



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO ROBERTO CERIDÓRIO CORRÊA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*.**

Londrina
2007

PAULO ROBERTO CERIDÓRIO CORRÊA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Londrina
2007

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C824a Corrêa, Paulo Roberto Ceridório.

Atividade biológica de substâncias químicas sobre a proliferação de
Trypanosoma cruzi / Paulo Roberto Ceridório Corrêa. – Londrina, 2007.
71 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Co-orientador: Celso Vataru Nakamura.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia médica – Teses. 2. Chagas, Doença de. – Teses.
3. *Trypanosoma cruzi* – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Nakamura,
Celso Vataru. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.61

PAULO ROBERTO CERIDÓRIO CORRÊA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SOBRE A
PROLIFERAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Ivete Costa Conchon
UEL – Londrina - PR

Londrina, 22 de outubro, de 2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina sob orientação da Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, co-orientação do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e contou com o apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, CNPq e PROPPG/UEL.

DEDICATÓRIA

Aos Meus Pais, José Carlos Moreira Corrêa e Rute
Aparecida Ceridório Corrêa, e ao Meu Irmão
Ricardo César Ceridório Corrêa

AGRADECIMENTOS

À Professora Sueli Fumie Yamada-Ogatta, primeiramente pela oportunidade e confiança, e por tudo que me ensinou como pesquisador e ser humano. Seu exemplo de profissionalismo, dedicação ficarão para sempre marcados em minha vida.

Ao Professor Celso Vataru Nakamura por sua orientação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Phileno Pinge-Filho, Viviane Krominski Graça-de Souza, Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por toda a ajuda e orientação na realização deste trabalho.

À coordenadora do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Jacinta Sanchez Pelayo.

A todos os professores e alunos do mestrado, pela realização de um trabalho muito especial.

Aos meus Grandes Amigos de Mestrado e vida, Alexandre Augusto Sasaki, Alexandre Yukio Saito e Bruno Blotta Baptista, por sua amizade e apoio.

A amiga Kathelin Lascowisk, e sua família: Erine, Eliana, Karin e César por todo apoio, amizade e carinho.

A todos meus amigos e companheiros de laboratório: Natália de Souza Botelho, Mariana Caldas Minari, Érika Izumi, Angélica Martins Batista, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, Angélica Tiemi Ishikawa, Fernando César Bizerra, Mariana Serpeloni, Vanessa Di Raimo, Renata Lumi Kanoshiki, Mateus Lucas Falco, Gustavo Henrique Grandis, Octavio André de Andrade Neto, Alexandre Haruo Inoue, Ana Carolina Andrade Vítor, Priscila Vhnieska, Suelen Balero de Paula.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina: Ediel Clementino da Costa, Marinalva Moreira dos Santos (Nalva), João Alexandre Lopes (Alex), Jesus Antônio Vargas (Zui) e Pedro Sebastião R Dionízio Filho (Pedrinho).

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!

CORRÊA, Paulo Roberto Ceridório. **Atividade biológica de substâncias químicas sobre a proliferação de *trypanosoma cruzi***. 2007. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

A doença de Chagas é endêmica em diversas regiões da América Latina, com um número estimado em 18 milhões de pessoas infectadas e mais de 21 mil mortes por ano. Não há vacina contra a infecção por *T. cruzi*, assim a quimioterapia permanece o único meio para tratamento da doença de Chagas. Entretanto os fármacos disponíveis são poucos e a eficácia é limitada principalmente pelo desenvolvimento de resistência ou ausência de especificidade. Uma das alternativas na busca por fármacos eficazes e menos tóxicos para o tratamento da doença de Chagas é a seleção de substâncias com atividade anti- *T. cruzi* obtidas de produtos naturais ou de síntese química. Neste trabalho foi avaliada a atividade biológica de três substâncias sintéticas sobre o crescimento de *T. cruzi*. O ácido 2-piridino carboxílico (ácido picolínico), um produto final do metabolismo de L-triptofano, inibiu a multiplicação de formas epimastigotas e amastigotas intracelulares. Aproximadamente 0,73 mM de ácido picolínico foi capaz de inibir 50% do crescimento de epimastigotas (IC₅₀) após 96 h, enquanto 4 mM da substância foi capaz de diminuir o número de amastigotas no interior de macrófagos peritoneais. A concentração citotóxica (CC₅₀) para células HEp-2 foi de 4,87 mM, e dessa forma o índice de seletividade (SI) foi 6,67. Epimastigotas tratados com ácido picolínico mostraram alteração de forma e presença de mais de um flagelo quando analisados por microscopia eletrônica de transmissão. As alterações ultraestruturais caracterizaram-se por intensa vacuolização intracitoplasmática, alterações no complexo de Golgi e inchaço da membrana mitocondrial. Dois derivados monoterpênicos sintéticos do borneol mostraram atividade inibitória sobre o crescimento de formas epimastigotas do parasita. O R7 e R8 apresentaram IC₅₀ de 10,1 µg/ml e 12,8 µg/ml, respectivamente, após 72 h. Os índices de seletividade para R7 e R8 foram 68,3 e 50,3. Esses valores mostram que as substâncias são mais seletivas para o parasita. As alterações ultraestruturais de epimastigotas após tratamento com os derivados sintéticos caracterizaram-se pela presença de intensa vacuolização citoplasmática, figuras do tipo mielina e de vacúolos contendo material citoplasmático. Os resultados mostram que essas substâncias podem ser estudadas quanto ao seu potencial para o tratamento da infecção por *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Atividade antimicrobiana. Ácido picolínico. Borneol.

CORRÊA, Paulo Roberto Ceridório. **Biological activity of chemicals substances on the proliferation of *Trypanosoma cruzi***. 2007. 71 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Chagas disease is endemic in several regions of Latin America, which affects approximately 18 million peoples and causes more than 21 thousands of deaths annually. There is no vaccine against the infection by *T. cruzi*, and the chemotherapy remains the only means for the treatment of Chagas disease. However the available drugs are few and the effectiveness is limited mainly by the development of resistance or lack of specificity. One approach for the search of effective and less toxic drugs for the treatment of Chagas disease is the selection of compounds with anti-*T.cruzi* activity obtained from natural products or chemical synthesis. In this study we evaluated the biological activity of three synthetic compounds on the growth of *T. cruzi*. The 2-pyridine carboxylic acid (picolinic acid), an end product of metabolism of L-tryptophan inhibited the proliferation of epimastigotes and intracellular amastigotes. Approximately 0.73 mM of picolinic acid was able to inhibit 50% of epimastigotes' growth (IC₅₀) after 96 h, and 4 mM of this compound was capable of reducing the number of amastigotes inside of the peritoneal macrophages. The cytotoxic concentration (CC₅₀) to HEp-2 cells was 4.87 mM, and thus the selectivity index (SI) was 6.67. Epimastigotes treated with picolinic acid showed morphological alterations and presence of more than one flagellum when analyzed by transmission electron microscopy. The ultrastructural changes were characterized by intense intracytoplasmatic vacuolation, changes in the Golgi' complex and swelling of mitochondrial membrane. Two synthetic monoterpenes derivatives of borneol showed inhibitory activity against epimastigote forms of the parasite. The R7 and R8 showed IC₅₀ of 10.1 µg/ml and 12.8 µg/ml, respectively, after 72 h. The selectivity index for R7 and R8 were 68.3 and 50.3. These results showed that these substances are more selective for the parasite. The ultrastructural changes of epimastigotes after treatment with the synthetic derivatives were characterized by the presence of intense cytoplasmatic vacuolation, myelin figures and vacuoles containing cytoplasmatic material. The results showed that these substances can be studied regarding their potential for the treatment of infection by *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial activity. Picolinic acid. Borneol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 3 – Esquema simplificado do metabolismo de L-triptofano pela via da quinurenina.....	21
Figura 4 – Estrutura química do nifurtimox (a) e do benzonidazol (b)	24
Figura 5 – Papel da glutatona e tripanotona no mecanismo de ação e metabolismo dos fármacos nifurtimox e benzonidazol	25

ARTIGO A

Figure 1 – Effects of AP on replication of epimastigotes forms of <i>T. cruzi</i> and AP cytotoxicity assay	47
Figure 2 – Scanning electron microscopy photomicrographs of epimastigote forms of <i>T. cruzi</i>	49
Figure 3 – Electron micrographs showing morphological features after AP treatment	50
Figure 4 – Effect of AP on <i>T. cruzi</i> interaction with murine macrophages.....	51

ARTIGO B

Figure 1 – Percentage of growth inhibition provoked by R7 and R8 on epimastigote forms of <i>T. cruzi</i>	64
Figure 2 – Effect of R7 and R8 on HEp-2 cell line	65
Figure 3 – Electron micrographs showing morphological features after R7 treatment	66
Figure 4 – Electron micrographs showing morphological features after R8 treatment	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O PROTOZOÁRIO E A DOENÇA DE CHAGAS	11
1.1.1 <i>Trypanosoma Cruzi</i>	11
1.1.2 A Doença de Chagas.....	15
1.2 ÁCIDO PICOLÍNICO, UM PRODUTO FINAL DO CATABOLISMO DE L-TRIPTOFANO	19
1.3 COMBATE DA DOENÇA DE CHAGAS	22
1.3.1 Combate da Transmissão da Doença	22
1.3.2 Combate do Parasito <i>T. cruzi</i>	23
1.3.2.1 Nifurtimox e Benzonidazol	24
1.3.2.2 Perspectiva de novos fármacos contra <i>T. cruzi</i>	26
1.3.2.3 Exemplos de produtos medicinais com atividade sobre <i>T. cruzi</i>	27
REFERÊNCIAS	30
ARTIGO A – BIOLOGICAL ACTIVITY OF PICOLINIC ACID AGAINST THE PROTOZOON <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	40
Abstract	41
Introduction	41
Material and methods	43
Preparation of solutions	43
Microorganism	44
Cell culture	44
Preparation of the macrophages	44
Antitrypanosomal activity	45
Citotoxicity assay	45
Effect on activation of macrophage cells	45
Electron microscopy	46
Statistical analysis	46
Results	47
Antitrypanosomal activity and citotoxicity for mammalian cells	47

Morphological and ultrastructural changes	48
Macrophage cells activation	50
Discussion	52

REFERENCES	55
-------------------------	----

**ARTIGO B – ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BORNYL BENZOATES
AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI* EPIMASTIGOTES.....** 58

Abstract	59
Introduction	59
Material and methods	61
Preparation of solutions	61
Microorganism	61
Antitrypanosomal activity	61
Citotoxicity assay	62
Transmission electron microscopy	62
Statistical analysis	63
Results and discussion	63
Acknowledgements	68

REFERENCES	69
-------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PROTOZOÁRIO E A DOENÇA DE CHAGAS

Doenças parasitárias consistem em um problema de saúde mundial, afetando milhões de pessoas no mundo inteiro, resultando em alta mortalidade e devastamento sócio-econômico (Renslo; Mckerrow, 2006).

Descoberta por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909) a doença de Chagas se disseminou por muitas regiões. Foi por muito tempo considerada como a mais séria doença parasitária da América Latina, com imenso impacto socioeconômico se comparado aos efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias (World Bank, 1993).

Essa doença continua endêmica em determinadas regiões, principalmente na América Latina com um número estimado de pessoas infectadas de 16 a 18 milhões, com 21 mil mortes por ano e cerca de 120 milhões com o risco de contrair a doença (WHO, 2002; Urbina ; Docampo, 2003).

Embora a doença no homem tenha sido descoberta há quase 100 anos, já foram encontradas múmias no Chile com mais de 4 mil anos infectadas com *T. cruzi*. Aparentemente infecções acidentais devem ter ocorrido quando o homem que habitava cavernas entrou no nicho do protozoário (Ferreira *et al.*, 2000).

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da Doença de Chagas, *T. cruzi*, é um protozoário eucarionte, uniflagelado, heteroxênico, pertencente à ordem Kinetoplastidae e a família Trypanosomatidae. Os membros dessa ordem têm como característica a presença do cinetoplasto, uma estrutura composta por DNA (kDNA) presente na mitocôndria única (Maslov; Simpson, 1994).

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta basicamente três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota (figura 1). Elas são caracterizadas quanto à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, flagelo e

morfologia. Nos tripomastigotas, com 25 µm de comprimento, o cinetoplasto está localizado posteriormente ao núcleo. Os amastigotas, com 4 µm de diâmetro são caracterizados pelo formato ovóide ou arredondado, com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Os epimastigotas apresentam cinetoplasto, em forma de fuso, anterior ao núcleo e em geral com 20 a 40 µm de comprimento. Possuem membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido.

Duas formas do parasito são replicativas, os amastigotas, que se replicam no interior das células infectadas do hospedeiro mamífero e os epimastigotas, que se replicam no interior do trato digestório dos insetos vetores. Estas formas replicativas se transformam em formas tripomastigotas infectivas, não-replicativas, que são encontradas no sangue dos mamíferos infectados (tripomastigotas sangüíneos) ou na porção posterior do trato digestivo dos insetos vetores [tripomastigotas metacíclicos (De Souza, 1984; Rey, 2002)].

Como mencionado o ciclo biológico de *T. cruzi*, é do tipo heteroxênico, passando o parasito obrigatoriamente por dois hospedeiros – vertebrado e invertebrado. Dessa forma, esse protozoário tem como hospedeiro invertebrado e também transmissor um inseto hematófago (triatomíneo) da ordem Hemiptera, família Reduviidae. Entre as mais de 100 espécies de triatomíneos conhecidas como vetores de transmissão da doença de Chagas no ciclo silvestre, somente espécies adaptadas à colonização de casas, podem transmitir o parasito para o homem e animais domésticos (ciclo domiciliar ou peridomiciliar). Entre elas, aquelas pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* são as mais importantes (Carcavella *et al.*, 1998). Uma variedade de animais, incluindo o homem, pode ser hospedeiro vertebrado do parasito (Brenner, 1973).

