sono) e espécies do gênero *Leishmania*, responsáveis pelas leishmanioses cutâneas, mucosas e viscerais (Hoare & Wallace, 1966).

T. cruzi apresenta no citoplasma, além do cinetoplasto, algumas organelas distintas como o acidocalcissomo, que armazena íons cálcio para posterior utilização na célula; o glicosomo, que possui em seu interior as enzimas da via glicolítica, onde esta ocorre; e o reservossomo, responsável pelo armazenamento de lipídios e proteínas, em especial as cisteína proteases denominadas cruzipainas (Souza, 2002).

A caracterização molecular do parasita utilizada nos últimos anos supõe 2 subdivisões, *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII), sendo esta última subdividida em 5 grupos (a-e) (Briones e cols., 1999). Acredita-se que estas subdivisões estejam relacionadas com a evolução do protozoário juntamente com seus hospedeiros mamíferos principais e também o seu potencial patogênico. A TcI estaria relacionada aos arborícolas, onde o hospedeiro mais comum seriam mamíferos marsupiais, enquanto que a TcII seriam principalmente animais terrestres tendo os tatus como principais hospedeiros. Outra avaliação seria a distribuição geográfica, que caracteriza a TcI predominante nos países da região amazônica e a TcII nos países do cone sul (Yeo e cols., 2005).

A principal resposta imune inata aos protozoários é a fagocitose, porém algumas espécies são capazes de resistir e se multiplicar dentro das células hospedeiras, mesmo dentro de macrófagos, como é o caso de *T. cruzi*. O processo de invasão celular ainda não é bem esclarecido, porém sabe-se da participação de lisossomos na formação do vacúolo parasitóforo. A forma tripomastigota se adere à membrana plasmática da célula hospedeira provavelmente através de diferentes glicoproteínas presentes na superfície do parasita, desencadeando processos de sinalização intracelular que resultam na elevação da

concentração de Ca^{2+} em ambas as células. Essa alteração na concentração de íons cálcio livres induz a migração gradual de lisossomos para o local da membrana onde o parasita está aderido. Enquanto os lisossomos se fundem à membrana, o parasita se internaliza em um vacúolo formado pelas membranas lisossomais. Após determinado tempo o vacúolo parasitóforo é rompido, liberando o protozoário no citoplasma. Ocorre então a diferenciação para a forma amastigota que se replica por fissão binária em ciclos aproximados de 12 horas (Tan & Andrews, 2002).

Devido à complexidade morfológica e fisiológica do *T. cruzi*, poucas drogas são utilizadas para o tratamento da doença de Chagas. Além disso, elas são pouco eficientes e altamente tóxicas para o hospedeiro. A busca de vacinas ainda se baseia em descobertas futuras sobre a antigenicidade apresentada pelo parasita e o controle epidemiológico esbarra nas condições sócio-econômica dos países latino-americanos.

Algumas diferenças existentes no metabolismo de mamíferos e *T. cruzi* são estudadas com o intuito de descobrir possíveis alvos quimioterápicos. Atualmente os alvos mais promissores são enzimas que atuam nas vias de produção ou degradação de radicais superóxidos, metabolismo de purinas, inibição da síntese de ergosterol, cadeia respiratória, cruzipaina e enzimas da via glicolítica, entre outros (Maya e cols., 2007).

No Brasil, a única droga disponível para tratamento da doença de Chagas é o benzonidazol (Roche), que não é eficaz na fase crônica da doença, porém pode levar a cura se o tratamento for iniciado logo após a infecção. Por causa da toxicidade desse composto, vários outros estudos são realizados com drogas sintéticas na tentativa de encontrar um composto efetivo contra o parasita (Bernacchi e cols., 2003; Menna-Barreto e cols., 2005; Silva e cols., 2006). Nos últimos anos, entretanto, a busca por extratos e compostos naturais de ação tripanocida tem aumentado, principalmente pela vantagem de mostrar eficiência e baixa ou nenhuma citotoxicidade (Nagafuji e cols., 2004; Luize e cols., 2006; Sülsen e cols., 2006).

1.2 PROTEASES DE PARASITAS

As proteases são enzimas essenciais para o desenvolvimento dos organismos e podem ser encontradas desde vírus até vertebrados. Uma classificação usual das enzimas proteolíticas é sua nomenclatura segundo seu sítio catalítico. Desta maneira, elas

podem ser divididas em serina, treonina, aspartato, metalo e cisteína proteases. Cada tipo enzimático apresenta diferença estrutural e funcional, além disso, sua localização na célula também determina a importância da mesma nas várias fases da vida do organismo (Sajid & McKerrow, 2002).

Entre todas as proteases expressas pelo parasita, a mais abundante pertence ao grupo das cisteína proteases. Após anos de estudos com diversos grupos enzimáticos, o interesse nas cisteína proteases tem aumentado a cada ano, principalmente em pesquisas envolvendo parasitas (McKerrow e cols., 1999). Esse crescente interesse se deve ao reconhecimento de que elas têm papel fundamental no ciclo de vida ou patogenicidade desses organismos. Associadas a tudo isso, as cisteína proteases derivadas de parasitas, se mostram peças-chaves nos processos de evasão do sistema imunológico, ativação enzimática, virulência, invasão celular e tecidual, bem como excistamento/encistamento, incubação e mudanças morfológicas (Sajid & McKerrow, 2002).

A principal cisteína protease do parasita *T. cruzi* é denominada cruzipaina (Cazzulo e cols., 1989). Caracterizada como uma glicoproteína (GP 57/51), esta protease exibe especificidade de substrato semelhante à catepsina-L e pertence à família papaína de cisteína proteases (Cazzulo e cols., 1997). A enzima é expressa com uma pro-seqüência típica, um domínio catalítico e uma extensão C-terminal incomum contendo cerca de 100-130 aminoácidos, similarmente encontrados em cisteína proteases de *T. brucei* (Mottram e cols., 1989) e *Leishmania* (Souza e cols., 1992). As cruzipainas são codificadas por múltiplos genes polimórficos e compreendem um amplo grupo de isoformas, cuja expressão é regulada durante a morfogênese do parasita e podem estar presentes tanto no interior celular, quanto ligado à membrana plasmática (Campetella e cols., 1992; Cazzulo, 2002).

Devido à importância dessas proteases, estas vêm sendo estudadas como possíveis alvos de novas drogas, que tanto poderiam agir como quimioproliféricas ou quimioterápicas, além do desenvolvimento de vacinas devido a sua alta antigenicidade. A cruzipaina é um antígeno imunodominante na doença de Chagas crônica e também possui papel importante na interação parasita-hospedeiro (Cazzulo, 2002).

Alexander e cols. (1998) utilizaram cepas de *Leishmania mexicana* mutantes para três genes de cisteína proteases e realizaram ensaios *in vivo*. Nesse estudo foi observada uma alteração da resposta imunológica, de Th2 nos animais infectados com a cepa selvagem para Th1 nos infectados com cepas mutantes. As cepas mutantes também se mostraram menos infectivas, provocando lesões menores, e os animais vacinados apresentaram resistência em diferentes graus quando desafiados com *L. mexicana* selvagem.

Em outros estudos com protozoários parasitas, Engel e cols. (1998) realizaram testes com inibidores de cisteína proteases em infecção experimental com *T. cruzi*, conseguindo alcançar a cura dos animais tratados. No mesmo trabalho também foi verificado a interrupção do ciclo celular das formas amastigotas, sem nenhuma alteração das células hospedeiras. Testes com inibidor natural endógeno foram desenvolvidos por Santos e cols. (2005), que estudaram o efeito da chagasina, um inibidor natural de cisteína proteases, sobre a diferenciação *T. cruzi* e sua infectividade em células de mamíferos, mostrando que a cruzipaina é essencial nos dois processos.

1.3 COMPOSTOS NATURAIS

As plantas são utilizadas desde os primórdios da civilização humana para tratamento de males e doenças. Esse conhecimento foi passado entre as gerações e ainda hoje persiste na maioria das regiões povoadas do globo. Muitas drogas utilizadas atualmente foram isoladas de plantas, mas considerando a grande biodiversidade e o pouco que foi estudado até hoje, este se mostra um campo ainda promissor de estudos que podem levar a novas descobertas, principalmente em regiões tropicais.

As plantas são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos orgânicos de baixo peso molecular, conhecidos como metabólitos secundários. O metabolismo secundário tem como função originar compostos que auxiliem as plantas durante o seu desenvolvimento. Tais metabólitos não são considerados essenciais para o desenvolvimento normal da planta, porém oferecem vantagens na sobrevivência da espécie. Atualmente existem mais de cem mil compostos de metabolismo secundário conhecidos e já isolados de plantas superiores. Além da função exercida na planta, também podem apresentar atividades biológicas interessantes quando aplicados na área farmacêutica, em inseticidas, antimicrobianos, corantes, fragrâncias e também na indústria alimentícia (Goossens e cols., 2003).

Os terpenóides, também conhecidos como terpenos, ocorrem em todas as plantas e compõem a maior classe de metabólitos secundários. Existem mais de 20.000 compostos terpenóides descritos, os quais exercem funções fisiológicas, metabólicas e estruturais importantes (Connolly & Hill, 1991). Uma única planta pode sintetizar muitos terpenos diferentes, em partes distintas do organismo e em épocas diferentes, para uma grande

diversidade de propósitos ao longo de seu desenvolvimento. Dentre esses se encontram pigmentos fotossintéticos (fitol, carotenóides), hormônios (giberelinas, ácido abscísico), carreadores de elétrons (ubiquinona, plastoquinona), componentes de membrana (fitosteróis), além de antimicrobianos e toxinas contra outras plantas e herbívoros (McGarvey & Croteau, 1995).

O terpenóide mais simples é o hidrocarboneto isopreno (C_5H_8). Todos os terpenóides podem ser classificados de acordo com o seu número de unidades de isopreno. Eles são formados a partir de reações que envolvem ligações de várias subunidades, oxidação, redução, isomerização, e outras transformações específicas de cada composto. As categorias mais bem conhecidas de terpenóides são os monoterpenóides (duas unidades de isopreno), os sesquiterpenóides (3 unidades) e os diterpenóides (quatro unidades) (Raven e cols., 2001).

Tanacetum parthenium é uma planta medicinal nativa do sudeste europeu e Ásia menor. Apesar de sua origem européia, encontra-se bem estabelecida na América do Norte e do Sul e no nordeste da África (Brown e cols., 1999). *T. parthenium* pertence à família Asteraceae (Compositae), segunda maior família de angiospermas, na qual já foram descritas mais de 500 sesquiterpeno-lactonas distintas entre suas espécies (Sessa e cols., 2000). As flores e principalmente as folhas são muito utilizadas popularmente, por via oral e local, para tratamento de febre, enxaqueca e inflamações.

O extrato da planta *T. parthenium* pode ser fracionado e permite o isolamento de substâncias purificadas. A substância mais ativa e ao qual se credita a propriedade medicinal da planta é conhecido como partenolídeo. O partenolídeo (Figura 1), um sesquiterpeno-lactona, contém um anel α -metileno- γ -lactona altamente eletrofílico, responsável pela resposta antiinflamatória (Kwok e cols., 2001), e um resíduo epóxido capaz de interagir rapidamente com sítios nucleofílicos de moléculas biológicas (Macias e cols., 1999).

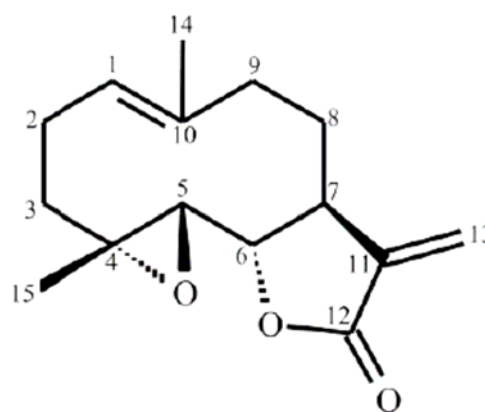


Figura 1 – Estrutura química do sesquiterpeno lactona ($4\alpha,5\beta$ -epoxy-germacra-1-(10),11-(13)-dien-12,6 α -olide (partenolídeo) isolado de *T. parthenium*.

O complexo NF κ B (fator nuclear kappa B) contém cinco proteínas que formam dímeros e regulam a transcrição de vários genes incluindo citocinas, moléculas de adesão celular, proteínas antiproliferativas c-myc e ciclina D1 e inibidores de apoptose (Chen e cols., 2004). Inibidores da via NF κ B se mostram promissores como anti-câncer e anti-inflamatório, como o composto partenolídeo (Riggins e cols., 2005).

O partenolídeo tem sido estudado em várias áreas e as pesquisas apresentam resultados otimistas. Guzman e cols. (2005) avaliaram a atividade do composto em leucemia mielóide crônica e aguda, e relataram a indução de apoptose nas células cancerígenas, poupando as células hematopoiéticas normais. O tratamento preventivo contra câncer de pele também foi apresentado por Won e cols. (2004). Esses autores mostraram que o partenolídeo foi capaz de reduzir a taxa de câncer de pele provocado por radiação ultravioleta tipo B (UVB) tanto *in vitro* como *in vivo*. Outra pesquisa *in vivo* realizada por Sheehan e cols. (2002) relataram que o tratamento com partenolídeo melhorou distúrbios cardiovasculares e choques endotóxicos em roedores, também foi capaz de reduzir o dano renal induzido pela cisplatina (Francescato e cols., 2007).

Além das propriedades já citadas, o partenolídeo tem apresentado atividade antimicrobiana de grande relevância principalmente para doenças parasitárias. Tiunan e cols. (2005) estudaram a atividade contra *Leishmania* e verificaram que o composto foi capaz de inibir a proliferação do parasita e reduzir a sobrevivência das formas intracelulares, ambos em concentrações baixas, sem apresentar toxicidade às células hospedeiras.

Todas as propriedades medicinais relatadas para as substâncias naturais têm como base os mecanismos de sinalização intracelular e o controle da expressão gênica

das células envolvidas, sejam estas as células do próprio hospedeiro ou parasitas. No trabalho publicado por Kwok e cols. (2001) o partenólídeo foi responsável por se ligar e inibir a I κ B kinase β (inibidor kappa B kinase beta), a subunidade conhecida por ter um papel importante na sinalização mediada por citocinas. Smolinski & Pestka (2005) realizaram experimentos *in vivo* mostrando que o partenólídeo reduz a expressão gênica de interleucinas (IL-6 e IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e a enzima ciclooxigenase (COX-2) em órgãos como baço e fígado, moléculas responsáveis pela resposta inflamatória.

As pesquisas com substâncias naturais isoladas de plantas tendem a aumentar considerando a grande diversidade de plantas existente e a necessidade de descoberta de novas drogas. Para isso, se faz necessário a realização de testes dessas novas substâncias em diferentes microrganismos patogênicos e doenças, já que o efeito obtido em cada modelo não é o mesmo e inicialmente pouco se sabe sobre o local de atuação da droga.

2 OBJETIVOS

- Mostrar o efeito dos extratos brutos, frações e substância purificada partenolídeo obtidas da planta *Tanacetum parthenium* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Verificar o efeito do partenolídeo na viabilidade de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos, frações e partenolídeo em eritrócitos e células de linhagem de mamíferos;
- Testar a atividade do partenolídeo na interação parasita-hospedeiro;
- Visualizar as alterações morfológicas e ultraestruturais de *T. cruzi* causadas pelo partenolídeo nas formas epimastigota, amastigota e tripomastigota;

REFERÊNCIAS

- AKHAVAN, D. **2000**. Análise de Custo-efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil, *Organização Pan-Americana da Saúde*, Brasília, p. 271.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. **1998**. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *The J. Immunol.*, v. 161, p. 6794-6801.
- AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS-JR., L.E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. **2004**. A 9,000-year record of Chagas' disease. *PNAS*, v. 101, n. 7, p. 2034–2039.
- BERNACCHI, A.S.; CAZZULO, B.F.; CASTRO, J.A.; CAZZULO, J.J. **2002**. Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 23, p. 399-404.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. **2000**. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro.
- BRIONES, M.R.S.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. **1999**. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 104, n. 2, p. 219-232.
- BROWN, A.M.G.; EDWARDS, C.M.; HARTMANN, T.T.V.; MARSHALL, J.A.; SMITH, R.M.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B.; LOWE, K.C. **1999**. Sexual hybrids of *Tanacetum*: biochemical, cytological and pharmacological characterization. *J. Experim. Botany*, v. 50, p. 435-444.
- CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ÅSLUND, L.; FRASCH, A.C.C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J.J. **1992**. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 50, p. 225-234.
- CAZZULO, J.J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; HELLMAN, U. **1989**. Further characterization and partial amino acid sequence of cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 33, p. 33-42.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. **1997**. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.*, v. 378, p. 1-10.

CAZZULO, J.J. **2002**. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 2, n. 11, p. 1261-71.

CHEN, L.F.; GREENE, W.C. **2004**. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature Rev., Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 392-401.

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. **1991**. Dictionary of terpenoids. **Chapman and Hall**, London.

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, n. 5, p. 603-612.

ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J.H. **1998**. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, v. 188, p. 725-734.

FRANCESCATO, H.D.C.; COSTA, R.S.; SCAVONE, C.; COIMBRA, T.M. **2007**. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicol.*, v. 230, p. 64-75.

GOOSSENS, A.; HÄKKINEN, S.T.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO T.; BIONDI, S.; SUTTER, V.; LAMMERTYN F.; NUUTILA, A.M.; SODERLUND, H.; ZABEAU, M.; INZE, D.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. **2003**. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS*, v. 100, n. 14, p. 8595-8600.

GUZMAN, M.L.; ROSSI, R.M.; KARNISCHKY, L.; LI, X.; PETERSON, D.R.; HOWARD, D.S.; JORDAN, C.T. **2005**. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood (Am. Soc. Hematology)*, v. 105, p. 4163-4169.

HOARE, C.A. ; WALLACE, F.G. **1966**. Developmental stages of trypanosomatids flagellates: a new terminology. *Nature*, v. 244, p. 69-70.

KOEBERLE, F. **1968**. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, v. 6, p. 63-116.

KWOK, B.H.B.; KOH, B.; NDUBUISI, M.I.; ELOFSSON, M.; CREWS, C.M. **2001**. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem. Biol.*, v. 8, p. 759-766.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. **1979**. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. His.*, v. 163, p. 123–520.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COZ, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIBERG, B.M.; LEEDADE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, F.; LYNN, D.; MERIFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G. SPRAGUE, V.; VAURA, J.; WALLACE, F.G. **1980**. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, v. 27, p. 37-38.

LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; VATARU-NAKAMURA, C. **2006**. Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 10, p. 2126-2130.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.; CASTELLANO, D.; VELASCO, R.F. **1999**. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): trans, trans-germacranolides. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 4407-4414.

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. and Physiol.*, v. 146, p. 601-620.

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. **1995**. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, v. 7, p. 1015-1026.

MCKERROW, J.H.; ENGEL, J.C.; CAFFREY, C.R. **1999**. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 7, p. 639-644.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A.V.; MORGADO-DIAZ, J.A.; SOARES, M.J.; CASTRO, S.L. **2005**. Effect of a b-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 56, p. 1034-1041.

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, n. 5, p. 577-591.

MOTTRAM, J.C.; NORTH, M.J.; BARRY, J.D.; COOMBS, G.H. **1989**. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett.*, v. 258, p. 211-215.