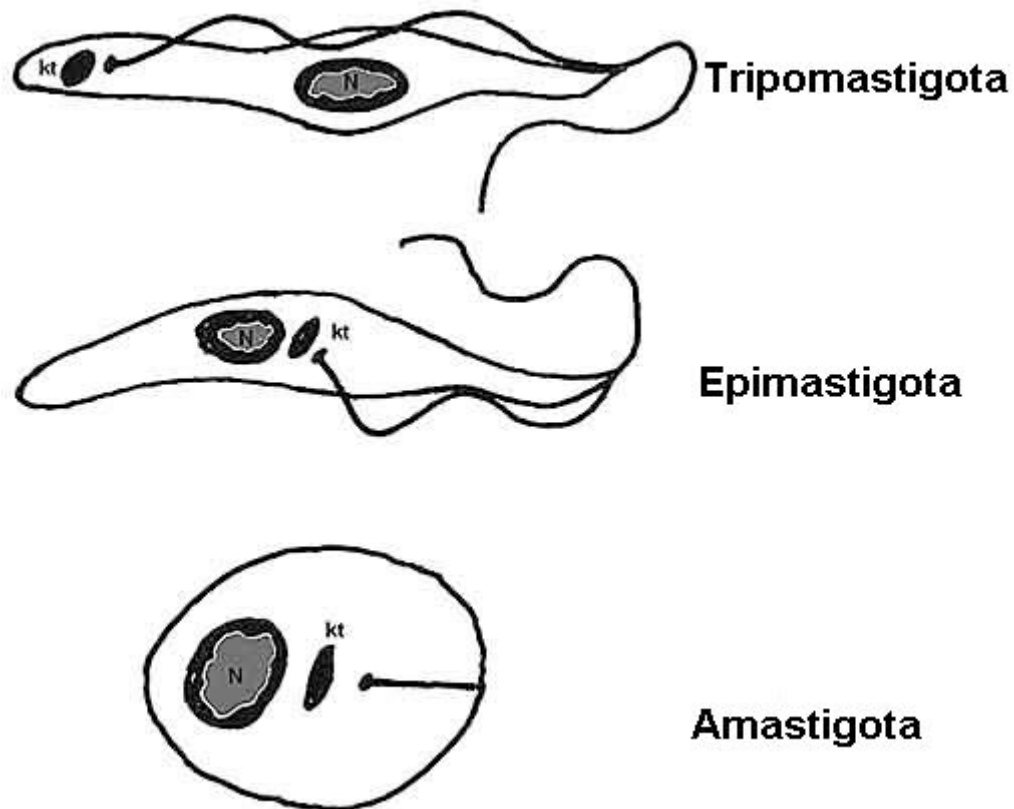


Figura 1 – Estágios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. As letras correspondem a núcleo (N) e cinetoplasto (kt).

Fonte: <<http://www.bioscience.org/2003/v8/e/948/figures.htm>>

O ciclo de transmissão natural inicia-se quando o inseto vetor ingere tripomastigotas sangüíneos do hospedeiro vertebrado infectado, durante o seu repasto alimentar. No trato digestório do vetor, essas formas se diferenciam em epimastigotas. Estas se multiplicam por fissão binária, aderem-se a mucosa epitelial da porção final do trato digestório, diferenciam-se e são liberados como tripomastigotas metacíclicos (Zeledon *et al.*, 1984). Durante um novo repasto alimentar do inseto, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados juntamente com as fezes ou a urina. Estas formas infectivas podem entrar em contato com soluções de continuidade da pele ou mucosas do hospedeiro vertebrado e invadem células adjacentes. Subseqüentemente após a invasão os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que sofrem sucessivo ciclo de divisões binárias, antes de se diferenciar de novo em tripomastigotas. As células hospedeiras rompem-se, liberando os parasitos na corrente sangüínea (tripomastigotas sangüíneos) (Dvorak; Hyde, 1973). Estes podem infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto

durante sua atividade de hematofagia, e o ciclo se completa (Brener, 1973; De Souza, 1984, Tyler; Engman, 2001). A figura 2 resume o ciclo de vida de *T. cruzi*.

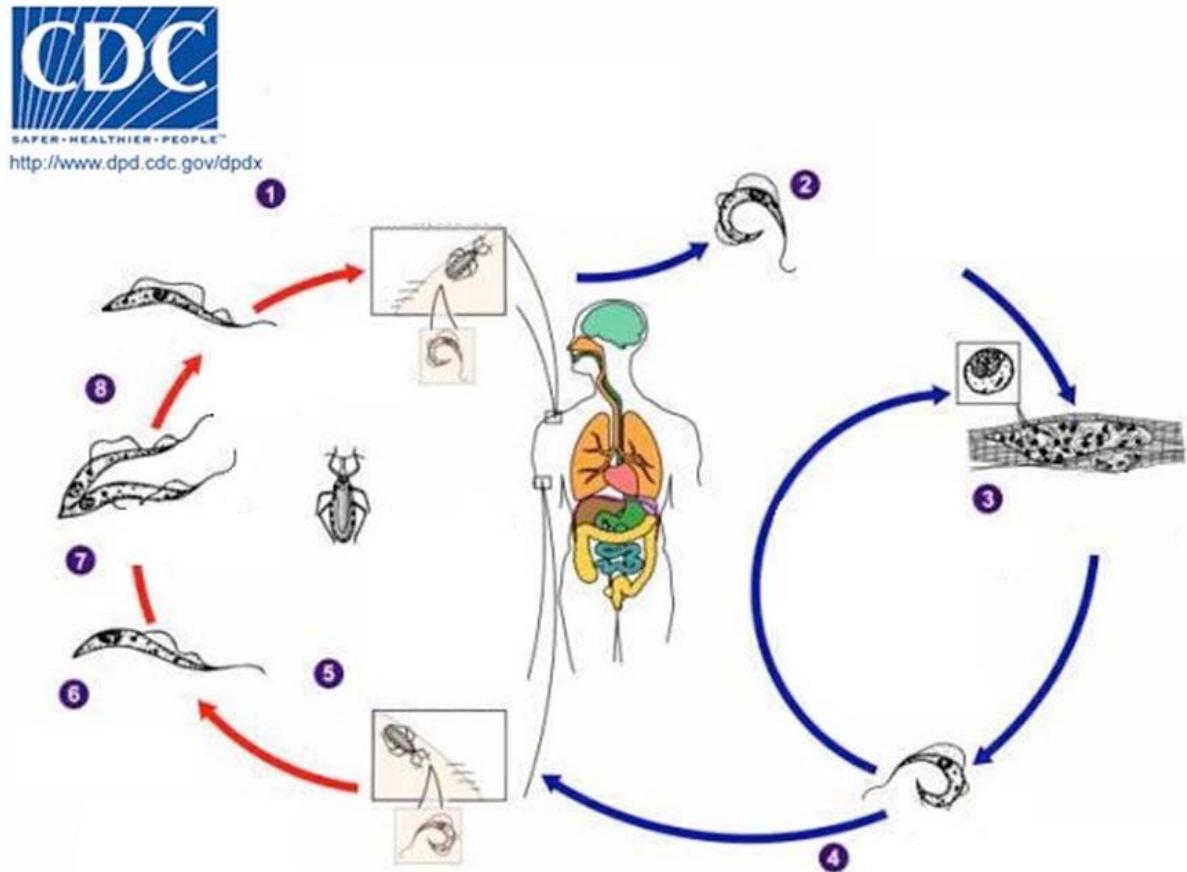


Figura 2 – Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 1. O triatomíneo se alimenta do sangue humano, e deposita excretas contaminadas com o parasita na pele lesada ou diretamente na mucosa do hospedeiro; 2. Formas tripomastigotas metacíclicas penetram nas células adjacentes e se diferenciam em amastigotas; 3. Após multiplicação intracelular, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas; 4. Tripomastigotas podem infectar novas células ou cair na corrente sanguínea, disseminando-se para outros tecidos e órgãos; 5. Os triatomíneos podem ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto alimentar; 6. As formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas; 7. As formas epimastigotas multiplicam-se no intestino médio, migram para o intestino posterior; 8. Nesse local, os epimastigotas aderem-se ao epitélio e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos.

Fonte: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>> com modificações>.

É importante salientar que, para a infecção ocorrer de forma natural existe outros determinantes no processo infeccioso, como aqueles dependentes do vetor. O tempo de picada e a defecção são processos importantes, pois em alguns casos, insetos como *Triatoma vitticeps* que defecam minutos após o repasto,

quando já estão fora do hospedeiro, tem pouca ou nenhuma importância na transmissão. O número de parasitos eliminados com as fezes ou urina relaciona-se com o percentual de formas infectantes e sua capacidade de penetração. Além disso, a intensidade de prurido causado pela picada levará a pessoa a coçar-se e conseqüentemente se contaminar (Coura; Castro, 2002).

1.1.2 A Doença de Chagas

A infecção pode resultar em uma fase aguda, com lesões localizadas, e outra crônica que pode produzir quadros clínicos variados e incuráveis. A fase aguda da doença é caracterizada por um conjunto de manifestações de intensidade variada, após um período de no mínimo quatro dias, ou podendo se prolongar por cerca de 30 a 90 dias. Em geral, é caracterizada por um grande número de tripanossomas presentes na circulação (parasitemia patente), devido ao processo de sucessivos ciclos de invasão celular, multiplicação e liberação de parasitos para a corrente sanguínea.

Um dos primeiros sinais clínicos é decorrente do processo inflamatório inespecífico no local do sítio de entrada do parasito, que pode ser olho (sinal de Romana) ou pele (chagoma). Outros sintomas da fase aguda são febre, mal estar, astenia, cefaléia e hipóxia. O comprometimento cardíaco nessa fase é frequente, podendo ocorrer miocardite, pericardite, endocardite aguda, assim como taquicardia. No sistema nervoso pode ser observada destruição neuronal intensa e nos órgãos do sistema digestório podem ocorrer lesões discretas (Tanowitz *et al.*, 1992; Amato Netto *et al.*, 1997, Ferreira *et al.*, 2002). Embora pacientes imunodeprimidos e crianças sejam mais susceptíveis a essas manifestações clínicas, a maioria das pessoas é assintomática nessa fase.

A fase crônica é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo elevado número de anticorpos circulantes, podendo ser subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva, mista ou neurológica (Tanowitz *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2002; Rey, 2002). A forma indeterminada é definida como um estado no qual o paciente parece ter uma cura aparente. Isto é, ocorre a regressão dos sintomas da fase aguda, podendo permanecer assintomático cerca de 10 a 20 anos, com possíveis

manifestações clínicas posteriores. (Macedo, 1997; Ferreira *et al.*, 2002; Rey, 2002). Cerca de 30% dos pacientes podem desenvolver a fase crônica sintomática, que é classificada de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente chagásico. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração (megacárdio). Essas alterações podem se manifestar através de arritmias e insuficiência cardíaca congestiva. A forma cardíaca é considerada como a principal causa de morte na doença de Chagas (Rassi *et al.*, 2001). Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e cólon intestinal (megacólon), que levam a problemas como disfagia, regurgitação e incoordenação motora (Rezende, 1997). A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente. Na forma neurológica, observam-se alterações morfológicas no tecido nervoso central. Em pacientes chagásicos imunodeprimidos é comum o desenvolvimento de meningoencefalite (Rocha *et al.*, 1994).

A resposta imune específica em cada fase da infecção, celular e humoral, reduzem as cargas parasitárias, auxiliando na defesa do organismo. Contudo, na tentativa de se defender do parasito, essa resposta quando exacerbada acaba sendo responsável por muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas (Brodskyn; Barral-Netto, 2000).

A patogênese da doença de Chagas ainda não é totalmente compreendida.

As manifestações clínicas da doença estão fortemente associadas às reações inflamatórias progressivas desencadeadas pela resposta do hospedeiro contra o parasito (Tanowitz *et al.*, 1992). A correlação entre a presença de antígenos do parasito e a intensidade do infiltrado inflamatório no coração de pacientes chagásicos apresentando a forma cardíaca da doença foi mostrada por Higuchi e colaboradores (2003).

Dois mecanismos são propostos para explicar as lesões da fase crônica da doença de Chagas. A teoria da autoimunidade poderia explicar a relação entre a severidade das lesões observadas na fase crônica e a carga parasitária extremamente baixa no hospedeiro. Essa teoria é reforçada por algumas evidências como, mimetismo molecular entre hospedeiro e parasito, e presença de anticorpos e células autoreativos (Kierszenbaum, 2003). A outra teoria associa as lesões presentes na doença à persistência do parasito (Tarleton, 2001). Nesse contexto,

Zhang e Tarleton (1999) detectaram a presença do parasito em lesões do tecido muscular, em infecção experimental, e a eliminação do parasito resultou em diminuição da resposta inflamatória e resolução da doença. Além disso, o tratamento com benzonidazol reduz a progressão da doença em humanos (Viotti *et al.*, 1994; 2005).

O papel exato do sistema imune do hospedeiro na patogênese da doença ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, a sua importância na proteção à infecção por *T. cruzi* é sustentada pela evidência, ao menos em modelos experimentais, de que uma deficiência em resposta imune celular e/ou humoral a esses parasitas contribuem para o progresso da doença (Rottenberg *et al.*, 1995.; Tarleton *et al.*, 1996; Kumar; Tarleton, 1998). Nesse contexto, o controle da infecção por *T. cruzi* requer a ativação de vários efetores da resposta imune inata ou adquirida.

Os componentes do sistema imune inato apresentam atividade antimicrobiana e funções imunomodulatórias sendo importantes como primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Além disso, são importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida (Dutra *et al.*, 2005). Sobretudo, a ausência de ativação do sistema imune inato, pode fazer com que o hospedeiro seja rapidamente “dominado” pelo patógeno, resultando em doença e possivelmente em morte. Por outro lado, quando a ativação de receptores da resposta imune inata é excessiva, altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF) e reativos intermediários de nitrogênio, podem ser prejudiciais para o hospedeiro (Gazzinelli; Denkers, 2006).

Basicamente, a resposta imune inata é desencadeada a partir da interação de dois componentes gerais: os *receptores* presentes nas células de defesa que reconheçam as *moléculas*, do organismo invasor. Os receptores do tipo Toll (TLR: *Toll-like receptor*) são componentes de uma importante família de moléculas, expressas principalmente em células dendríticas (DC: *dendritic cells*) e macrófagos, que participam no reconhecimento do microrganismo invasor (Medzhitov; Janeway, 2002; Akira, 2001; Akira *et al.*, 2006). Por outro lado, o microrganismo expressa moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) que são reconhecidos pelas células do sistema de defesa inato (Janeway; Medzhitov, 2002). As PAMPs possuem três principais características: são expressas pelos

microrganismos e não pelas células do hospedeiro; possuem estruturas conservadas em certos grupos de microrganismos, tornando-as identidade molecular; e sua expressão é essencial para a sobrevivência do microrganismo (Janeway, 2001).

T. cruzi expressa diferentes moléculas que funcionam como PAMPs, entre elas encontram-se as proteínas do tipo mucinas (mucinas-like) ancoradas à superfície, de tripomastigotas sanguíneos, através de glicosilfosfatidilinositol e que ativam macrófagos através de TLR2 (Campos *et al.*, 2001). Proteínas do tipo mucinas são as principais glicoproteínas de superfície de *T. cruzi*. Em geral, elas podem ser divididas em dois tipos principais: mucinas-like com massas moleculares entre 35 – 50 kDa encontradas em formas evolutivas presentes no inseto; e aquelas que apresentam massa molecular entre 60 – 200 kDa encontradas em formas presentes em mamíferos. Embora apresentem grande heterogeneidade e complexidade entre as diferentes formas e entre diferentes isolados do parasito, a estrutura das mucinas-like é caracterizada por um domínio central contendo aminoácidos repetitivos (rico em resíduos de serina, treonina e prolina) e flanqueado por aminoácidos não repetitivos no core protéico. As cadeias de oligossacarídeos (correspondem a 60% da estrutura) estão ligadas ao grupamento hidroxila de resíduos de treoninas e/ou serinas (Buscaglia *et al.*, 2006).