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.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **2001**. 6ª Edição. Biologia vegetal – “A composição molecular das células vegetais”. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro.

RIGGINS, R.B.; ZWART, A.; NEHRA, R.; CLARKE, R. **2005**. The nuclear factor κ B inhibitor parthenolide restores ICI 182,780 (Faslodex; fulvestrant)–induced apoptosis in antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, v. 4, n. 1, p. 33-41.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. **2002**. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120, p. 1-21.

SANTOS, C.C.; SANT’ANNA, C.; TERRES, A. ; CUNHA-SILVA, N.L. ; SCHARFSTEIN, J. ; LIMA, A.P.C.A. **2005**. Chagasin, the endogenous cysteine protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J. Cell Sci.*, v. 118, p. 901-915.

SESSA, R.A.; BENNETT, M.H.; LEWIS, M.J.; MANSFIELD, J.W.; BEALEI, M.H. **2000**. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca species*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 26877-26884.

SHEEHAN, M.; WONG, H.R.; HAKE, P.W.; MALHOTRA, V.; O’CONNOR, M.; ZINGARELLI, B. **2002**. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor- κ B pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol. Pharmacol.*, v. 61, p. 953-963.

SILVA, R.S.; COSTA, E.M.; TRINDADE, U.L.; TEIXEIRA, D.V.; PINTO, M.C.; SANTOS, G.L.; MALTA, V.R.; SIMONE, C.A.; PINTO, A.V.; CASTRO, S.L. **2006**. Synthesis of naphthofuranquinones with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 41, n. 4, p. 526-530.

SMOLINSKI, A.T.; PESTKA, J.J. **2005**. Comparative effects of the herbal constituent parthenolide (Feverfew) on lipopolysaccharide-induced inflammatory gene expression in murine spleen and liver. *J. Inflamm.*, v. 2, p. 1-8.

SOUZA, A.E.; WAUGH, S.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. **1992**. Characterization of a multicopy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.*, v. 311, p. 124-127.

SOUZA, W. **2002**. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Cur. Pharmaceut. Design*, v. 8, p. 269-285.

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.

TAN, H.; ANDREWS, N.W. **2002**. Don't bother to knock – the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *TRENDS in Parasitol.*, v. 18, n. 10, p. 427-428.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. **1992**. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 5, p. 400-419.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA, W.; VATARU-NAKAMURA, C. **2005**. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, v. 49, p. 176–182.

WHO – World Health Organization. **2002**. Expert Committee on the Control of Chagas Disease. *Control of Chagas Disease*, p. 1-95.

WON, Y.K.; ONG, C.N.; SHI, X.; SHEN, H.M. **2004**. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 1449-1458.

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 hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 225–233.

ARTIGOS

ARTIGO 1

Antiprotozoal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*

Erika IZUMI¹, Luis Gustavo MORELLO², Tânia UEDA-NAKAMURA², Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹, Benedito Prado DIAS FILHO^{1,2}, Diógenes Aparício Garcia CORTEZ³, Izabel Cristina Piloto FERREIRA³ and Celso Vataru NAKAMURA^{1,2*}

¹.- Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, CEP 86051-990, Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brasil; ².- Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil; ³.- Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá.

* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44 3261-4863. Fax: +55 44 3261-4860. E-mail address: cvnakamura@uem.br

ABSTRACT

This study reports the activity of the crude plant extracts, fractions, and isolated compound parthenolide obtained of aerial parts from *Tanacetum parthenium* on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Feverfew (*T. parthenium*) is a traditional herbal medicine that has been used for the treatment of migraine, fever, and arthritis in Asia and Europe. This study included the extraction process and bioassay-guided fractionation by the adsorption chromatography method. A progressive increase in the antitrypanosomal effect was observed in the course of the purification process. Activity against epimastigote forms have been observed for the crude extracts ($IC_{50/96h} = 3.0 - 280 \mu\text{g/ml}$), fractions ($IC_{50/96h} = 2.1 - 79.0 \mu\text{g/ml}$), and parthenolide ($IC_{50/96h} = 0.5 \mu\text{g/ml}$). In addition, toxicity of the active crude extracts, fractions, and parthenolide were evaluated on sheep blood cells and monkey Rhesus kidney cells. The cytotoxic concentrations in LLCMK₂ cells were observed ($CC_{50/96h} = 3.2 - 432.5 \mu\text{g/ml}$) as well as the haemolysis ($EC_{50/2h} = 240 - 700 \mu\text{g/ml}$). The selectivity index (CC_{50}/IC_{50}) for the crude extracts were in the range of 1.5 – 12.6, for the fractions 0.9 – 80.9, and for parthenolide 6.4. The trypanocidal activity of the *T. parthenium* is reported here for the first time.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. *Tanacetum parthenium*. Trypanocidal activity. Crude extracts. Epimastigotes.

INTRODUCTION

Tanacetum parthenium (Asteraceae), popularly known as feverfew, is a traditional herbal medicine that has been used for the treatment of fever, migraine, and arthritis in Asia and Europe for centuries (Won *et al.* 2004). In Brazil, this plant is available commercially in capsules (Tanaceto) for the prophylactic treatment of migraine. Its effects have been attributed to the plant content of sesquiterpene lactones, notably parthenolide. The crude extracts of this herb are known for their antimicrobial and anti-inflammatory properties (Martindale 1999; Tiuman *et al.* 2005a). Parthenolide has been studied for its ability to inhibit I κ B kinase, which is important in cytokine-mediated signaling (Kwok *et al.* 2001). The compound is also known for inducing apoptosis and metastasis reduction in carcinoma cells (Ralstin *et al.* 2006) and showed activity antiparasitic against *Leishmania amazonensis* (Tiuman *et al.* 2005b).

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease. It has a high prevalence in Latin America that affects about 18 million people and 100 million people live in risky areas (WHO, 2000). Its treatment is still a challenge, since the only two available drugs, nifurtimox and benznidazole, present severe side effects (De Castro, 1993). As a consequence, few people keep the long treatment and most of them give it up because of side effects. Treatment options for *T. cruzi* infections are suboptimal due to the toxicities and limited effectiveness of the available drugs. From the beginning of 1990s and with the revival of the phytotherapy, biological researches about antiprotozoal effects of plants have been in progress. Natural compounds of medicinal plants have presented lower toxicity regarding a higher specificity, creating an optimistic perspective about new treatments for diseases (Cowan 1999; Luize *et al.* 2006).

Several studies of crude plant extracts have already been done to find out plants with potencial compounds to treat Chagas' disease. For example: methanol, ethyl acetate, and

hexane crude extracts of some Colombian plants of Annonaceae family (Osorio *et al.* 2007) were effective against epimastigote forms at concentrations below 25 µg/ml. Sülsen *et al.* (2006) studied Argentine medicinal plants and found the organic and aqueous extracts active against *T. cruzi* with growth inhibition higher than 70% at concentration of 100 µg/ml. Extracts of Chinese and Mediterranean plants presented epimastigote growth inhibition from 20 to 100% when tested at 250 µg/ml (Schinella *et al.* 2002). As important as *in-vitro* studies, experiments *in-vivo* also have been made with different plant extracts and isolated compounds for evaluating their effect in host organisms (Bizimana *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2007).

Our objective was to determine the antiprotozoal activity of crude extract, fractions, and isolated compound parthenolide obtained from *T. parthenium* against epimastigote forms of *T. cruzi*. This trypanocidal activity of the *T. parthenium* is reported here for the first time. The cytotoxic activity against sheep blood cells and monkey Rhesus kidney cells was also determined.

MATERIALS AND METHODS

Plant material: Aerial parts dried of *T. parthenium* (Lot 166871) was kindly furnished by the Herbarium Laboratório Botânico Ltda (Colombo, Paraná, Brazil).

Extraction, fractionation, and identification of the compound: An amount of 1,000 g of plant material was sequentially extracted by exhaustive maceration in 10 liters ethanol:water (9:1) at room temperature in the dark. The supernatants were filtered, concentrated by rotary evaporator at approximately 40 °C, and lyophilised. The powder resulting from lyophilisation process, soluble in water, was termed the aqueous crude extract (**WCE**), and the residue was dissolved in ethanol or ethyl-acetate and was named according to the solvent used. The aqueous (**WCE**), ethanolic (**ACE**), and ethyl-acetate (**ECE**) crude extracts were assayed for their activity against epimastigote forms of *T. cruzi*. Subsequently, the ethanolic crude extract was chromatographed on a silica-gel 60 column (70-230 mesh - Merck®) using hexane, dichloromethane, ethyl-acetate, and methanol. Each fraction (hexane, **HF**; dichloromethane, **DF**; ethyl-acetate, **EF**; methanol, **MF**) was tested for antiprotozoal activity. The hexane and dichloromethane fractions were sub fractionated and resulted in isolation of a pure compound that was identified like sesquiterpene lactone, 4,5-epoxy-germacra-1-(10),11(13)-dien-12,6-olide (parthenolide) by chromatography-mass spectrometry (Micromass Quattro LC); nuclear magnetic resonance (NMR; Gemini 2000 BB; Varian), ¹H NMR (300 MHz), and ¹³C NMR (75.5 MHz) analyses in CDCl₃; infrared analysis (Bomem-MV 100; Hartmann & Braun-Michelson); and UV analysis (CARY 1E UV-Vis; Varian).

Parasite and culture procedure: The epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain were maintained at 28 °C by weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS).

Antitrypanosomal activity: Stock solutions of the crude plant extracts, fractions, and parthenolide were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO), which final concentration in the assay did not exceed 1.0%. For the assay, parasites were harvested during the exponential phase of growth, resuspended in LIT and plated in 24-well plates at 1×10^6 cells/ml. In each well were included different concentrations of crude plant extracts (1 µg/ml up to 1,000 µg/ml), fractions (1 µg/ml up to 100 µg/ml) or parthenolide (1 µg/ml up to 10 µg/ml) and incubated for 96 h at 28 °C. Cell density was performed by counting of parasites in a hemacytometer (Improved Double Neubauer) with a light microscope Olympus CX 31. Benznidazole (N-benzyl-2-nitro-1-imidazolacetamide - Roche Pharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil) was used as the reference drug. All assays were carried out twice in duplicate on different occasions.

Cytotoxicity assay: The cytotoxic effect was evaluated against LLCMK₂ (monkey Rhesus kidney cells, *Macaca mulatta*) line cells in 96-well plates. A suspension of 2.5×10^4 cells was added to each well and then were grown as monolayers for 24 h at 37 °C in 5%-CO₂ air mixture. After this period, different concentrations of crude extracts, fractions, or parthenolide were added to the wells and the plate was incubated for 96 h under the same conditions above. The cells were fixed in 10% of trichloroacetic acid at 4 °C for an hour, washed five times with distilled water and let to dry at room temperature. A solution of sulforhodamine B 0.4% (in acetic acid 1%) was added to each well and the plate was kept protected from light for 30 min at 4 °C. The wells were washed four times with 1% of acetic acid and an aliquot of 150 µl of

Tris-base 10 mM was added and homogenized for 15 min. The absorbance was read at 530 nm in microplate spectrophotometer (Bio Tek – Power Wave XS). Data were calculated as the percentage of inhibition. The concentration of 50% cellular toxicity (CC_{50}) was defined as the concentration which reduces the OD_{530} of treated cells to 50% of that of untreated cells.

Haemolytic assay: This experiment also evaluated the cytotoxicity of *T. parthenium*. A 4% suspension of freshly defibrinised sheep blood was prepared by adding blood to sterile 5% glucose solution. One milliliter of red blood cell suspension was added to each test tube, and different concentrations of crude plant extracts, fractions, and Amphotericin B (AMPB), a reference drug, which may cause anaemia were added, gently mixed, and incubated at 37° C for 120 min. Samples were centrifuged at 1,000 × g for 10 min. Absorbance of the supernatant was determined at 540 nm. The haemolysis was calculated according to the equation: Haemolysis (%) = $100 - [(A_p - A_s)/(A_p - A_c) \times 100]$; where A_p , A_s and A_c are the absorbance of the positive control, test sample and negative control, respectively. The negative control was the red-blood-cell suspension alone or with 1.0% DMSO, and the positive control was red blood cells lysed with Triton X-100. These tests were performed in duplicate on separate occasions.

Statistical analyses: Statistical analyses was performed with the program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). Student's *t* test was applied and a p-value less than 0.05 was regarded as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The compound isolated of the hexane and dichloromethane fractions of *T. parthenium* was identified as 4,5-epoxy-germacra-1-(10),11(13)-dien-12,6-olide (parthenolide). The ^1H -, ^{13}C -NMR spectral data analyses in CDCl_3 ; infrared and UV analysis were identical to those of published values by Tiunan *et al.*, 2005b.

The effects the crude plant extracts in epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain are presented in Figure 1A. At 1,000 $\mu\text{g/ml}$ all of crude extracts showed similar effect, inhibiting more than 90% of the parasites growth. At low concentrations, **ACE** was the most effective extract that inhibited the parasites growth with 32 and 68.5 % of inhibition, at 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively. At the same concentrations, no significant activity was obtained with polar crude plant extracts (**ECE** and **WCE**). The $\text{IC}_{50/96\text{h}}$ (50% inhibitory concentration after 96 h of incubation) values for **ACE**, **ECE**, and **WCE** crude plant extracts were 3.0; 50.0, and 280.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results obtained with fractions are presented in Figure 1B. The apolar fractions, **HF** and **DF** showed a very strong activity against the parasites proliferation similar to benznidazole (**BZ**), drug used as reference. On the other hand, polar fractions (**EF** and **MF**) showed no significant effect on epimastigote forms of *T. cruzi*. The $\text{IC}_{50/96\text{h}}$ calculated for both **HF** and **DF** fractions were 2.1 $\mu\text{g/ml}$, and for **EF** and **MF** was 79.0 and 40.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Figure 1C shows the effect of purified compound parthenolide and benznidazole in the growth of epimastigote forms. The $\text{IC}_{50/96\text{h}}$ concentration for the parthenolide was 0.5 $\mu\text{g/ml}$ while that for **BZ** was 1.8 $\mu\text{g/ml}$. Significant differences were obtained from statistical analyses with *t-Student* test ($p < 0.05$), confirming the efficacy of parthenolide.

A progressive increase in the antitrypanosomal effect was observed in the course of the purification process. Bioassay-guided fractionation led us to hexane and dichloromethane fractions which showed the best activity against epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain. The

sesquiterpene parthenolide showed to be almost four times more effective against epimatigote forms than the reference drug benznidazole which is in accordance with previous works where sesquiterpenes have showed interesting antiparasitic properties (Kayser *et al.* 2003). Sesquiterpene lactones isolated from different plant species have showed *in vitro* activity against *T. cruzi* (Breggio *et al.* 2000; Jimenez-Ortiz *et al.* 2005).

The 50% citotoxic concentration after 96 h of incubation ($CC_{50/96h}$) of crude extracts, fractions, and parthenolide in LLMCK₂ cells is shown in Table 1. The lowest citotoxicity was observed for **WCE**, with $CC_{50/96h}$ of 432.5 $\mu\text{g/ml}$, while **ECE** was similar to **MF** fraction, showed a $CC_{50/96h}$ of 265.0 $\mu\text{g/ml}$. **ACE** and **DF** were more toxic to the cells with values of 38.0 and 14.5 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Intermediary citotoxicity was observed for **HF** (170.0 $\mu\text{g/ml}$) and **EF** (74.0 $\mu\text{g/ml}$) fractions. The $CC_{50/96h}$ determined for parthenolide was 3.2 $\mu\text{g/ml}$. The fraction **HF** showed to have a selectivity index of 80.9 and **ACE**, 12.6. **EF** and **WCE** had index below 2. **ECE**, **DF**, **MF**, and parthenolide had their IS determined in 5.3, 6.9, 6.6 and 6.4, respectively.

ACE crude extract and **DF** fraction at 500 $\mu\text{g/ml}$ cause 93% and 11% of haemolysis, respectively. $EC_{50/2h}$ (50% effective concentration after 2 h of incubation) calculated for **ACE** and **DF** was 240 and 700 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Parthenolide and benznidazole did not cause any lysis of erythrocytes in concentration below of 100 $\mu\text{g/ml}$. Cells treated with AMPB at 8.4 $\mu\text{g/ml}$ showed 50% lysis, while at 100 $\mu\text{g/ml}$ showed 90.5% lysis (Figure 2). The red-blood-cell control with or without 1.0% DMSO did not show haemolysis and positive control Triton X-100 showed 100 % haemolysis.

Water crude extract had the lowest citotoxicity against LLCMK₂ cells but showed a very low selective index. The best selectivity was obtained by hexane fraction and the haemolytic effect of dichloromethane was smaller than those of crude plant extracts. Dichloromethane, methanol, and hydroalcoholic crude extracts, together with purified

compounds obtained from *Lychnophora pohlii* were tested against *T. cruzi*. The sesquiterpene lactones presented the best activity and Goyazensolide showed the lowest IC₅₀ value, 15.8 µg/ml (Grael *et al.* 2005). Contrary to our study, those sesquiterpene lactones presented a strong haemolytic activity which is not observed for parthenolide.

CONCLUSION

Natural products present a good potential for the discovery of new agents to combat tropical diseases such as Chagas disease. In this study the biological effect of *T. parthenium* on epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain was reported. Extracts could result in potential sources of lead compounds for the development of more effective drugs for the treatment of Chagas disease. Bioguided fractionation of *T. parthenium* resulted in the isolation of pure parthenolide with trypanocidal activity. This activity represents an exciting advance in the search for new antiprotozoal agents from natural sources but further *in vitro* and *in vivo* studies are necessary to confirm these results.

Acknowledgements:

This study was supported through grants from DECIT/SCTIE/MS and MCT by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

REFERENCES

- BIZIMANA, N., TIETJEN, U., ZESSIN, K.H., DIALLO, D., DJIBRIL, C., MELZIG, M.F., CLAUSEN, P.H. 2006, Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and in vivo trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol*, 103, 350–356.
- BRENGIO, S.D.; BELMONTE, S.A.; GUERREIRO, E.; GIORDANO, O.S.; PIETROBON, E.O.; SOSA, M.A. 2000, The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*, 86, 407–412.
- CAMARGO, E. P. 1964, Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 6, 93-100.
- COWAN, M. M. 1999, Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12, 564-582.
- DE CASTRO, S.L. 1993, The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, 53, 83-98.
- FERREIRA, M.E., NAKAYAMA, H., ARIAS, A.R., SCHININI, A., BILBAO, N.V., SERNA, E., LAGOUTTE, D., SORIANO-AGATÓN, F., POUPON, E., HOCQUEMILLER, R., FOURNET, A. 2007, Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Ethnopharmacol*, 109, 258–263.
- GRAEL, C.F.F., ALBUQUERQUE, S., LOPES, J.L.C. 2005, Chemical constituents of *Lycnophora pohlii* and trypanocidal activity of plant crude extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76, 73-82.
- JIMENEZ-ORTIZ, V., BRENGIO, S.D., GIORDANO, O., TONN, C., SANCHEZ, M., BURGOS, M.H., SOSA, M.A. 2005, The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *J Parasitol*, 91, 170–174.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A.; CROFT, S. 2003, Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res*, 90, 55-62.
- KWOK, B. H. B., KOH, B., NDUBUISI, M. I., ELOFSSON, M., CREWS, C. M. 2001, The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem Biol*, 8, 759-766.

LUIZE, P. S., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V. 2006, Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull*, 29, 2126-2130.