As mucinas-like presentes em tripomastigotas sanguíneos participam do processo de invasão das células hospedeiras e são potentes indutoras da expressão de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em macrófagos ativado (Acosta-Serrano *et al.*, 2001).

Durante a fase aguda da doença, quando TLRs dos macrófagos são ativados, é desencadeada uma cascata de reações que conduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas citocinas estimulam células *natural killer* (NK) e linfócitos T (CD4+ e CD8+) a secretarem interferon-gama [IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 2004)], que possui um papel crucial nos mecanismos de defesa contra *T. cruzi*. Macrófagos ativados por TNF- α e IFN- γ controlam a multiplicação do parasito por mecanismos dependentes (Saeftel *et al.*, 2001) ou independentes (Cummings; Tarleton, 2004) de óxido nítrico (NO).

1.2 ÁCIDO PICOLÍNICO, UM PRODUTO FINAL DO CATABOLISMO DE LTRIPTOFANO

O triptofano é um aminoácido essencial para todas as formas de vida, sendo utilizado para síntese de proteínas e outros importantes metabólitos funcionais. Os animais adquirem triptofano a partir da alimentação, uma vez que não possuem a maquinaria enzimática para sua biossíntese. Além de proteínas, moléculas importantes como serotonina, melatonina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) são produzidas a partir do triptofano. Em recentes anos uma nova associação tem sido feita entre o catabolismo do triptofano principalmente pela via da quinureína (figura 3) e reações inflamatórias, em diversas patologias (Moffett; Namboodiri, 2003).

A via da quinureína pode ser dividida em três etapas que dará origem a três ramificações. As etapas incluem a degradação de triptofano até quinurenina, e posteriormente a quinolinato na segunda etapa. A terceira etapa caracteriza-se pela oxidação completa do triptofano. As ramificações dessa via incluem a reação de transaminação da quinurenina para síntese de ácido quinurênico, a transformação de aminomucônico semialdeído para ácido picolínico, e a via de síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) a partir de quinolinato (Nishizuka; Hayaishi, 1963). A via completa ocorre no fígado e resulta em oxidação total do triptofano, com geração de adenosina trifosfato (ATP) e CO₂. Muitas células do corpo humano apresentam algumas das enzimas da via da quinureína, entretanto somente os hepatócitos apresentam a via completa (Moffett; Namboodiri, 2003).

O catabolismo de triptofano pode ser iniciado, primariamente no fígado, pela atividade da enzima triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) que é induzida pela presença de triptofano e metabólitos esteroidais. Em células fagocíticas mononucleares, a indolamina dioxigenase pode ser ativada por IFN- γ (Carlin *et al.*, 1989). O significado biológico deste último processo não é conhecido totalmente. Tem sido proposto que o catabolismo do triptofano reduziria a sua disponibilidade para a multiplicação de parasitas intracelulares (Pfefferkorn, 1984), bem como células tumorais (Brown *et al.*, 1991).

Muitos metabólitos do triptofano estão associados a propriedades imunomodulatórias, tais como supressão da proliferação de células T ativadas

(Frumento *et al.*, 2002). O ácido picolínico é um dos produtos finais do metabolismo do triptofano e a sua formação é catalisada pela enzima picolinato carboxilase (Mehler, 1955). Essa substância pode ser detectada livremente no soro e leite humano (Fortnagel; Fresse, 1968).

Várias atividades biológicas têm sido atribuídas ao ácido picolínico, tais como controle do ciclo celular (Fernandez-Pol *et al.*, 1977), quelante de íons (Evans; Johnson, 1980), atividade antitumoral em camundongos (Leuthauser *et al.*, 1982) e modulação da atividade de macrófagos (Rebello *et al.*, 1982; Ruffmann *et al.*, 1984; Sharon *et al.*, 1990; Varesio *et al.*, 1990; 1992; Melillo *et al.*, 1993; 1994; Bosco *et al.*, 2000) e neutrófilos (Abe *et al.*, 2004).

Elevada atividade antitumoral após ativação de macrófagos pelo ácido picolínico foi mostrada tanto em condições *in vivo* em camundongos (Leuthauser *et al.*, 1982; Ruffmann *et al.*, 1984) quanto *in vitro* (Varesio *et al.*, 1990). Um aumento na formação de espécies reativas de nitrogênio dependente do metabolismo da L-arginina também foi observado após a ativação de macrófagos murinos por essa substância (Melillo *et al.*, 1993). Este aumento está associado à atividade sinérgica entre ácido picolínico e IFN- γ que induzem a expressão da enzima óxido nítrico sintase (Melillo *et al.*, 1994). Além disso, o ácido picolínico pode modular a expressão de quimiocinas em macrófagos. Nesse sentido, Bosco e colaboradores (2000) mostraram que essa substância é um potente ativador da expressão de quimiocina inflamatória MIP (*macrophage inflammatory protein*) -1 α e -1 β .

Em relação aos protozoários, o crescimento de formas epimastigotas de tripanossomas do subgênero *Schyzotrypanum* isolados do morcego *Phyllostomus hastatus*, bem como a motilidade de formas tripomastigotas são inibidos pelo ácido picolínico. Esse efeito pode ser parcialmente revertido por triptofano e ácido nicotínico (Corrêa *et al.*, submetido). A inibição do crescimento pelo ácido picolínico também foi observado em *Tetrahymena pyriformis*. Esse efeito parece estar associado ao defeito provocado pelo ácido picolínico, no sistema de proteção contra estresse oxidativo mediado pela glutatona (Shemarova *et al.*, 2003). Em *T. cruzi*, o ácido 3-mercaptopicolínico, um análogo estrutural dessa substância, inibe a atividade de fosfoenolpiruvato quinase (Urbina *et al.*, 1990), uma enzima responsável pela degradação incompleta de carboidratos e pelo catabolismo de aminoácidos nesse parasito (Urbina, 1994).

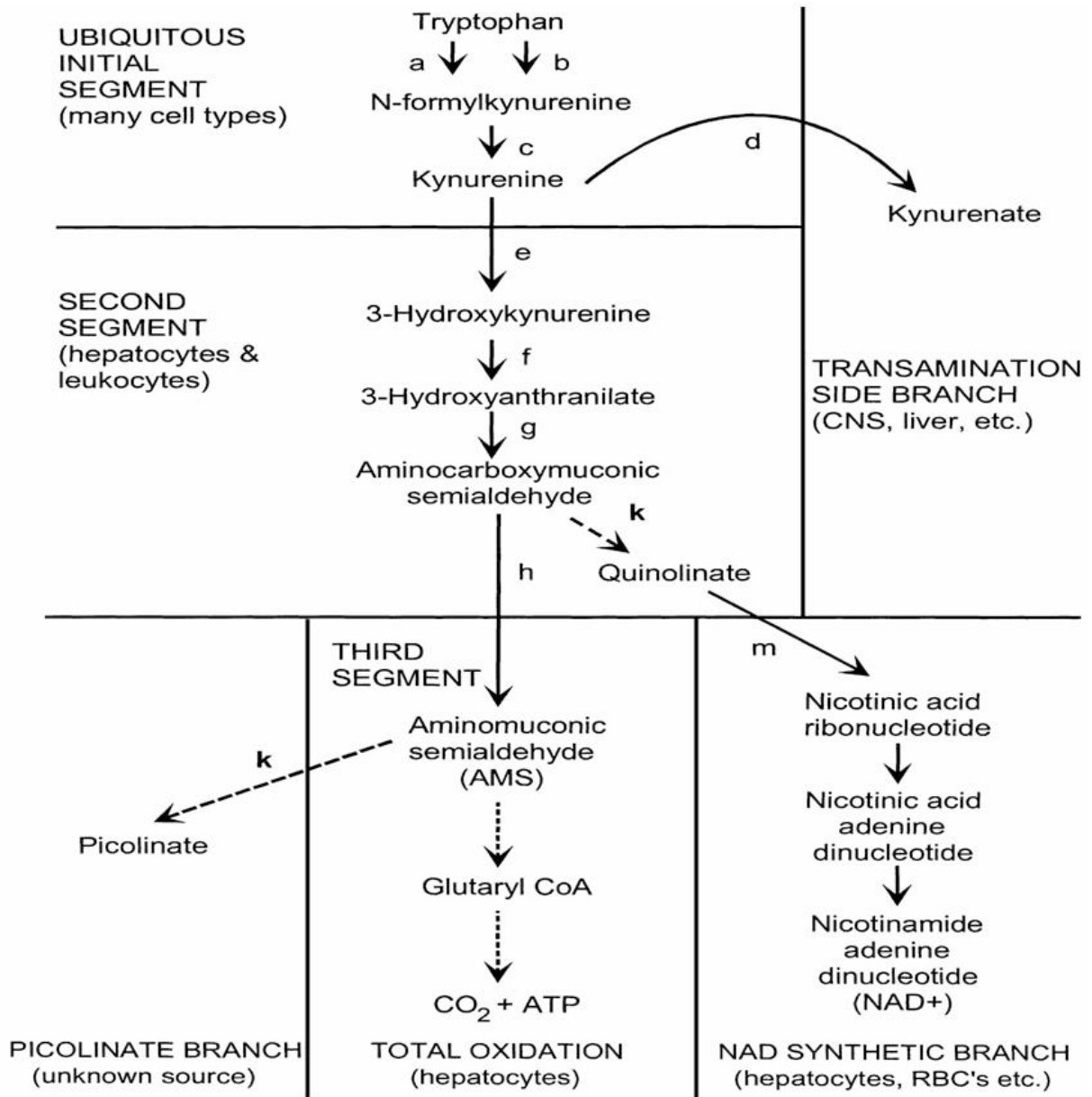


Figura 3 – Esquema simplificado do metabolismo de L-triptofano pela via da quinurenina. As enzimas que participam da via são designadas por letras: (a) triptofano dioxigenase (TDO); (b) indolamina dioxigenase (IDO); (c) quinurenina formamidase; (d) quinurenina aminotransferase (KAT); (e) quinurenina 3-monoxigenase; (f) quinureninase; (g) 3-hidroxi-antranilato dioxigenase (HADO); (h) α -amino- α -carboximuconato- ϵ -semialdeido decarboxilase (ACMSD); (m) quinolato fosforibosiltransferase (QPRT); (k) reação espontânea não enzimática.

Fonte: Moffett e Namboodiri (2003)

1.3 COMBATE DA DOENÇA DE CHAGAS

1.3.1 Combate da Transmissão da Doença.

No passado a grande disseminação da doença esteve altamente relacionada com condições precárias de moradias, principalmente as da zona rural, que culminavam em um ambiente propício para a propagação do inseto vetor. A implantação de campanhas de combate direto ao vetor, como a utilização de inseticidas, educação sanitária e a rápida urbanização, possibilitou uma melhora no controle da infecção (Dias *et al.*, 2002). Em 1983 foi lançada no Brasil a primeira campanha nacional de combate à doença de Chagas (Dias, 1987). O objetivo era a completa erradicação do principal vetor, *T. infestans*, de todo território nacional. Em 1986 aproximadamente 75% do objetivo tinha sido atingido, e as localidades de infestação já estavam mapeadas. Contudo, com a reemergência da febre amarela e da dengue, esse programa foi colocado em segundo plano pelo governo brasileiro.

Em 1991 foi implantado um novo programa de combate à doença de Chagas, mantendo o mesmo objetivo anterior e acrescentando o controle em bancos de sangue. Esse programa, denominado Iniciativa Cone Sul (*Southern Cone Initiative*) envolve países da América do Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai) e graças a essa iniciativa, a transmissão da doença, por essas vias, foram interrompidas no Uruguai, Chile e em oito dos doze estados endêmicos do Brasil (Moncayo, 2003).

Apesar da diminuição na transmissão e de ser considerado livre de *T. infestans*, a infecção de outras espécies de tritomíneos, bem como sua progressiva domesticação, tem sido relatado em outras áreas ainda endêmicas (Coura; Castro, 2002; Garcia *et al.*, 2005). Dessa forma, não deve ser descartada a possibilidade da doença através da transmissão por insetos.

A transfusão sangüínea constitui o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas. Contudo, como mencionado anteriormente, à semelhança da transmissão via inseto-vetor, programas de vigilância em bancos de sangue têm reduzido o risco de contaminação por essa via (Moncayo, 2003). Outras formas de transmissão, menos

freqüentes, são via transplacentária, por acidentes de laboratório, via oral e por meio do coito (Dias, 2000). O transplante de órgãos é uma forma de transmissão que emerge como um problema importante, haja vista a condição de imunossupressão em que se encontra o transplantado, o que pode agravar o quadro da doença (Riarte *et al.*, 1999). Observa-se também, com o aumento do número de portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e com a utilização de medicamentos imunossupressores, a reativação de infecções crônicas em pacientes co-infectados por *T. cruzi*. Esses pacientes voltam a apresentar alta parasitemia, sinal clínico característico da fase aguda da doença (Gallhardo *et al.*, 1999; Rassi *et al.*, 1999).

No estado do Paraná, a doença de Chagas é bem conhecida desde a década de 1920, com vários casos descritos no nordeste do estado, e com a presença de reservatórios naturais, como *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*. Embora, atualmente a transmissão doméstica seja eficientemente controlada por medidas de combate ao vetor, existe a ameaça de reinfestação uma vez que o ciclo silvestre foi detectado em regiões sul e norte do estado (Soccol *et al.*, 2002).

1.3.2 Combate do Parasito *T. cruzi*

Atualmente os fármacos em uso, são os mesmos de décadas atrás e possuem uma eficácia limitada. A maioria dos pacientes chagásicos encontra-se em áreas mais pobres do mundo. Esse caráter financeiro da população atingida fez com que a indústria farmacêutica não tivesse interesse em investir em novos fármacos para o combate não só da doença de Chagas, mas em geral para todas as doenças causadas por protozoários (Renslo; Mckerrow, 2006).

Como não há vacina contra a infecção por *T. cruzi*, a quimioterapia permanece o único meio para o tratamento da doença de Chagas. Até o momento os fármacos utilizados clinicamente são o nifurtimox (NFX) e benzonidazol (BZ) mostrados na figura 4. Sendo a eficácia das mesmas dependente da sensibilidade das cepas de *T. cruzi*, estágio da doença e fisiologia do hospedeiro. Além disso, apresentam uma limitada eficácia na fase crônica da doença, e são muito pouco toleradas por seus efeitos tóxicos (Maya, 1997; Veloso, 2001).