MARTINDALE 1999, Feverfew. In: Martindale: the complete drug reference, (Ed. K. Parfitt). *The Pharmaceutical Press*. 32. ed., 447.

OSORIO, E., ARANGO, G.J., JIMÉNEZ, N., ALZATE, F., RUIZ, G., GUTIÉRREZ, D., PACO, M.A., GIMÉNEZ, A., ROBLEDO, S. 2007, Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol*, in press, DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.015.

RALSTIN, M. C., GAGE, E. A., YIP-SCHNEIDER, M. T., KLEIN, P. J., WIEBKE, E. A., SCHMIDT, C. M. 2006, Parthenolide cooperates with NS398 to inhibit growth of human hepatocellular carcinoma cells through effects on apoptosis and G₀-G₁ cell cycle arrest. *Mol Cancer Res*, 4, 387-399.

SCHINELLA, G.R., TOURNIER, H.A., PRIETO, J.M., RÍOS, J.L., BUSCHIAZZO, H., ZAIDENBERG, A. 2002, Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*, 73, 569-575.

SÜLSEN, V., GÜIDA, C., COUSSIO, J., PAVETO, C., MUSCHIETTI, L., MARTINO, V. 2007 In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Res*, 98, 370-374.

TIUMAN, T. S., UEDA-NAKAMURA, T., CORTEZ, D. A. G., DIAS FILHO, B. P., MORGADO-DÍAZ, J. A., DE SOUZA, W., NAKAMURA, C. V. 2005b, Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 49, 176-182.

TIUMAN, T. S., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V. 2005a, Studies on the effectiveness of *Tanacetum parthenium* against *Leishmania amazonensis*. *Acta Protozool*, 44, 245-251.

WHO – World Health Organization. 2000, Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). *Nat Prod Parasit Diseases TDR News* 62, 4.

WON, Y. K., ONG, C. N., SHI, X., SHEN, H. M. 2004, Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*, 25, 1449-1458.

Table 1 – Citotoxicity, growth inhibition and selectivity index of the crude extracts, fractions, and isolated compound parthenolide of *Tanacetum parthenium*.

Drugs	CC _{50/96h} (µg/ml)	IC _{50/96h} (µg/ml)	IS
ACE	38.0	3.0	12.6
ECE	265.0	50.0	5.3
WCE	432.5	280.0	1.5
DF	14.5	2.1	6.9
HF	170.0	2.1	80.9
EF	74.0	79.0	0.9
MF	265.0	40.0	6.6
Parthenolide	3.2	0.5	6.4

$$IS = CC_{50}/IC_{50}$$

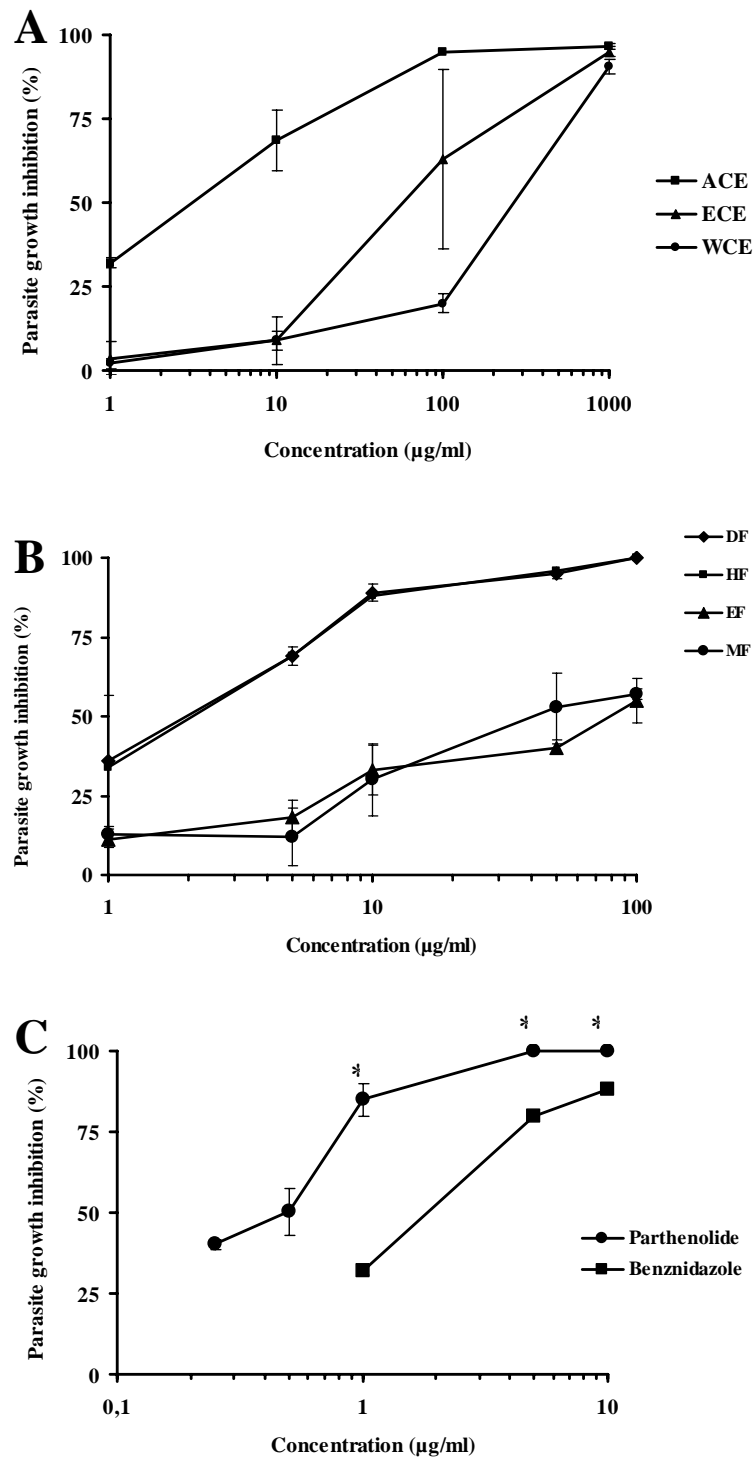


Figure 1. Effects of *Tanacetum parthenium* in epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* cultured for 96 h in the presence of the indicated concentrations. (A) Crude extracts (WCE, ACE, and ECE); (B) fractions (HF, DF, EF, and MF); (C) Parthenolide and Benznidazole. The results are from two experiments in duplicate and are shown as percentages \pm standard deviations of growth inhibition in relation to control untreated protozoan. * Statistical difference ($p < 0.05$)

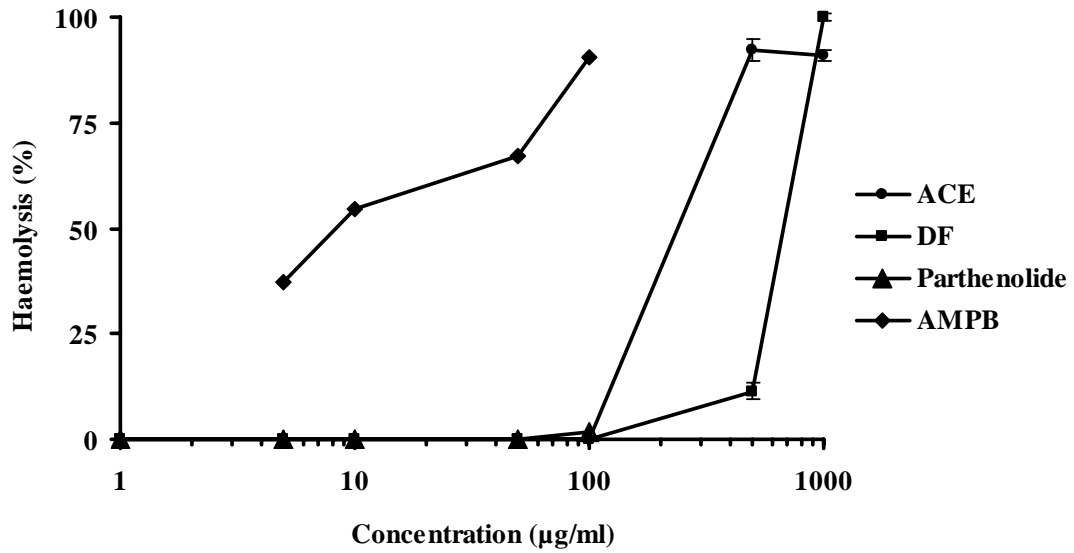


Figure 2. Haemolytic properties of ethyl-acetate crude extract (**ACE**), dichloromethane fraction (**DF**), and parthenolide obtained from aerial parts of *Tanacetum parthenium*. Amphotericin B (**AMPB**) was included in the assay as a reference drug.

ARTIGO 2

***Trypanosoma cruzi*: Activity of parthenolide on proliferative and infective forms**

Erika IZUMI¹, Tânia UEDA-NAKAMURA², Sueli Fumie YAMADA-OGATTA¹, Benedito Prado DIAS FILHO^{1,2}, José Andrés MORGADO-DÍAZ³ and Celso Vataru NAKAMURA^{1,2*}

¹.- Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina; ².- Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ³.- Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* Address for correspondence: Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, Bloco I-90 Sala 123 CCS, Avenida Colombo, 5790; BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44 3261-4863. Fax: +55 44 3261-4860. E-mail address: cvnakamura@uem.br

ABSTRACT

American trypanosomiasis is an endemic disease present in Latin American countries. An efficient treatment of the chronic patients was not developed yet due to the difficulty of finding an active drug against the intracellular form of the parasite. Besides the studies with synthetic drugs, the search for natural compounds with trypanocidal effect is growing. In this study, we evaluated the activity of the natural compound parthenolide against *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Epimastigote, amastigote, and trypomastigote forms were treated and the viability and morphological and ultrastructural alterations were verified. The viability of amastigotes was determined at 37°C and the results showed that 50% and 90% effective concentration after 24 h of treatment (EC_{50/24h} and EC_{90/24h}) were 2.2 and 6.8 µg/ml respectively. For trypomastigotes, both temperatures of 4 °C and 37 °C kept the percentage of viable cells around 65% until the maximum concentration tested. The internalization index of *T. cruzi* in LLCMK₂ cells after 96 h of treatment was reduced around 51% at the concentration of 2 µg/ml and 96.6% at 4 µg/ml. The ultrastructural analysis by transmission electron microscopy showed alterations mainly in reservosomes, nucleus, mitochondrion, vacuoles formation, and organization of internal membranes. Scanning electron microscopy permitted the visualization morphologic modifications in both replicative forms of the parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Parthenolide. Trypanocidal activity. Host-cell interaction.