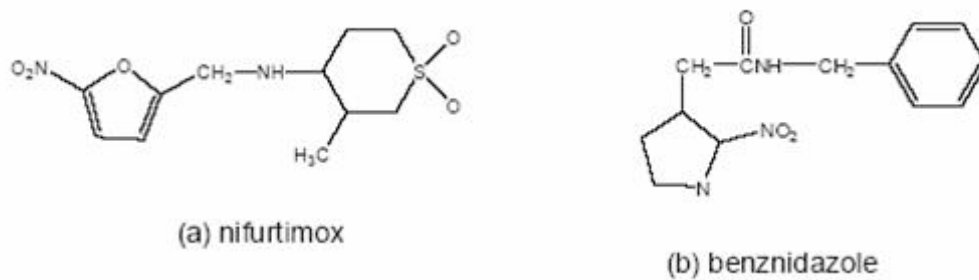


Figura 4 – Estrutura química do nifurtimox (a) e do benznidazol (b).

1.3.2.1 Nifurtimox e Benznidazol

NFX (1,1-dióxido de tetraidro-3-metil-4[(5-nitrofurilideno)amino]-2H-1,4- tiazina) é um nitrofurano lançado em 1972 com o nome comercial de Lampit®. Entretanto, considerado tóxico ao homem, teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil (Luquetti, 1997).

O BZ é um derivado nitroimidazólico (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) comercializado sob o nome Rochagan®. Atualmente é o único fármaco empregado no tratamento humano da doença de Chagas no Brasil.

Os dois fármacos induzem a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos, como mostrado na figura 5. Durante o processo, nitrorredutases agem na redução de grupos nitro dos fármacos para grupos amino, resultando na formação de diversos radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos. A reação é catalisada por NADPH-citocromo redutase P-450, que atua no grupo nitro de moléculas tipo R-NO₂, produzindo um ânion nitro [R-NO₂⁻ (Moreno *et al.*, 1982)]. No caso do NF, R-NO₂⁻ reage com o oxigênio molecular, o qual é parcialmente reduzido. Em seguida ocorre a formação de O₂ e H₂O₂ por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) sobre o ânion superóxido (O₂⁻). Este ânion e H₂O₂, na presença de Fe³⁺, formam radicais hidroxila. Estes, principalmente OH, complexam-se com macromoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA, causando danos à célula (Docampo, 1990; Maya *et al.*, 2007). Como *T. cruzi* é parcialmente deficiente em mecanismos de detoxificação de radicais livres, os danos celulares culminam com a morte dos mesmos.

O mecanismo de ação do BZ parece não depender de radicais hidroxila, entretanto outros metabólitos podem se conjugar com macromoléculas provocando o efeito tripanocida. Além disso, muitos trabalhos têm descrito que o efeito tripanocida do BZ possa ser devido à melhora no processo fagocítico, e inibição da NADH-fumarato redutase de *T. cruzi* (Turrens *et al.*, 1996; Romanha *et al.*, 2002).

A falha terapêutica dos nitroheterocíclicos (BZ e NFX), no tratamento de infecções crônicas em pacientes chagásicos, vem sendo constatada em diversos trabalhos (Urbina, 1999; Braga *et al.*, 2000; Cançado, 2002). Além disso, o tratamento é ineficaz em casos de imunossupressão medicamentosa ou ainda para portadores da SIDA. Aliado aos efeitos colaterais e a limitação do tratamento na fase crônica, um obstáculo para obtenção da cura parasitológica é a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brener; Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes aos fármacos (Filardi; Brener, 1987). Esses dados indicam a necessidade urgente de se obter novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento da doença de Chagas.

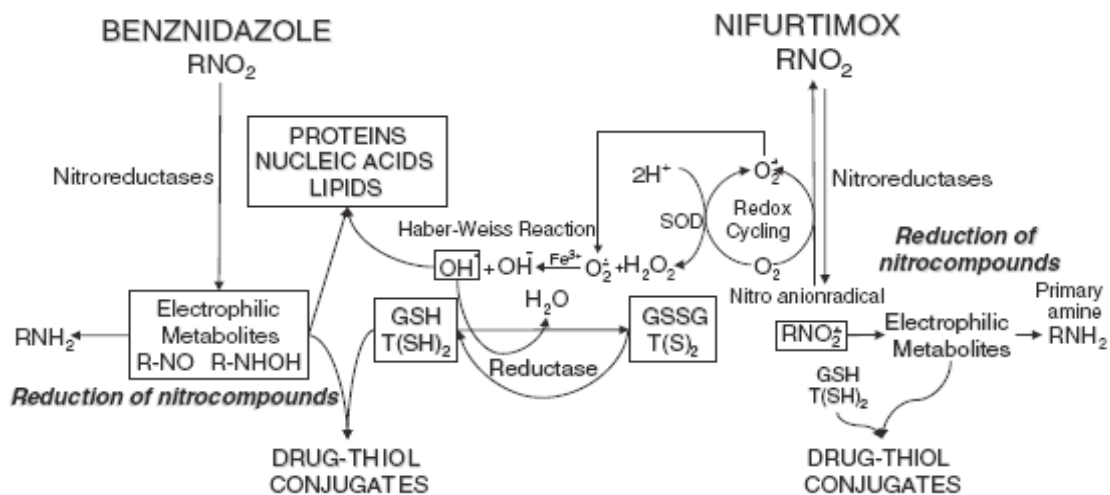


Figura 5 – Papel da glutatona e tripanotona no mecanismo de ação e metabolismo de nifurtimox e benzonidazol. O grupo nitro dos fármacos é reduzido para radicais livres ou metabólitos eletrofilos por ação de nitrorredutases. Radicais livres derivados do nifurtimox reagem com o oxigênio e produzem H_2O_2 por ação da superóxido dismutase (SOD). Assim, as espécies reativas de oxigênio produzidas ligam-se a macromoléculas intracelulares causando danos à célula. A tripanotona $[T(SH)_2]$ em tripanossomatídeos e a glutatona (GSH) em células de mamíferos neutralizam os metabólitos derivados do benzonidazol e nifurtimox formando conjugados fármaco - tiol que serão metabolizados a mercapturatos no hospedeiro mamífero.

Fonte: Maya *et al.*, 2007.

1.3.2.2 Perspectiva de novos fármacos contra *T. cruzi*.

O conhecimento crescente sobre a biologia do protozoário *T. cruzi* tem permitido selecionar alvos em potencial para o desenvolvimento de substâncias antiparasitárias. Assim, diferenças metabólicas entre os tripanossomatídeos e as células de mamíferos, bem como a presença de vias ou estruturas exclusivas do parasito têm sido investigados (Urbina; Docampo, 2003).

Um alvo em potencial é o sistema tripanotiona de tripanossomatídeos. Esse sistema é responsável pelos mecanismos de detoxificação de radicais livres. A enzima tripanotiona redutase, uma flavoproteína dependente de NADPH, mantém a tripanotiona em seu estado reduzido e é a enzima chave desse sistema. Esse cofator pode reagir com radicais livres (através de uma reação catalisada pela tripanotiona oxidase), detoxificando-os (Fairlamb; Cerami, 1992). O sistema homólogo encontrado em mamíferos (glutathione peroxidase/redutase) difere na especificidade do substrato.

A *old yellow enzyme* de *T. cruzi* (TcOYE) tem sido investigada, pois esta proteína já foi identificada também em leveduras, plantas e bactérias, mas não em animais. TcOYE cataliza a síntese de prostaglandina PGF₂ α e reduz uma variedade de substâncias tripanocidas (Kubata *et al.*, 2002).

Outras enzimas que também não são encontradas em mamíferos, são a trans-sialidase e a cruzipaína. Em tripomastigotas de *T. cruzi*, a trans-sialidase atua efetivamente na transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para glicoproteínas de superfície do parasito, especialmente as mucinas (Frasch, 2000), processo essencial para o parasito durante a invasão do hospedeiro. Cruzipaína, a principal cisteína protease de *T. cruzi* é mais expressa em formas replicativas, particularmente em epimastigotas (Bonaldo *et al.*, 1991; Campetella *et al.*, 1992). É encontrada principalmente nos reservossomas e sendo importante durante a nutrição do parasito. Além disso, participa do processo de invasão do hospedeiro vertebrado bem como dos mecanismos de escape do sistema imune (Mottram *et al.* 1998; Cazzullo *et al.*, 2002).

Um outro alvo é a via de biossíntese de esteróis de *T. cruzi*, pois este compartilha com os fungos a necessidade do ergosterol para a manutenção da integridade da membrana plasmática, conseqüentemente a viabilidade celular. A

inibição da biossíntese de ergosterol em *T. cruzi* é seletiva, pois, difere da via de biossíntese das células de mamíferos. Substâncias utilizadas no tratamento de infecções fúngicas, como cetoconazol e posoconazol, atuam na inibição de C14 α esterol demetilase dependente de citocromo P-450, ocorrendo um acúmulo tóxico para sistemas enzimáticos associados às membranas, como o sistema de transporte de elétrons (Docampo; Moreno, 2001; Urbina, 1997; Maya *et al.*, 2007). Estes e outros triazóis (como ravuconazol) mais efetivos contra *T. cruzi* estão sendo avaliados clinicamente.

Também há trabalhos envolvendo o metabolismo de ácidos nucleicos, principalmente bases púricas, já que em *T. cruzi* não há biossíntese de purinas durante seu metabolismo. O parasito é capaz de condensar pirazolopirimidinas e metabolizá-las como purinas por meio de uma via de salvação, sendo depois incorporadas ao ácido nucleico. Este mecanismo não ocorre em mamíferos e, portanto, tem sido utilizado para o desenvolvimento de substâncias quimioterápicas para a doença de Chagas (Berens *et al.*, 1981).

Nessa mesma linha de raciocínio, os tripanossomatídeos possuem uma estrutura em forma de disco, formada por uma rede de moléculas circulares de DNA concatenadas altamente organizada, chamada de cinetoplasto. Esse DNA, o qual representa 30% do DNA total da célula, é exclusivo do parasito, mostrando um complexo padrão de replicação que depende da ação de topoisomerases para a manutenção da rede de DNA concatenada. Portanto, inibidores dessas enzimas mostram atividade tripanocida (Das *et al.*, 2004).

1.3.2.3 Exemplos de produtos medicinais com atividade sobre *T. cruzi*

O desenvolvimento de novos fármacos, alternativos ao nifurtimox e benzonidazol, seguros, com atividade tripanocida mais eficaz e baixa toxicidade para o homem tem sido o maior desafio. O uso de produtos naturais extraídos de plantas (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Schinella *et al.*, *et al.*, 2002; Uchiyama *et al.*, 2002; Lirussi *et al.*, 2004; Holetz *et al.*, 2005; Dantas *et al.*, 2006; Luize *et al.*, 2006) com baixa toxicidade e potencial atividade anti-oxidante tem sido constantemente utilizados em testes para avaliação tripanocida.

No trabalho realizado por Holetz *et al.*, (2005) foi avaliado o efeito biológico de *Stryphnodendron adstringens*, comumente conhecido como “barbatimão”, uma planta medicinal amplamente distribuída em regiões da savana e do Brasil. Neste estudo, concentrações de 500, 1.000, 2.500 e 5.000 µg/ml do extrato bruto bem como de frações inibiram o crescimento do tripanossomatídeo. Alterações ultraestruturais e enzimáticas também foram observadas no protozoário.

Bisaggio *et al.* (2006) testaram o efeito de suramin, um derivado simétrico da uréia, em tripomastigotas de cultura de tecidos, os quais exibiram um desligamento parcial ou completo do flagelo da célula com acentuada diminuição da motilidade do parasito, além da diminuição do comprimento e largura do corpo do protozoário. Esta substância parece inibir: a síntese e distribuição de proteínas do citoesqueleto, a endocitose de algumas moléculas, além de interferir na divisão celular (Fairlamb; Bowman, 1980; Voogd *et al.*, 1993).

Luize *et al.* (2006) mostraram a atividade tripanocida *in vitro* do extrato da planta *Piper regnellii*, popularmente conhecida como “Pariparoba”. Uma das substâncias extraídas de *P. regnellii* mostrou, na mesma concentração, ser mais efetivo que benzonidazol na inibição do crescimento de epimastigotas *in vitro*, além da baixa toxicidade sobre células Vero e não causar a lise de células sangüíneas.

Uma avaliação utilizando o extrato etanólico de *Bulgarian propolis* (Et-Blg) foi realizada por Dantas *et al.* (2006) em camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi*. O tratamento de camundongos infectados com Et-Blg diminuiu a parasitemia e não mostrou efeitos tóxicos nos animais, mas não interferiu com a mortalidade.

Várias substâncias terpenóides foram avaliadas quanto ao seu potencial tripanocida (tabela 1). Os terpenóides compreendem uma classe altamente diversificada de produtos naturais utilizados como condimentos, aromatizantes e derivados medicinais. Esses valiosos compostos são comumente isolados de plantas, microrganismos e organismos marinhos (Martin *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Exemplos de derivados terpenóides com atividade anti- *T. cruzi*.

Substância	Origem	Atividade	Referência
Monoterpenos hidroperóxidos	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Epimastigotas	Kiuchi <i>et al.</i> , 2002
-Dehydrocostus lactone -Zaluzanin -(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1-hydroperoxy- <i>p</i> - menth-2-en-8-ol acetate	<i>Laurus nobilis</i> L	Epimastigotas	Uchiyama <i>et al.</i> , 2002
Diterpenos: -azorellanol (Y-2) -mulin-11,3-dien-20-oic acid (Y-5)	<i>Azorella compacta</i>	Epimastigotas, tripomastigotas amastigotasa	Araya <i>et al.</i> , 2003
Sesquiterpeno hidroperóxido	<i>Pogostemon cablin</i>	Epimastigotas	Kiuchi <i>et al.</i> , 2004a
Norditerpeno aldeído Diterpenos	<i>Vitex trifolia</i>	Epimastigotas	Kiuchi <i>et al.</i> , 2004b
Monoterpenos glicosídicos	<i>Dracocephalum kotschy</i>	Epimastigotas	Saednia <i>et al.</i> , 2004
Triterpenos: ácido ursólico, ácido oleanólico	<i>Arrabidaea triplinervia</i>	Tripomastigotas	Leite <i>et al.</i> , 2006
5-epi-icetexone	<i>Salvia gilliessi</i>	Epimastigotas	Sánchez <i>et al.</i> , 2006

REFERÊNCIAS

- Abe, S.; Hu, W.; Ishibashi, H.; Hasumi, K.; Yamaguchi, H. (2004). Augmented inhibition of *Candida albicans* growth by murine neutrophils in the presence of a tryptophan metabolite, picolinic acid. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 10:181-184.
- Acosta-Serrano, A.; Almeida, I.C.; Freitas-Junior, L.H.; Yoshida, N.; Schenkman, S. (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological role. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 144(2):143- 150.
- Akira, S. (2001). Tol-like receptors and immune system. *Tanpakushitsu kakusan koso*. 46(4):562-566. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Amato Neto, V.; Shikanai Yasuda, M. A.; Amato, V. S. (1997). Doença de Chagas aguda. In: Dias, J. C. P. & Coura, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Editora Fiocruz, 127-133.
- Araya, J.E.; Neira, I.; Silva, S.; Mortara, R.; Manque, P.; Cordero, E.; Sagua, H.; Loyola, A.; Borquez, J.; Morales, G.; Gonzáles, J. (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 98(3):413-418. Berens, R.L.; Marr, J.J.; LaFon, S.W.; Nelson, D.J. (1981). Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 3(3):187-196.
- Bisaggio, D.F.; Campanati, L.; Pinto, R.C.; Souto-Padrón, T. (2006). Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Tropica*. 98(2):162-175.
- Bonaldo, M.C.; d'Ecoffier, L.N.; Salles, J.M.; Goldenberg, S. (1991). Characterization and expression of protease during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Experimental Parasitology*. 73(1):44-51.
- Bosco, M.C.; Rapisarda, A.; Massazza, S.; Malillo, G.; Young, H.; Varesio, L. (2000). The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 α and 1 β in macrophages. *The Journal of Immunology*. 164:3283-3291.
- Braga, M.S.; Lauria-Pires, L.; Arganaraz, E.R.; Nascimento, R.J.; Teixeira, A.R. (2000). Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 42(3):157-161.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*. 27: 374-382.
- Brener, Z.; Chiari, E. (1967). Susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to various chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 9(4):197-207.

- Brodskyn, C. I.; Barral-Netto, M. (2000). Resposta imune na doença de Chagas. *In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto M. Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas. 2ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 171-176.*
- Brown, R.R.; Ozaki, Y.; Datta, S.P.; Borden, E. C.; Sondel, P.M.; Malone, D.G. (1991). Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, autoimmune diseases and AIDS. *Advances in Experimental Medicine and Biology. 294:425-435.*
- Buscaglia, C.A.; Campo, V.A.; Frasc, A.C.C.; Di Noja, J.M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Reviews, Microbiology. 4(3):229-236.*
- Campetella, O.; Henriksson, J.; Aslund, L.; Frasc, A.C.; Pettersson, U.; Cazzulo, J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic organized genes located on different chromosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology. 50(2):125-134.*
- Campos, M.A.S.; Almeida, I.C.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Valente, E.P.; Procópio, D.O.; Travassos, L.R.; Smith, J.A.; Golenbock, D.T.; Gazzinelli, R.T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *The Journal of Immunology. 167(1):416-423.*
- Cançado, J.R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas' disease with Benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 44(1)29-37.*
- Carcavella R.U.; Galindez-Giron, I; Juberg J.; Lent, H. (1998). Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. *Editores Fiocruz, Rio de Janeiro.*
- Carlin J. M.; Ozaki Y.; Byrne G. I.; Brown R. R.; Borden E. C. (1989). Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects. *Experientia 45: 535-541.*
- Cazzullo, C.L.; Sacchetti, E.; Galluzzo, A.; Panariello, A.; Adorni, A.; Pegoraro, M.; Bosis, S.; Colombo, F.; Trabattoni, D.; Zamglioni, A.; Clereci, M. (2002). Cytokine profiles in schizophrenic patients treated with risperidone: a 3-month follow-up study. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry. 26(1): 33- 39.*
- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*; n. gen., n. Sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1: 1-59.*
- Corrêa, P.R.C.; Pinto, A.S.; Souza, J.R.; Silva, G.D.F.; Vieira Filho, S. A.; Duarte, L.P Yamada-Ogatta, S.F. (Submetido). *In vitro* activity of 2-pyridinecarboxylic acid against trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* from the bat *Phyllostomus hastatus*.
- Coura, J.R.; Castro, S.L. (2002). A critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 97(1): 3-24.*

- Cummings, K.L.; Tarleton, R.L. (2004). Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity*. 72:4081-4089.
- Dantas, A.P.; Olivieri, B.P.; Gomes, F.H.; De Castro, S.L. (2006). Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected mice with propolis promotes change in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*. 103(2): 187-193.
- Das, A.; Dasgupta, A.; Sengupta, T.; Majumder, H.K. (2004). Topoisomerase of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends in Parasitology*. 20(8)381-387.
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*. 86:197-283.
- Dias, J.C. P. (1987). Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today*, 3: 336-341.
- Dias, J.C.P. (2000). Epidemiologia In: Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 379-388.
- Dias, J.C.P.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(5):603-12.
- Docampo, R. (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions*. 73: 1–27.
- Docampo, R.; Moreno, S.N.J. (2001). The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 33:151-159.
- Dutra, W. O.; Rocha, M.O.C.; Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*. 21(12):581-587.
- Dvorak, J.A.; Hyde, T.P. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and sub cellular levels. *Experimental Parasitology*. 34(2):268-283.
- Evans, G.W.; Jonhson, E.C. (1980). Zinc absorption in rats fed a low-protein diet and a low-protein diet supplemented with tryptophan or picolinic acid. *The Journal of Nutrition*. 110(5):1076-1080.
- Fairlamb, A.H.; Bowmam, I.B. (1980). Uptake of the trypanocidal drug suramin by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and its effect on respiration and growth rate in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1(6):315-333.
- Fairlamb, A. H.; Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*. 46:695-729.
- Fernandez-Pol, J. A.; Bono, V. H.; Jr.; Johnson, G.S. (1977). Control of growth by picolinic acid: Differential response of normal and transformed cells. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America. 74(7): 2889-2893.

Ferreira, L.F.; Brito, C.; Cardoso, M.A.; Fernandes, O.; Richard, K.; Araújo (2000). Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Tropica. 75:79-84.*

Ferreira, M. S.; Lopes, E. R.; Chapadeiro, E.; Dias, J. C. P.; Ostermayer, A. L. (2002). Doença de Chagas. In: Veronesi, R. & Focaccia, R. Tratado de Infectologia. Editora Atheneu 2° ed. 1195-1233.

Filardi, L.S.; Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 81(5):755-759.*

Fortnagel, P.; Fresse, E. (1968). Inhibition of aconitase by chelation of transition metals causing inhibition of sporulation in *Bacillus Subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry. 243:5289-5295.*

Frasch, A.C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *16(7):282-286.*

Frumento, G.; Rotondo, R.; Tonetti, M.; Damonte, G.; Benatti, U; Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Experimental Medicine. 196(4):459-468.*

Galhardo, M. C. G.; Martins, I. A.; Moreno, A. H.; Xavier, S. S.; Coelho, J. M. C.; Vasconcelos, A. C. V.; Ribeiro, R. S. (1999). Reativação da infecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 32: 291-294.*

Garcia, S.; Ramos, A.O.; Senra, J.F.V.; Vilas-Boas, F.; Rodrigues, M.M.; Carvalho, A.C.; Santos, R.; Soares, M.B.P. (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 49(4):1521-1528.*

Gazzinelli, R. T.; Denkers, E. (2006). Implications for host parasitism. *Nature Review Immunology. 6(12):895-906.*

Gazzinelli, R.T.; Ropert, C.; Campos, M.A. (2004). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunological Reviews. 201:9-25.*

Higuchi, Mde. L.; Benvenuti, L.A.; Martins Reis, M.; Metzger, M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research. 60(1):96-107.*

Holetz, F.B.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.; De Mello, J.C.P.; Morgado-Diaz, J.A.; De Toledo, C.E.M.; Nakamura, C.V. (2005). Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Hepertomonas samuelpeessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 100(4):397-401.*

- Janeway, C.A.Jr. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 20:7461-7468.
- Janeway, C.A.Jr.; Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 20:197-216.
- Kierszenbaum, F. (2003). Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 37:1-11.
- Kiuchi, F.; Itano, Y.; Uchiyama, N.; Honda, G.; Tsubouchi, A.; Nakajima-Shimada, J.; Aoki, T. (2002). Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *The Journal of Natural Products* 65: 509-512.
- Kiuchi, F.; Matsuo, K.; Ito, M.; Qui, T.K.; Honda, G. (2004a). New sesquiterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Pogostemon cablin*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52(12): 1495-1496.
- Kiuchi, F.; Matsuo, K.; Ito, M.; Qui, T.K.; Honda, G. (2004b). New noriterpenoid trypanocidal activity from *Vitex trifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52(12):1492-1494.
- Kubata, B.K.; Kabututu, Z.; Nozaki, T.; Munday, C.J.; Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Lazarus, M.; Maruyama, T.; Martin, S.K.; Duszenko, M.; Urade, Y. (2002). A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Experimental Medicine*. 196(9): 1241-1251.
- Kumar, S.; Tarleton, R.L. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*. 20(5): 201-216.
- Leite, A.P.V.; Oliveira, A.b.; Lombardia, J.A.; Filho, J.D.S.; Chiara, E. (2006). Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(11):2307-2309.
- Leuthauser, S.W.; Oberley, L.W.; Oberley, T.D. (1982). Antitumor activity of picolinic acid in CBA/J mice. *Journal of National Cancer Institute*. 68, 123-126.
- Lirussi, D.; Prieto, J.M.; Gennari, M.; Buschiazzi, H.; Ríos, J.L.; Zaidenberg, A. (2004). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoterapia*. 75:718-723.
- 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*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(10):2126-2130.
- Luqueti AO 1997. Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitology Today*. 13:127-128.

- Macedo, V. O. (1997). Forma indeterminada da doença de Chagas. *In: Dias, J. C. P. & Coura, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Editora Fiocruz, 135-151.*
- Martin, V.J.J.; Pitera, D.J.; Withers, J.D.; Newman, J.D.; Keasling, J.D. (2003). Engeneering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology. 21(7):796-802.*
- Maslov, D.A.; Simpson, L. (1994). RNA editing and mitochondrial genomic organization in the cryptobiid kinetoplastid protozoan *Trypanoplasma borreli*. *Molecular and Cellular Biology. 14(12): 8174-8182.*
- Maya, J.D.; Cassels, B.K.; Iturriaga-Vasquez, 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. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative. 146(4):601-620.*
- Maya, J. D.; Repetto, Y.; Agosin, M.; Ojeda, J.M.; Tllez, R.; Gaule, C.; Morello, A. (1997). Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutatione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology, 86: 101-106.*
- Medzhitov, R.; Janeway, Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science. 296(5566):298-300.*
- Mehler, A.H. (1955). Formation of picolinic and quinolinic acids following enzymatic oxidation of 3-hidroxyanthranilic acid. *The Journal of Biological Chemitry. 218(1): 241-259.*
- Melillo, G.; Cox, G. W.; Biragyn, A.; Sheffler, L. A.; Varesio, L. (1994). Regulation of nitric-oxide synthase mRNA expression by interferon- γ and picolinic acid. *The Journal of Biological Chemistry. 269:8128–8133.*
- Melillo, G.; Cox, G.W.; Radzioch, D.; Varesio, L. (1993). Picolinic acid, a catabolite of L-tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. *The Journal of Immunology. 150(9): 4031- 4040*
- Moffett, J.R.; Namboodiri, M. A. (2003). Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology. 81:247-265.*
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(5): 577- 591.*
- Moreno, S.N.; Docampo, R.; Mason, R.P.; Leon, W.; Stoppani, A.O. (1982). Different behaviors of benznidazole as free radical generation with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of Biochemistry and Biophysics. 218(2):585-591.*

Mottram, J.C.; Brooks, D.R.; Coombs, G.H. (1998). Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 1(4):455-460.

Muelas-Serrano, S.; Nogal, J.J.; Martinez-Diaz, R.A.; Martinez-Fernandez, A.R.; Gómez-Barrio, A. (2000). In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonass vaginalis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 71(1-2):101-107.

Nishizuka, Y.; Hayaishi, O. (1963). Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. I. Enzymic synthesis of niancin ribonucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 238:3369-3377.

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade *tryptophan*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 81(3): 908-912.

Rebello, T.; Lonnerdal, B.; Hurley, L. S. (1982). Picolinic acid in milk, pancreatic juice and intestine: inadequate for role in zinc absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 35(1): 1-5.

Rassi, A.; Amato Neto V.; Siqueira, A. F.; Amato, V. S.; Rassi Junior, A. (1999). Efeito protetor do benzonidazol contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóides em virtudes de afecções secundárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 475-482.

Rassi, A.Jr.; Rassi, S.G.; Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 76(1)75-96.

Reslo, A.R.; Mckerrow, J.H. (2006). Drug discovery and development for neglected parasitic disease. *Nature Chemical Biology*. 2(12):701-710.

Rey, L. (2002). Parasitologia. 3° ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan* 167-178.
 Rezende, J. M. (1997). O aparelho digestivo da doença de Chagas – Aspectos clínicos. In: DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Editora Fiocruz* 153-176.

Riarte, A.; Luna, C.; Sabatiello, R; Sinagra, A.; Schiavelli, R., Rissio, A.; Maiolo, E.; Garcia, M. M.; Jacob, N.; Lauricella, M.; Segura, E. L.; Vazques, M. (1999). Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989- 1996. *Clinical Infectious Disease*. 29: 561-567

Rocha, A.; Meneses, A. C. O., Silva, A. M., Ferreira, N. S.; Burgarelli, M. N. K.; Almeida, E.; Turcato Jr, G.; Metze, K.; Lopes, E. R. (1994). Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 50: 261-268.