INTRODUCTION

Chagas disease, the most important endemic disease in Latin America, is responsible for approximately 21,000 deaths and 200,000 new cases per year (WHO, 2002). The drugs available for the treatment present serious toxic side effects and do not guarantee the cure during the chronic phase (Castro *et al.* 2006; Maya *et al.* 2007). The researches for finding new antimicrobial drugs have grown the last decades and the plants biodiversity is promising in providing effective compounds with low toxicity (Kayser *et al.* 2003; Cowan, 1999).

Terpenoid compounds are the largest group of plant secondary metabolites. They are produced by plants for different purposes and when used by pharmaceutical industries can show good results against diseases and physiological dysfunctions (Aharoni *et al.* 2006). Parthenolide is a sesquiterpene lactone isolated from the medicinal plant *Tanacetum parthenium*, popularly known as feverfew. This compound is the main responsible for the medicinal effects of the plant, used by population in cases of fever, migraine, and arthritis since ancient times (Won *et al.* 2004). Parthenolide has been studied for presenting activity against cancer cells, being able to induce apoptosis and reduce cell proliferation. It can also show efficient results in inflammation processes, inhibiting a signaling pathway. The antiprotozoal activity was evaluated against *Leishmania* showing good results and adding parthenolide to the list of promising antiparasitic drugs (Riggins *et al.* 2005; Tiunan *et al.* 2005; Francescato *et al.* 2007). Early, a previous study with parthenolide indicated that this drug is able to inhibit the growth of epimastigote forms of *T. cruzi* in 50% at the concentration of 0.5 µg/ml and 90% at 1.25 µg/ml, after 96 h of incubation.

Our objective was to evaluate the viability of amastigote and trypomastigote forms and verified the morphologic and ultrastructural alterations of *T. cruzi* treated with parthenolide. It was also reported its effect on the interaction of the parasite with the host cells.

MATERIALS AND METHODS

Purified compound. Parthenolide (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was prepared in a stock solution of 1,000 µg/ml in phosphate saline buffer (PBS) with 10% of dimethylsulfoxide (DMSO – Sigma). The stock solution was kept at -20 °C.

Activity against trypomastigote forms. Trypomastigotes were obtained from cell line culture. Monkey Rhesus kidney cells (LLCMK₂) were infected with 1×10^7 parasites and after a period of 5 days, the parasites were harvested from the supernatant. In 96-wells plate, they were inoculated in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) plus 10% of mouse blood and fetal bovine serum (FBS). Parthenolide was added at different concentrations, from 1 to 20 µg/ml, and the plates were incubated at 4 °C and 37 °C during 24 h. Crystal violet was added as positive control drug at the concentration of 250 µg/ml. The viability was determined by counting mobile parasites by Pizzi-Brener method (Brener, 1962) in an optic microscope slide.

Activity against amastigote forms. Amastigotes were obtained from lysis of the infected LLCMK₂ cell lines and harvested from the supernatant. Experiments were made in 96-wells plate. The amastigotes were inoculated in DMEM medium at a concentration of 1×10^7 parasites/ml supplemented with 10% of FBS. Parthenolide was added at different concentrations, from 1 to 20 µg/ml, and the plates were incubated at 4 °C and 37 °C during 24 h. Crystal violet was also added as a positive control drug at the concentration of 250 µg/ml. Viable and unviable amastigotes were determined by counting in a hemacytometer (Improved Double Neubauer) with a light microscope, after the addition of 0.4% of erythrosine B.

Interaction with host cells. In a 24-wells plate, 2.5×10^5 cells/ml (LLCMK₂) were plated on round cover slips with DMEM medium, supplemented with 10% of FBS. The plate was incubated for 24 h at 37°C 5% CO₂ for growing of a monolayer. Trypomastigotes were added to the wells at a concentration of 20 parasites per cell and incubated for 24 h. After this period, the wells were washed three times with PBS for removing the non internalized parasites. Cells were then incubated for a maximum period of 96 h with parthenolide at 2 and 4 µg/ml. Control and treated cells were fixed after 48, 72, and 96 h with methanol, stained with Giemsa and the cover slips were permanent prepared with Entellan[®]. The internalization index (number of infected cells x mean of amastigotes per cell) was determined by counting of 200 cells in a light microscope.

Scanning electron microscopy. After the treatments, epimastigote and amastigote forms were washed with 0.01 M PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h. The parasites were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate buffer, placed on the poli-L-lisin-coated coverslip, dehydrated in different concentrations of ethanol, critical point-dried in CO₂, sputter-coated with gold, and observed in a Shimadzu SS-550 scanning electron microscope.

Transmission electron microscopy. After treatment with parthenolide ($IC_{50\ 96h} = 0.5$ µg/ml and $IC_{90\ 96h} = 1.25$ µg/ml), epimastigote forms were washed in 0.01 M phosphate-buffered saline and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. The cells were postfixed in a solution containing 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, washed in the same buffer, dehydrated in different concentrations of acetone, and embedded gradually in Epon resin, which was incubated for polymerization at 60

°C for 72 h. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Zeiss 900 transmission electron microscope.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with the program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). The tests included Student's *t* test, and Tukey test (one-way ANOVA). A p-value less than 0.05 was regarded as significant.

RESULTS

Activity in trypomastigote forms. The activity of the parthenolide in viability of trypomastigote forms was similar at 4 °C and 37 °C. The concentrations from 2.5 to 20 µg/ml kept the viability between 55-65%, without significant differences among them (Figure 1A). The treatment with crystal violet at the concentration of 250 µg/ml, the control drug, showed no viable parasite after 24 h, for both temperatures (data not shown).

Activity in amastigote forms. Parthenolide had a good effectiveness at 37 °C which the effective concentration of 50% (EC₅₀) was obtained at 2.2 µg/ml and 90% (EC₉₀) was verified at 6.8 µg/ml, after 24 h. The percentage of viable cells were decreasing from 77% at 1 µg/ml until 4% at 10 µg/ml. Above this value, less than 1% of viability was observed. At 4 °C, parthenolide was effective against 39% of amastigotes, at the maximum concentration tested, 20 µg/ml (Figure 1B).

Interaction with host cells. The effect of the drug over the intracellular amastigotes was observed during 96 h of incubation. At the first time analyzed, 48 h, the internalization index was calculated in 394 for 2 µg/ml and 40 for 4 µg/ml of parthenolide, which represents a decrease of 36% and 93%, compared to the control (621). At 72 h, the index was 465 and 47, for treated with 2 and 4 µg/ml, respectively, while the control was determined in 1164. For the maximum time studied, 96 h, the internalization index was 1081 for the control, 528.5, and 36.5 for the treated with 2 and 4 µg/ml, corresponding to 51% and 96.6% of decrease, respectively (Figure 2A and 2B).

Scanning electron microscopy. Morphological alterations of epimastigote and amastigote cells treated with parthenolide were visualized by scanning electron microscopy. In epimastigotes, the IC_{50} (0.5 $\mu\text{g/ml}$) caused mainly distortion of the parasite body, swelling and flatterring (Figure 3A). Parthenolide at the concentration of 1.25 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{90}) caused decrease of the cell length and the shape of the cell body was severely. Amastigotes treated with 2.2 $\mu\text{g/ml}$ (EC_{50}) of parthenolide showed surface deformed and elongated structures at the posterior part of the cell. It was not detected in many cells treated the presence of the flagella tip, which usually appears on the controls at the entrance of the flagellar pocket (Figure 3B).

Transmission electron microscopy. In epimastigote forms, parthenolide $IC_{50/96h}$ and $IC_{90/96h}$ caused alterations in organelles like nucleus, reservosomes, mitochondrion, vacuoles and disposition of internal membranes (Figure 4). Several cells treated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ presented two and three nucleus, also an increase of numbers of reservosomes and formation of membranes around them. At 1.25 $\mu\text{g/ml}$, no normal cell was observed, and it was detected an effect of swelling in mitochondrion, specially visualized in the kinetoplast, and distortion of internal membranes, together with an excess of vacuoles. Some concentric structures appeared at the anterior part of the cell in both treatments.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Plants have always been used by mankind since ancient times for many purposes. The popular medicine derived from plants still represents the main medical support found in populations in many countries in developments. Following the medicinal properties of those plants, it's possible to investigate and find new drugs that could result in better treatment for several diseases and physiological dysfunctions. It is necessary a deep analysis of all possible effects of the new compounds extracted from natural sources, like plants, in order to reach better and longer health conditions for all.

In our study, parthenolide showed to be more effective on proliferative forms, epimastigotes and amastigotes. When tested against *Leishmania*, this sesquiterpene lactone had a very strong activity over the infective form promastigote, which the IC₅₀ was close to the found value for epimastigote forms of *T. cruzi* (Tiuman *et al.* 2005). The results obtained from amastigote tests indicate the dependence of the drug action on the temperature of incubation, since the activity at 4 °C was not as good when at 37 °C. The dependence of parthenolide on the temperature could infer its activity over enzymes, possibly active in proliferative forms, which are optimally functional at 37 °C.