- Romanha, A.J.; Alves, R.O.; Murta, S.M.; Silva, J.S.; Ropert, C.; Gazzinelli, R.T., (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *The Journal of Infectious Disease*. 186: 823–828.
- Rottenberg, M.E.; Riarte, A.; Sporrang, L.; Altcheh, J.; Petray, P.; Ruiz, A.M.; Wigzell, H.; Orn, A. (1995). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunology Letters*. 45(1- 2):53-60.
- Ruffmann, R.; Welker, R. D.; Saito, T.; Chirigos, M. A.; and Varesio, L. (1984). In vivo activation of macrophages but not natural killer cells by picolinic acid (PLA). *Journal of Immunopharmacology*. 6:291.
- Saeftel, M., Fleischer, B., Hoerauf, A. (2001). Stage-dependent role of nitric acid in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 69(4): 2252-2259.
- Saeidnia, S.; Gohari, A.R.; Uchiyama, N.; Ito, M.; Honda, G.; Kiuchi, F. (2004). Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52(10): 1249-1250.
- Sanchez, A.M.; Jimenez-Ortiz, V.; Sartor, T.; Tonn, C.E.; García, E.E.; Nieto, M.; Burgos, M.H.; Sosa, M. (2006). A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 98:118-124.
- Schinella, G.R.; Tournier, H.A.; Prieto, J.M.; Ríos, H.; Buschiazzi, H.; Zaidenberg, A. (2002). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*. 73:569-75.
- Sharon, M.; Gnarr, J. R.; Leonard, W. J. (1990). A 100 kilodalton protein is associated with the murine interleukin 2 receptor: Biochemical evidence that p 100 is distinct from the alpha and beta chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12): 4869-4873.
- Shemarova, I.V.; Korotkov, A.M.; Nosova, I.Yu. (2003). Study of mechanism of cytostatic effect of picolinic acid on proliferating *Tetrahymena pyriformis* cells. *Doklady Biological Sciences* 391:299-302. Translated from *Doklady Akademii Nauk* 391(2):276-280.
- Soccol, V. T.; Barnabé, C.; Castro, E.; Luz, E.; Tibayrenc, M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná State, Brazil. *Experimental Parasitology*. 100: 81- 86.
- Tanowitz, H. B.; Kirchhoff, L.V.; Simon, D.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clinical Microbiology Review*. 5(4):400-419.
- Tarleton, R.L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International Journal for Parasitology*. 31(2001): 550-554.
- Tarleton, R.L.; Grusby, M.J.; Postan, M.; Glimcher, L.H. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International Immunology*. 8(1):13-22.

Turens, J.F.; Watts, B.P.; Zhong, L.; Docampo, R. (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 82(1):125-129.

Tyler, K.M.; Engman, D.M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 31: 472-481.

Uchiyama, N.; Matsunaga, K.; Kiuchi, f.; Honda, G.; Tsubouchi, A; Nakajima-Shimada, J.; Aoki, T. (2002) Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 50(11):1514-1516.

Urbina, J.A. (1994). Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 10: 107-110.

Urbina, J.A. (1997). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*.S91-S99.

Urbina, J.A. (1999). Parasitological cure of Chagas' disease: is it possible? Is it relevant? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94(1):349-355.

Urbina, J.A.; Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 19(11): 495-501.

Urbina, J.A.; Osorno, C.E.; Rojas, A. (1990). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopycolinic acid: in vitro and in vivo studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 282(1):91-99.

Varesio, L.; Clayton, M.; Blasi, E.; Ruffmann, R.; Raadzioch, D. (1990). Picolinic acid, a catabolite of tryptophan, as the second signal in the activation of IFN γ primed macrophages. *The Journal of Immunology*. 145:4265.

Varesio, L.; Radzioch, D.; Bottazzi, B.; Gussella, G.L. (1992). Ribosomal RNA metabolism in macrophages. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 181:209-237.

Veloso, V. M.; Carneiro, C. M.; Toledo, M. J. O.; Chiari, E.; Tafuri, W. L.; Bahia, M. T. (2001). Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96 (7): 1005-1011.

Viotti, R.; Vigliano, C.; Armenti, H.; Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal*. 127(1):151-162.

Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Alvarez, M.G.; Armenti, A. (2005). Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. *Revista Espanola de Cardiologia*. 58(9):1037-1044.

Voogd, T.E.; Vansterkenburg, E.L.; Wilting, J.; Janssen, LH. (1993). Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacology Review*. 45(2):177- 203.

World Bank (1993). World Development Report 1993. *Investing in health*. Oxford University Press, New York, 329 pp.

World Health Organization (WHO). (2002). Chagas disease. Tropical disease research *In: Eighteenth programme report of UDNPD/World Bank/ WHO Special Programme for research and training in tropical disease research: progress 1995-1996*. Geneva: WHO, 122-123.

Zeledón, R.; Bolaños, R.; Rojas, M. (1984). Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Tropica*, 41: 39-43.

Zhang, L.; Tarleton, R.L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *The Journal of Infectious Disease*. 180:480-486.

**ARTIGO A – BIOLOGICAL ACTIVITY OF PICOLINIC ACID AGAINST THE
PROTOZON *TRYPANOSOMA CRUZI***

**Paulo Roberto Ceridório Corrêa, Viviane Krominski Graça-de Souza, Igor
Alexandre Campos Damiani, Lucy Megumi Yamauchi Lioni, Phileno Pinge
Filho, José Andrés Morgado-Díaz, Celso Vataru Nakamura, Sueli Fumie
Yamada- Ogatta***

*Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788.

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PICOLINIC ACID AGAINST THE PROTOZOON *TRYPANOSOMA CRUZI*

Paulo Roberto Ceridório Corrêa¹, Viviane Krominski Graça-de Souza¹, Igor Alexandre Campos Damiani¹, Lucy Megumi Yamauchi Lioni¹, Phileo Pinge Filho², José Andrés Morgado-Díaz³, Celso Vataru Nakamura⁴, Sueli Fumie Yamada- Ogatta^{1*}

Abstract

The *in vitro* effects of 2-pyridinecarboxylic acid (picolinic acid), a metabolite of L-tryptophan, on growth of replicative forms of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, were investigated. The IC₅₀/96 h of picolinic acid was 0.73 mM, and compared to mammalian cells, epimastigotes forms of *T. (S.) cruzi* is 6.5 times more sensitive to this compound. Epimastigotes with altered cell shape, presenting two or more flagella were observed by scanning electron microscopy after the treatment with picolinic acid. Ultrastructural observations showed alterations in Golgi apparatus as well as the presence of great cytoplasmic vacuoles and myelin figures. The number of the macrophages infected with the parasite as well as the number of the amastigotes/cells were reduced after the treatment with picolinic acid (4 mM) and/or IFN- γ (100 IU/ml). We suggest that picolinic acid can be exploited as alternative or adjuvant drug for the treatment of Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Picolinic acid. Antimicrobial activity. Macrophages.

Introduction

Chagas disease, caused by the heteroxenic protozoon *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, is a major public health problem in Latin America, where more than 120 million people are at risk of infection (WHO, 2002). The natural transmission of the protozoan to humans occurs through the excreta containing

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, CEP 86051-990, Brazil. Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788. E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

² Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

metacyclic trypomastigotes of an infected hematophagous reduviid bug of the subfamily Triatominae. Within the mammalian host the parasite can invade a wide range of nucleated cells, including macrophages. After intracellular multiplication as amastigotes forms, they turn into trypomastigotes and are released from infected cells. Once in the bloodstream, the trypomastigotes either invade new cells or may be ingested by the invertebrate host (De Souza, 1984).

Overall, the course of the infection is characterized by a relatively short acute phase (between two and four months), presenting prominent parasitemia and no specific symptoms. If the patients are not treated and the immune control of the acute phase is established, the infection turns into a chronic phase where parasites are no longer detectable in the bloodstream by microscopy. In this phase, nearly 30% of patients develop symptoms associated with inflammatory damage of the heart or with digestive problems related to the destruction of the myenteric neuronal network (Dutra *et al.*, 2005).

Despite of the considerable advances in the knowledge of the biology of the *T. cruzi*, the only two drugs currently available against this trypanosomatid are nifurtimox or benznidazole, which were developed decades ago. They have been indicated for the treatment of acute infections but the efficacy of the drugs is limited during the chronic phase of the disease (Urbina and Docampo 2003). Both drugs must be taken for extended period and have significant side-effects which can lead to discontinuation of treatment. In addition, differences in the susceptibility and natural resistance of the different strains to them have been reported (Filardi and Brener, 1987). Since the development of new classes of anti-*T. cruzi* has been unpromising to date, alternative strategies have been developed in order to eliminate the parasite, such as: screening of available commercially drugs, synthetic or derived from natural sources compounds with potential anti-*T. cruzi* activity (Coura and Castro, 2002) or combinations with the available drugs (Araujo *et al.*, 2000) or immunomodulators to provide a synergic effect (Santa-Rita *et al.*, 2005).

Macrophages and neutrophils are phagocytic cells of the innate immune system and play an important role as the first line of host defense against microbial infections (Lorenz and Fink, 2002). Macrophage recognition of foreign microorganisms results in phagocytosis and the eventual destruction of them by lysosomal enzymes, toxic reactive oxygen and nitrogen intermediates, and/or nutrient deprivational mechanisms. In murine model of Chagas disease acute phase, the

macrophages activated by TNF- α and IFN- γ seem to have an important role in the control of *T. cruzi* infection (Dutra *et al.*, 2005).

Picolinic acid (2-pyridinecarboxylic acid) is a naturally occurring end-product of L-tryptophan catabolism and its production is catalyzed by picolinic carboxylase (Mehler, 1955). This compound is a potent costimulus in the induction of macrophage (Ruffmann *et al.*, 1984; Varesio *et al.*, 1990; Blasi *et al.* 1993, Mellilo *et al.*, 1994; Bosco *et al.*, 2000, Pais and Appelberg 2000; Mucci *et al.* 2003, Cai *et al.* 2006) or neutrophil-mediated functions (Abe *et al.* 2004). The activation, by picolinic acid, of peritoneal macrophages treated with interferon-gama (IFN- γ) enhances its antitumor activity *in vivo* (Ruffmann *et al.*, 1984) and *in vitro* (Varesio *et al.*, 1990). Furthermore, the macrophage or neutrophil-mediated microbicidal activity against *Candida albicans* (Blasi *et al.* 1993, Mucci *et al.* 2003, Abe *et al.* 2004) and *Mycobacterium avium* (Pais and Appelberg 2000, Cai *et al.* 2006) was also up-regulated by this compound.

In a previous work, we showed the inhibitory activity of picolinic acid against trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* isolated from the bat *Phyllostomus hastatus*, a non-pathogenic trypanosomatid. The proliferation of epimastigotes and motility of trypomastigotes were inhibited by this compound (Corrêa *et al.*). In this work, we evaluated the antimicrobial activity of this compound against *T. cruzi*. The ultrastructural changes provoked by the compound, citotoxicity to mammalian cells and the effect on phagocytic activity of murine peritoneal macrophages were also analysed.

Material and methods

Preparation of solutions

Stock solution (10 mg/ml) of picolinic acid (Sigma Chemical Co., USA) was prepared in sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.0, and N-benzyl-2-nitro-1Himidazolacetamide [benznidazole (Roche Pharmaceuticals, Brazil)] was prepared in 10% DMSO (v/v). These solutions were sterilized by filtration (0.22 μ m, Millipore, Brazil) and added aseptically only once to growth medium at determined concentrations.

Microorganism

T. cruzi Dm28c epimastigotes (Contreras *et al.*, 1988) were maintained by weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964) at 28 °C. Metacyclic trypomastigotes were obtained after *in vitro* differentiation under chemically defined conditions, as previously described (Contreras *et al.*, 1985).

Cell culture

HEp-2 cells (human larynx carcinoma, ATCC, CCL-23) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM (Invitrogen-Gibco, USA)] supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2.5 µg/ml amphotericin B and 5% CO₂ at 37 °C.

Preparation of the macrophages

The murine peritoneal cells were prepared from Swiss mice obtained from the breeding colonies of the animal facility of the Centro de Ciências Biológicas at Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. The experimental protocol was approved by the Ethics Animal Experimentation Committee of the Universidade Estadual de Londrina. Mice were injected intraperitoneally with 1.5 ml of 3% thioglycolate and peritoneal cells were collected four days later by injecting sterile cold 10 ml of 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 0.15 M NaCl (PBS). The obtained cells were centrifuged at 500 g for 10 min at 4 °C and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen-Gibco, USA) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 50 µg/ml gentamicin, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Peritoneal cells were added to a 24-well culture plate (Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 1×10^6 cells/well and incubated for 4 h. and non adherent cells were removed by washing with sterile PBS.

Antitrypanosomal activity

Epimastigotes of *T. cruzi* Dm28c clone in logarithmic growth phase (5×10^5 cells) were added to 18 x 180 mm screw-capped tubes containing 2 ml of growth medium with 0.4 – 2 mM picolinic acid added. The cultures were incubated at 28 °C, and cell growth was estimated by direct counting in a hemocytometer (Improved Double Neubauer) after 96 h. Tubes containing medium alone and medium plus 1% DMSO served as growth and sterility controls.

Citotoxicity assay

The HEp-2 cell line was cultured into 96 well culture plate at a density of 1×10^5 cells/well as described above, and incubated for 24 h. At confluence, nonadherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of picolinic acid (0.4 – 9.75 mM) were added to each well containing the cells, and the plates were incubated for 48 h. Cell viability was determined by the MTT [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA)] method according to the manufacturer's recommendation.

The concentration of the compounds needed to inhibit the viable cells up to 50% by regression analysis correspond the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) and the selectivity index (SI) were calculated using this equation: $SI = CC_{50}/MIC_{50}$.

Effect on activation of macrophage cells

The murine peritoneal macrophages were obtained from BALB/c mice as described above. The cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 36 mM sodium bicarbonate and 5% CO_2 at 37 °C. At confluence, non-adherent cells were removed and adherent cells were harvested by gentle scraping with a rubber policeman. The pooled cells were washed three times and counted. The cells were added to a cover glass in a 24-well culture plate (Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 1×10^6 cells/well and incubated for 18 h. The medium was removed and replaced with fresh culture medium containing picolinic acid (4 mM) and/or INF- γ (100 IU/ml) and the plates were incubated for 18 h. After this period, *T. cruzi* trypomastigotes at a

protozoan to macrophage ratio of 1:1 were inoculated into the monolayer and the plate was incubated for 48 h. The cover glasses were fixed with methanol (Merck, Brazil) and stained with Giemsa. The number of infected macrophages and the amastigotes/100 cells were determined by optical microscopy.

Electron microscopy

Transmission electron microscopy. Epimastigote form of *T. cruzi* Dm28c treated with 0.73 mM picolinic acid were fixed for 2 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Post-fixation was carried out in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing, 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl₂ for 1 h at room temperature. The cells were dehydrated in acetone and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a Zeiss CEM-900 electron microscope.

Scanning electron microscopy. Epimastigotes forms of *T. cruzi* Dm28c treated with 0.73 mM picolinic acid were fixed with 2.5% glutaraldehyde for 2 h at room temperature. After fixation, small drops of the sample were placed on a specimen support with poly-L-lysine. Post-fixation was carried out in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl₂ for 30 min. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical-point dried in CO₂, coated with gold and observed in a SHIMADZU SS-550 scanning electron microscope.

Statistical analysis

The results were evaluated by Tukey-Kramer using the software Statistic for Windows, version 6.0 (Statsoft, Inc., Oklahoma city, Okla., USA). A *P* value less than 0.05 were considered significant.

Results

Antitrypanosomal activity and cytotoxicity for mammalian cells

The inhibitory effects of picolinic acid on replicating epimastigote forms of *T. cruzi* Dm28c strain are presented in Figure 1A. A dose-dependent antiprotozoan effect was observed and the highest activity was observed in concentration from 1.3 to 2 mM, where more than 90% of the parasites growth was inhibited after 96 h of incubation. The $IC_{50}/96$ h (50% inhibitory concentration after 96 h of incubation) calculated for picolinic acid was 0,73 mM. In this concentration, 17, 31, 32 e 52%, of epimastigote growth were inhibited after 24, 48, 72 and 96 h, respectively (Figure 1B). The addition of 1% DMSO in the culture did not interfere with the parasite growth (data not shown).

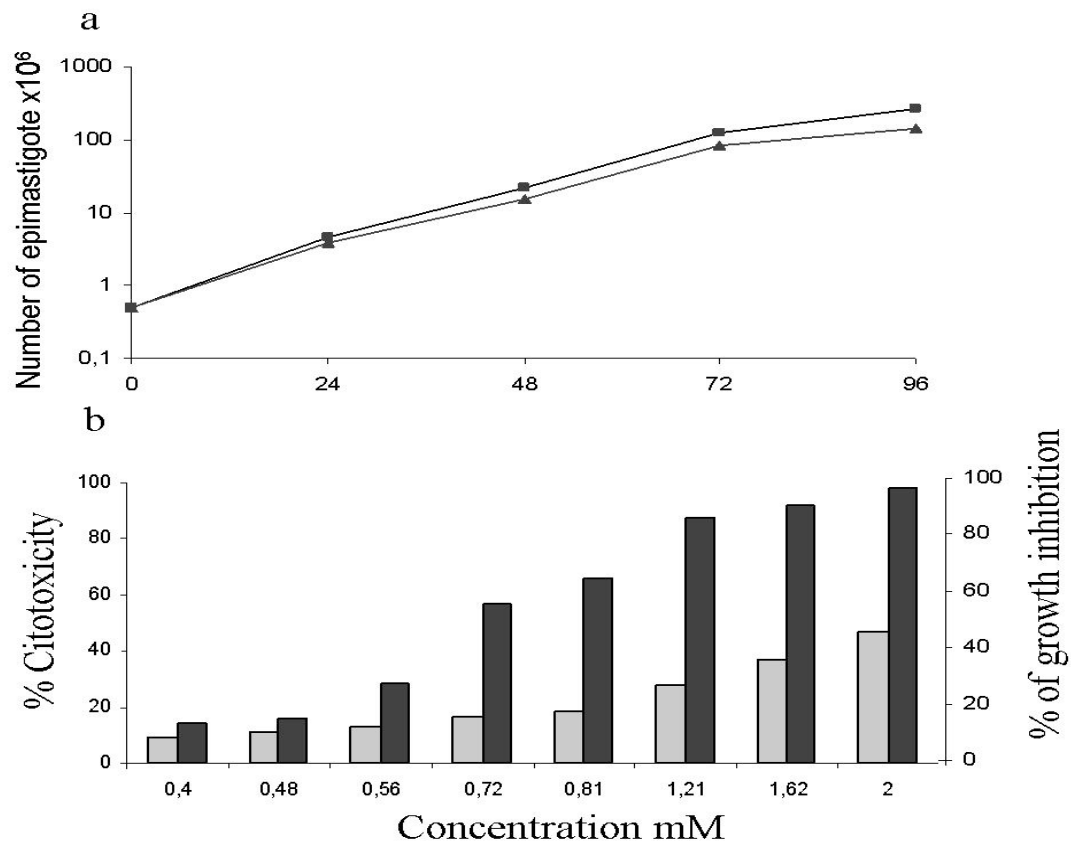


Figure 1 – Effects of AP on replication epimastigotes forms of *T. cruzi* and AP cytotoxicity assay. (a) *T. cruzi* epimastigote form growth curve, non treated (□), treated (▲) with 0.73 mM of AP (IC_{50}). The systems were incubated during 96 h at 28 oC and counted in Neubauer chamber. (b) Effect of different concentrations of AP on growth of *T. cruzi* epimastigotes forms (□), and cytotoxicity of AP on HEp-2 cells (□).

The 50% cytotoxic concentration for HEp-2 line cells after 96 h of incubation ($CC_{50}/96$ h) determined for picolinic was 4.87 mM. The toxicity for HEp-2 cells and the inhibitory activity against *T. cruzi* were compared by using the selectivity index (SI), where a value greater than 1 is considered more selective for activity against the parasite. The SI of picolinic acid was 6.67; indicating to be more selective against the parasite.

Morphological and ultrastructural changes

The morphological alterations provoked by picolinic acid were visualized by scanning electron microscopy and are showed in figure 2. The treatment of epimastigotes with $IC_{50}/96$ h (0.73 mM) resulted in alteration of the cell shape with many cells presenting two or more flagella (Figure 2c and d) as well as rounding the parasite body (Figure 2b-f), compared to control cells (Figure 2a). Examination of the treated parasites with $IC_{50}/96$ h by transmission electron microscopy showed alterations in Golgi apparatus as well as great cytoplasmic vacuoles. Epimastigotes treated with 1.62 mM picolinic acid showed myelin-like figures and swelling of mitochondrial membrane (Figure 3) in addition of the alterations described previously.

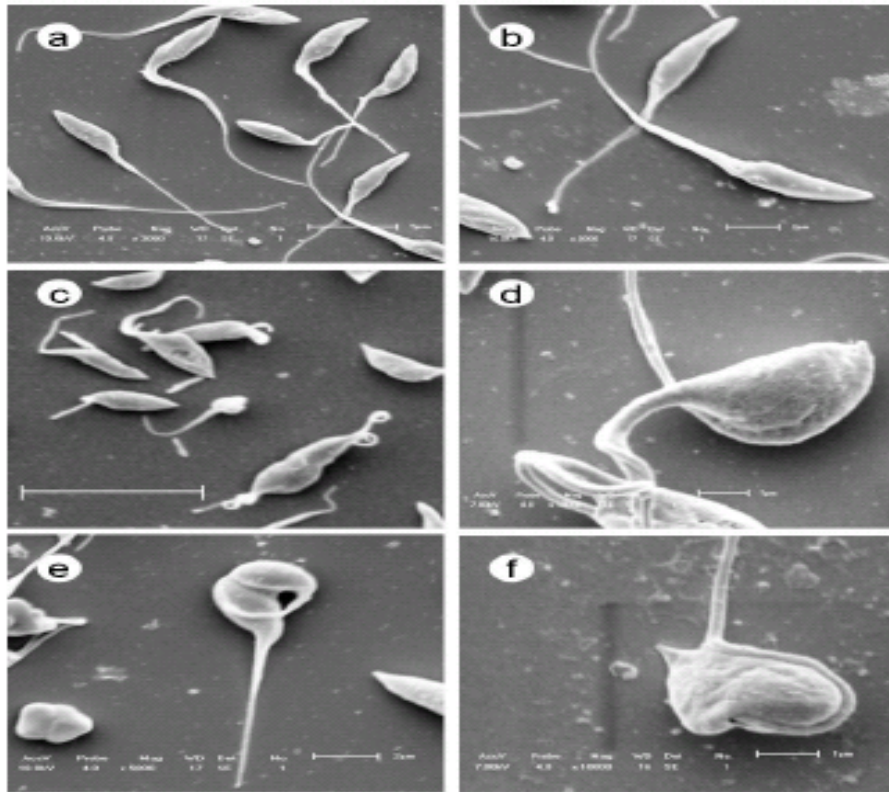


Figure 2 – Scanning electron microscopy photomicrographs of epimastigote forms of *T. cruzi* incubated for 96 h in the absence (a-b) or in the presence (c-f) of 0.73 mM of AP. Note the changes in parasite morphology in the presence of AP (c-f), and cells exhibit more than one flagellum (c-d). Bars: 1 μ m.

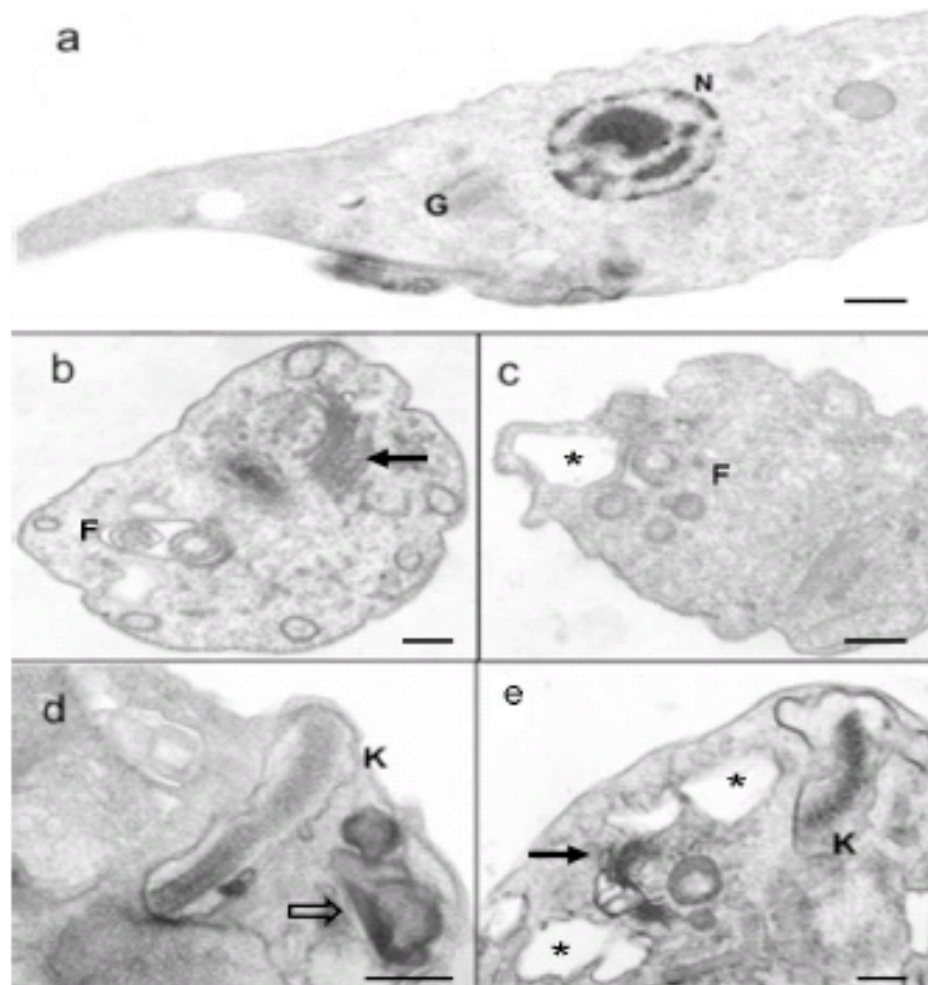


Figure 3 – Electron micrographs showing morphological features after AP treatment. a- Untread cell with normal morphology showing the nucleus (N) and kinetoplast (k). Epimastigote of *T. cruzi* were incubated in LIT medium containing 0.73 mM of AP (b-c), and 1.62 mM of AP (d-e). Note the fragmentation of Golgi Complex (filled arrow); presence of more than one flagellum (F); myelin-like figures inside of cytoplasm (arrow); vacuoles (asterisk). Bars: 1 μ m.

Macrophage cells activation

The effects of picolinic acid on activation and antimicrobial activity of peritoneal macrophages were shown in Figure 4. The number of the macrophages infected with the parasite (Figure 4a), as well as the number of the amastigotes/100 cells (Figure 4b) were reduced after the treatment with picolinic acid (4 mM) and/or IFN- γ (100 IU/ml). There was a significant reduction of the amastigotes inside of the macrophages treated with picolinic acid and IFN- γ before the infection as compared with each compound treatment alone ($P < 0.01$). The same effect was visualized with the treatment of the macrophages after the parasites' infection, and it was more prominent as compared with the earlier ($P < 0.05$). However, there was no significant

difference with this treatment as compared with the picolinic acid treated macrophages. None morphological alterations were observed in treated non-infected macrophages.

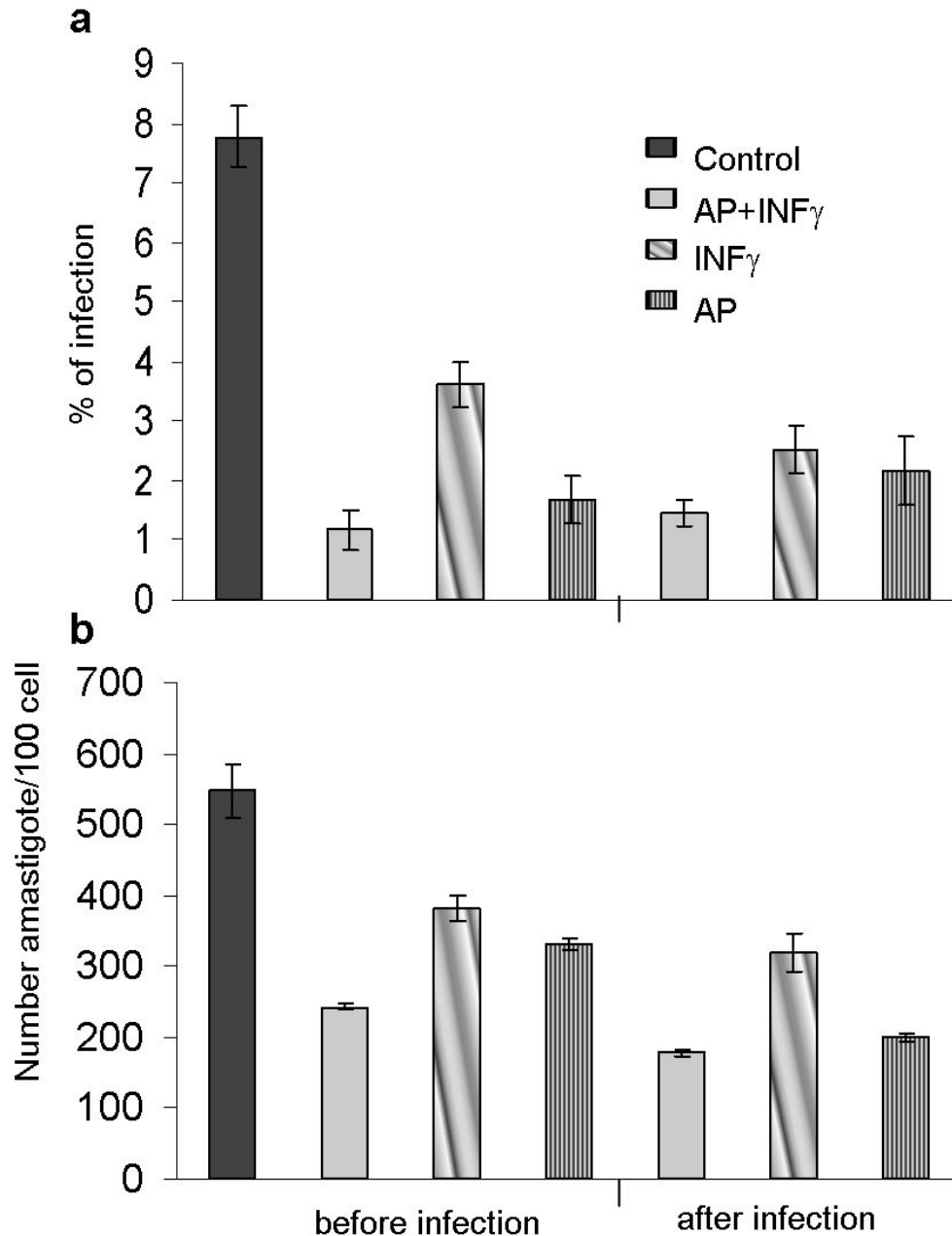


Figure 4 – Anti-proliferative effect of picolinic acid on *T. cruzi* and murine macrophages interaction. (a) Percentage of *T. cruzi* infected macrophages after treatment with 4 mM picolinic acid and/or 100 U/ml INF- γ . Both treatment showed difference when compared to control ($p < 0.001$). (b) Number of amastigotes/100 macrophages, in groups treated with AP (4 mM) and/or INF- γ (100 U/ml) compared to control ($p < 0.001$).