The ultrastructure analyses by transmission electron microscopy showed multinuclear cells, an increase of reservosomes, the swelling of mitochondrion, which could be seen better in kinetoplast membrane, and internal membranes organization, with the formation of concentric structures, myelin-like figures. About the number of reservosomes, it could indicate the activity of parthenolide on cysteine proteinase, as it has been reported previously for *Leishmania* (Tiuman *et al.* 2005). The effect of parthenolide on mitochondrion could suggest its effectiveness over any structural component found in this organelle, possibly proteins found in the membranes or enzymes. Glutathione (GSH) is present in cells to avoid

oxidation of the molecules, especially in mitochondrion and nucleus. Studies with mammalian cells determinate that the redox state is involved in cell cycle regulation and cell death. GSH, the main intracellular antioxidant, is important in these processes, its depletion leads to cell death, and increase inhibits cell proliferation. Parthenolide was reported to have strong antioxidant activity, increasing the levels of glutathione in mammal cells (Herrera *et al.* 2005). Internal membranes were detected disrupted, mainly close to the region where is typically found the Golgi apparatus. It was observed concentric structures, but it was not possible to affirm that it was due to this organelle disfunction.

The scanning electron microscopy showed severe alterations on the morphology of the parasites for both replicative forms. Distortion of the cell body was observed for both. In epimastigotes, it was also visualized the decrease of the body length and flagellum. In amastigotes, it was possible to detect prolonged structures on the posterior part and the visual absence of the flagellum on the flagellar pocket. The structure and shape of the plasmatic membrane is determined by microtubules located sub-membrane. It was already verified that parthenolide exerts *in vitro* stimulatory activity on tubulin assembly, inducing the formation of well-organized microtubule polymers (Miglietta *et al.* 2004). Considering the effect of the drug on microtubule polymerization, there is a possibility that the alterations visualized by external observation of the cells can be provoked by this process.

The interaction of *T. cruzi* with host cells shows the activity of parthenolide on amastigotes inside and outside of the mammalian cells. The effect of 51% of the reduction of the internalization index was determined at 2 µg/ml after 96 h. At the concentration of 4 µg/ml, the reduction was even higher, but partial citotoxicity was observed. Parthenolide showed its effect since the beginning of the treatment keeping the internalization index constant, around 400-500 and 40 for treated with 2 and 4 µg/ml, respectively, probably affecting the internal parasite replication.

Parthenolide was early described for its ethnomedical properties in fever, migraine, general inflammations and others (Heptinstall et al. 1988). Recently, it has been published several studies of the compound on different cell types. This is the first report about its antiprotozoal activity against *T. cruzi* and the promising results leads to further investigations of the real effect of the drug on the parasite metabolic pathways.

Acknowledgements:

This study was supported through grants from DECIT/SCTIE/MS and MCT by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/Fundação Araucária), and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

REFERENCES

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.Y.; RI, M.B.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. 2006, Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*, 5, 49–58.

BRENER, Z. 1962, Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Tropical São Paulo*, 4, 386–396.

CAMARGO, E. P. 1964, Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, São Paulo, 6, 93-100.

CASTRO, J.A.; MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. 2006, Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.

COWAN, M. M. 1999, Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.

FRANCESCATO, H.D.C.; COSTA, R.S.; SCAVONE, C.; COIMBRA, T.M. 2007, Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology*, 230, 64-75.

HEPTINSTALL, S. 1988, Feverfew - an ancient remedy for modern times? *J Royal Society of Medicine*, 81, 373-374.

HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ-BLANCO, J.; GARCIA-SANTOS, G.; ANTOLIN, I.; RODRIGUEZ, C. 2005, Intracellular redox state regulation by parthenolide. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, 332, 321–325.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. 2003, Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.*, 90, 55-62.

MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. 2006, Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 601-620.

MIGLIETTA, A.; BOZZO, F.; GABRIEL, L.; BOCCA, C. 2004, Microtubule-interfering activity of parthenolide. *Chemico-Biological Interactions*, 149, 165–173.

RIGGINS, R.B.; ZWART, A.; NEHRA, R.; CLARKE, R. 2005, The nuclear factor κ B inhibitor parthenolide restores ICI 182,780 (Faslodex; fulvestrant)-induced apoptosis in antiestrogen-resistant breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 4, 33-41.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA, W.; VATARU-NAKAMURA, C. 2005, Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 176–182.

WHO – World Health Organization. 2002, Expert Committee on the Control of Chagas Disease. *Control of Chagas Disease*, 1-95.

WON, Y.K.; ONG, C.N.; SHI, X.; SHEN, H.M. 2004, Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*, 25, 1449-1458.

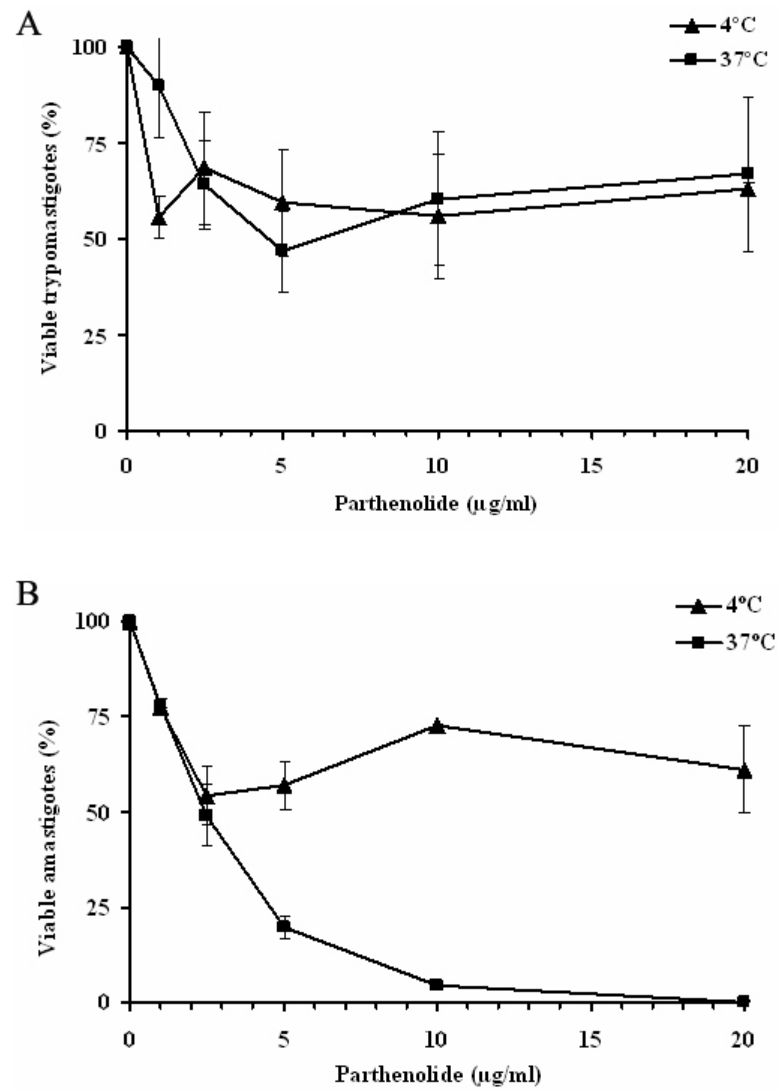
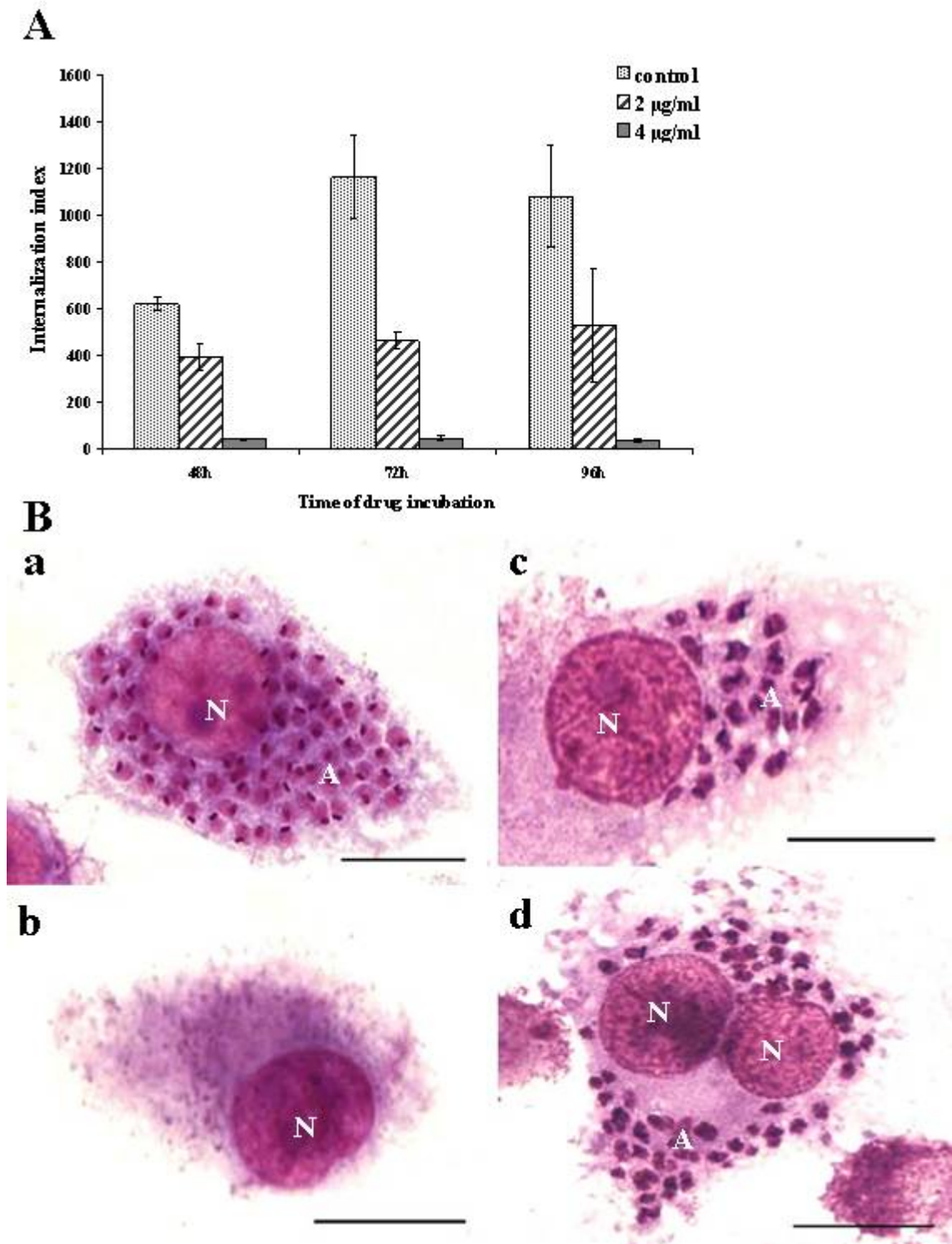


Figure 1. Viability of trypomastigote (A) and amastigote (B) forms treated with parthenolide after 24 h at different temperature.



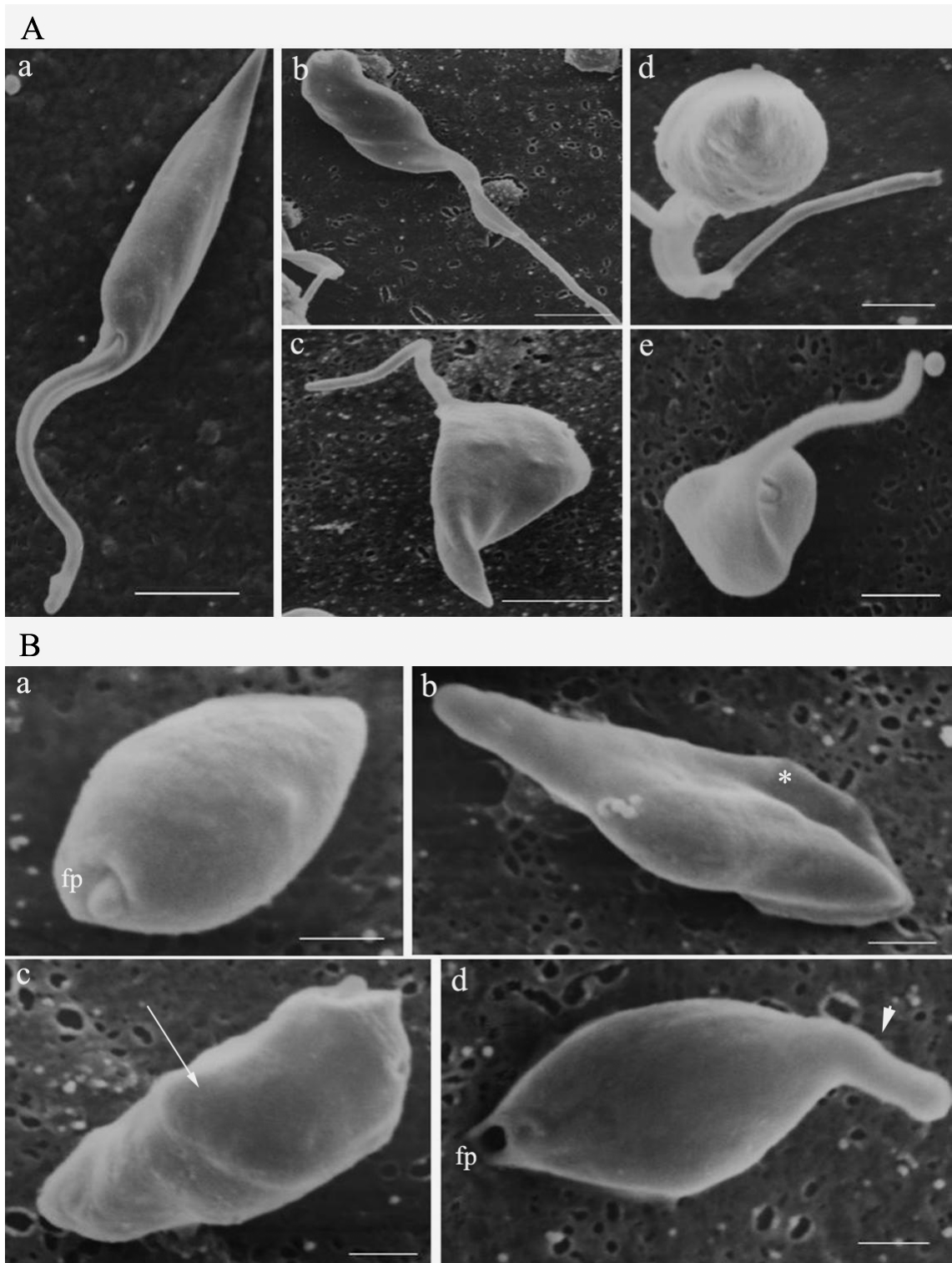


Figure 3. Scanning electron microscopy of epimastigotes (A) and amastigotes (B). In A, Control, a; IC₅₀ treated, b and c. IC₉₀ treated, d and e. Bars = 2 μm in a, b, c; Bars = 1 μm in d and e. In B, Control, a; IC₅₀ treated, b, c and d. Bars = 500 nm. Flagellar pocket, fp; Flattered borders, asterisk; Protuberance, arrow; Elongated structure, arrowhead.

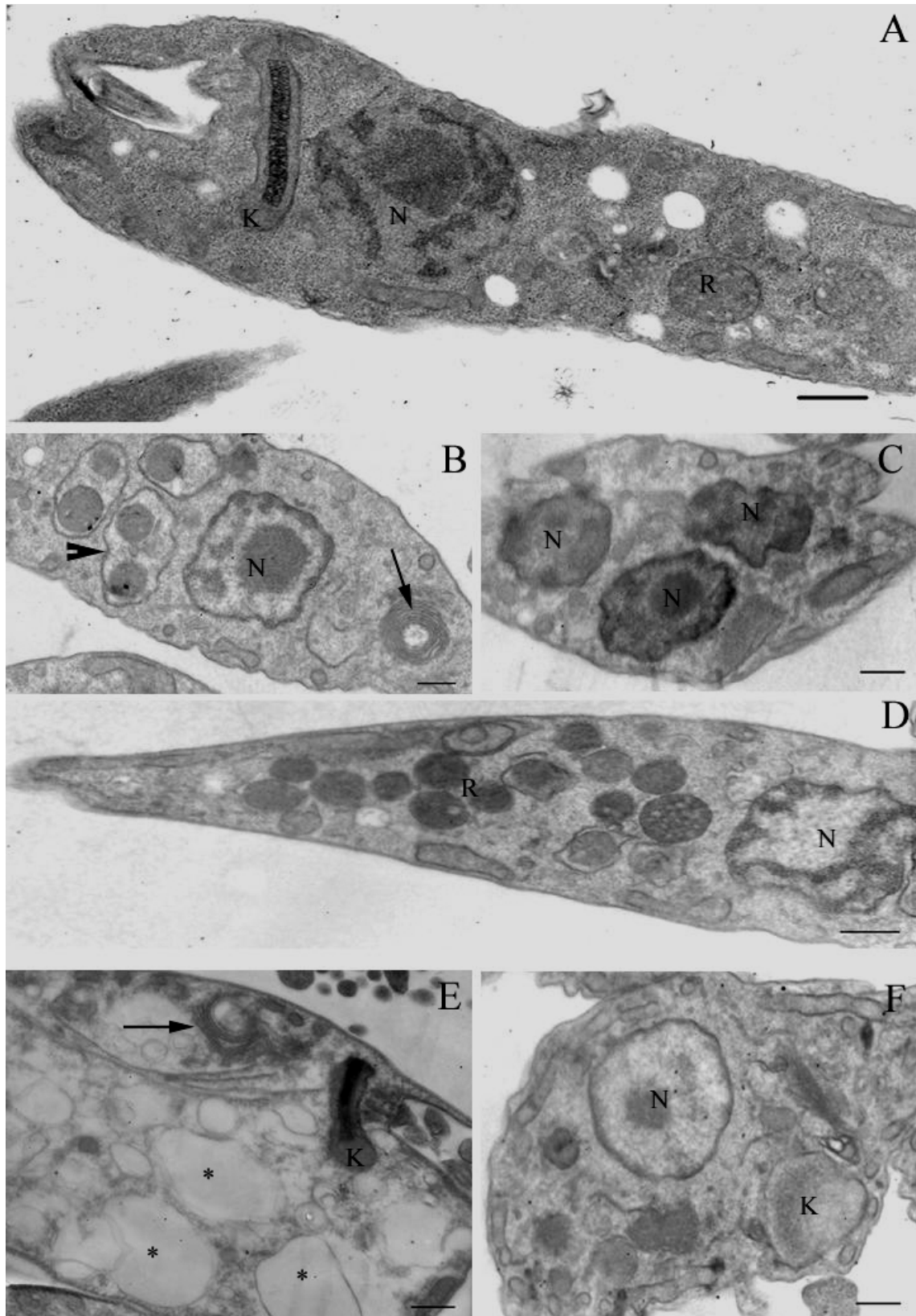


Figure 4. Transmission electron microscopy of epimastigotes. Control, **A**. Treated IC₅₀, **B**, **C** and **D**. IC₉₀, **E** and **F**. Nucleus, N; Kinetoplast, K; Reservosomes, R; Membranes evolving reservosomes, arrow head; Concentric membranes, arrow; vacuoles, asterisks. Bar = 1 μm.