Discussion

A number of biological functions have been attributed to picolinic acid. The earlier researches have showed that picolinic acid was a specific chelating agent for metal ion, including copper, iron and zinc (Evans and Johnson, 1980) and this property has been implicated as responsible for many biological activities. The inhibitory effect of picolinic acid against microorganisms growth was reported with *Escherichia coli* (Fortnagel and Freese 1968), *Neurospora crassa* (Martegani *et al.*, 1980), *Bordetella pertussis* (Schneider and Parker, 1982), *Mycobacterium avium* complex organisms (Cai *et al.*, 2006) and *Tetrahymena pyriformis* (Shemarova *et al.*, 2003).

Inhibition of trypanosomatids growth by chelating agents has been reported in the literature. Regarding to *T. cruzi*, Loo and Lalonde (1984) showed that deferoxamine, an iron-chelating agent, reduced the murine peritoneal macrophages intracellular iron content, and then it suppressed the intracellular growth of the parasite. Furthermore, it was observed a significant reduction on mortality rate of infected and treated mice with this agent (Lalonde and Holbein, 1984). The other chelating agents, which form stable complexes with iron, copper and zinc ions (dithiocarbamates derivatives), inhibited the *in vitro* epimastigotes growth (Rodrigues *et al.*, 1995). Among them, 1,10 phenanthroline provoked several morphological alterations in the parasite, including epimastigotes rounding and swelling and abnormal electron-dense deposits, mainly of calcium, in the endoplasmic reticulum and in the kinetoplast (Lane *et al.*, 1998).

Although our results showed an inhibitory activity against proliferative forms of *T. cruzi*, in epimastigotes treated with picolinic acid, we could not observe any electron-dense deposits inside the parasites. The observation of several parasites presenting two or more flagella after treatment with picolinic acid (0.73 mM) might indicate a possible blockage in a point of the cell cycle. Trypanosomes divide by binary fission after duplication of basal bodies, kinetoplast, flagellum and nuclear mitosis. During replication, the assembly of the flagellum occurs in a semiconservative manner where the old flagellum is maintained and a new one is assembled. The correct duplication and positioning of the new flagellum and connected elements are essential to segregation to the daughter cells (Vaughan and Gull, 2003). The distal tip of the new flagellum remains in constant contact with the

old one and its might define the initiation point of cytokinesis (Kohl *et al.*, 2003). Further analyses are needed to prove that picolinic acid can control the *T. cruzi* cell cycle.

The effect of picolinic acid on cell cycle of other organisms has already been reported. The addition of picolinic acid (at 9 mM concentration) to cultures of *N. crassa* also blocked the nuclei of germinating conidia in G1 phase and it causes an immediate inhibition of growth (Martegani *et al.*, 1980).

In normal rat kidney cells, this compound (at 3 mM concentration) blocked nuclear division at the G1 stage of mitotic cycle and this effect could be partially prevented by nicotinamide (Fernandez-Pol *et al.*, 1977). In *T. pyriformis* the inhibitory effect (at 1,5 mM concentration) was observed throughout the cell cycle, except in the G0 phase and, the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) added, but not FeCl₂, in the culture medium could revert this effect (Shemarova *et al.*, 2003). These results indicate that picolinic acid can interfere with nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) metabolism or functions. Supporting this, as mentioned, we previously observed an inhibitory effect on growth of trypanosomes of the subgenus *Schyzotrypanum* and this effect could be partially reverted by L-tryptophan and nicotinic acid (Corrêa *et al.*). Nicotinic acid and nicotinamide are supplied in chemically defined medium for trypanosomatid growth (Kidder and Dutta 1958; Roitman *et al.* 1972; Melo *et al.* 1985) and in absence of them, tryptophan can be a source for *de novo* NAD biosynthesis (Nishizuka and Hayaishi, 1963).

Several studies have been reported a role of picolinic acid in immune mechanisms, mainly mediated by macrophage cells. Picolinic acid acts synergistically with IFN- γ in activating macrophages *in vitro* (Varesio *et al.*, 1990; Mellilo *et al.*, 1994) as well *in vivo* conditions (Ruffmann *et al.*, 1984; Blasi *et al.*, 1993).

The activation of macrophages functions by picolinic acid has also been showed for many intracellular microorganisms. Among them, the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene has been related to antifungal activity of macrophages against *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans* (Mucci *et al.*, 2003). On the other hand, the inhibition of *M. avium* growth by picolinic acid is dependent on macrophage apoptosis (Pais and Appelberg, 2000). The mechanism responsible for the reduction of *T. cruzi* amastigotes growth inside of the picolinic acid-activated macrophages is not clear, and further studies are needed to

investigate it. Our results showed the inhibitory activity of picolinic acid on proliferative forms of *T. cruzi*, and this effect is more selective to the parasite, demonstrating its usefulness as alternative or adjuvant drug for the treatment of Chagas disease.

REFERENCES

- Abe, S.; Hu, W.; Ishibashi, H.; Hasumi, K.; Yamaguchi, H. (2004). Augmented inhibition of *Candida albicans* growth by murine neutrophils in the presence of a tryptophan metabolite, picolinic acid. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 10: 181-184.
- Araújo, M.S.S.; Martins-Filho, O.A.; Pereira, M.E.S.; Brener, Z. (2000). A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45: 819- 824.
- Blasi, E.; Mazzolla, R.; Pitzurra, L.; Barluzzi, R.; Bistoni, F. (1993). Protective effect of picolinic acid on mice intracerebrally infected with lethal doses of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 37: 2422-2426.
- Bosco, M.C.; Rapisarda, A.; Massazza, S.; Malillo, G.; Young, H.; Varesio, L. (2000). The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 α and 1 β in macrophages. *The Journal of Immunology*. 164: 3283-3291.
- Cai, S.; Sato, K.; Shimizu, T.; Yamabe, S.; Hiraki, M.; Sano, C.; Tomioka, H. (2006). Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular *Mycobacterium avium* complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57: 85-93.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 6: 93-100.
- Contreras, V.T.; Araujo-Jorge, T.C.; Bonaldo, M.C.; Thomas, N.; Barbosa, H.S.; Meirelles, M.N.S.L.; Goldenberg, S. (1988). Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 83(1): 123-133.
- Corrêa, P.R.C.; Yamada-Ogatta, S.F.; Pinto, A.S.; Souza, J.R.; Silva, G.D.F.; Vieira Filho, S. A.; Duarte, L.P. (Submetido). *In vitro* activity of 2-pyridinecarboxylic acid against trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* from the bat *Phyllostomus hastatus*.
- Coura, J.R.; Castro, S.L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(1): 3-24.
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*. 86:197-283.
- Dutra, W. O.; Rocha, M.O.C.; Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*. 21(12):581-587.
- Evans, G.W.; Jonhson, E.C. (1980). Zinc absorption in rats fed a low-protein diet and a low-protein diet supplemented with tryptophan or picolinic acid. *The Journal of Nutrition*. 110(5):1076-1080.

- Fernandez-Pol, J. A.; Bono, V. H.; Jr.; Johnson, G.S. (1977). Control of growth by picolinic acid: differential response of normal and transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(7): 2889-2893.
- Filardi, L.S.; Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81(5):755-759.
- Fortnagel, P.; Fresse, E. (1968). Inhibition of aconitase by chelation of transition metals causing inhibition of sporulation in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 243: 5289-5295.
- Kohl, L.; Robinson, D.; Bastin, P. (2003). The flagellum: from cell motility to morphogenesis. *Journal de La Société de Biologie*. 197(4): 379-387.
- Kidder, G.W.; Dutta, B.N. (1958). The growth and nutrition of *Crithidia fasciculata*. *Journal of General Microbiology*. 18(3):621-638.
- Lalonde, R.G; Holbein, B.E. (1984). Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 73(2):470-476.
- Lane, J.E.; Bogitsh, B.J.; Ribeiro-Rodrigues, R.; Kral, M.V.; Jones, M.M.; Carter, C.E. (1988). Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Parasitology Research*. 84(5): 399-402.
- Loo, V.G.; Lalonde, R.G. (1984). Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 45(3):726-730.
- Lorenz, M.C.; Fink, G.R. (2002) Life and death in a macrophage: role of a glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell*. 1: 657-662.
- Martegani, E.; Levi, M.; Trezzi, F.; Alberghina, L. (1980). Nuclear division cycle in *Neurospora crassa* hyphae under different growth conditions. *The Journal of Bacteriology*. 142: 268-275.
- Mehler, A.H. (1955). Formation of picolinic and quinolinic acids following enzymatic oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 218(1): 241-259.
- Melillo, G.; Cox, G. W.; Biragyn, A.; Sheffler, L. A.; Varesio, L. (1994). Regulation of nitric-oxide synthase mRNA expression by interferon- γ and picolinic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 8128–8133.
- Melo N.M., De Azevedo H.P., Roitman I., Mayrink W. (1985) A new defined medium for cultivating *Leishmania* promastigotes. *Acta Tropica* 42: 137-141.
- Mucci, A.; Varesio, L.; Neglia, R.; Colombari, B.; Pastorino, S.; Blasi, E. (2003). Antifungal activity of macrophages engineered to produce IFN- γ : inducibility by picolinic acid. *Medical Microbiology and Immunology*. 192: 71-78.

- Nishizuka, Y.; Hayaishi, O. (1963). Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. I. Enzymic synthesis of niacin ribonucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 238: 3369-3377.
- Pais, T.F.; Appelberg, R. (2000). Macrophage control of micobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *The Journal of Immunology*. 164: 389-397.
- Rodrigues, R.R.; Lane, J.E.; Carter, C.E.; Bogitsh, B.J.; Zimmerman, L.J.; Molenda, J.J.; Jones, M.M. (1995). Chelating agent inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 60(4): 277-288.
- Roitman, C.; Roitman, I.; De Azevedo, H.P. (1972). Growth of an insect trypanosomatid at 37 °C in a defined medium. *The Journal of Protozoology*. 19(2): 346-349.
- Ruffmann, R.; Welker, R. D.; Saito, T.; Chirigos, M. A.; Varesio, L. (1984). In vivo activation of macrophages but not natural killer cells by picolinic acid (PLA). *Journal of Immunopharmacology*. 6(4): 291-304.
- Santa-Rita, R.M.; Lira, R.; Barbosa, H.S.; Urbina, J.A.; De Castro, S.L. (2005). Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketaconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55(5): 780-784.
- Schneider, D.R.; Parker, C. (1982). Effect of pyridines on phenotypic properties of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*. 38: 548-553.
- Shemarova, I.V.; Korotkov, A.M.; Nosova, I.Yu. (2003). Study of mechanism of cytostatic effect of picolinic acid on proliferating *Tetrahymena pyriformis* cells. *Doklady Biological Sciences* 391:299-302. Translated from *Doklady Akademii Nauk* 391(2): 276-280.
- Urbina, J.A.; Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 19(11): 495-501.
- Varesio, L.; Clayton, M.; Blasi, E.; Ruffmann, R.; Raadzioch, D. (1990). Picolinic acid, a catabolite of tryptophan, as the second signal in the activation of IFN γ primed macrophages. *The Journal of Immunology*. 145(12): 4265-4271.
- Vaughan, S.; Gull, K. (2003). The trypanosome flagellum. *Journal of Cell Science*. 116(5): 757-759.
- World Health Organization (WHO). (2002). Chagas disease. Tropical disease research In: Eighteenth programme report of UDNPD/World Bank/ WHO Special Programme for research and training in tropical disease research: progress 1995-1996. Geneva: WHO, 122-123.

**ARTIGO B – ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BORNYL BENZOATES AGAINST
TRYPANOSOMA CRUZI EPIMASTIGOTES**

**Paulo Roberto Ceridório Corrêa, Roqueline Miranda, Lucienir Pains-Duarte,
Grácia Divina de Fátima Silva, Sidney Augusto Vieira Filho, Adriana Akemi
Okuma, Fernando Carazza, José Andrés Morgado-Díaz, Lucy Megumi
Yamauchi Lioni, Phileo Pinge-Filho, Celso Vataru Nakamura, Sueli Fumie
Yamada-Ogatta***

* Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788.

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BORNYL BENZOATES AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI* EPIMASTIGOTES

Paulo Roberto Ceridório Corrêa¹, Roqueline Miranda², Lucienir Pains-Duarte²,
Grácia Divina de Fátima Silva², Sidney Augusto Vieira Filho³, Adriana Akemi
Okuma⁴, Fernando Carazza², José Andrés Morgado-Díaz⁵, Lucy Megumi
Yamauchi Lioni¹, Philenno Pinge-Filho⁶, Celso Vataru Nakamura⁷, Sueli Fumie
Yamada-Ogatta^{1*}

Abstract

In this work, the *in vitro* effects of two synthetic 2-bornyl benzoates on growth and ultrastructure of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, were investigated. It was found that both compounds exert an antiproliferative effect on the parasites. The IC₅₀/72 h of **R7** and **R8** were 10.1 µg/mL and 12.8 µg/mL, respectively. Both drugs were more selective to epimastigotes than HEP2 cells. The trypanocidal activities of these compounds were reported here for the first time.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial activity. Bornyl benzoate. Cytotoxicity assay.

Introduction

Trypanosoma cruzi, a heteroxenic trypanosomatid, is the causative agent of Chagas' disease (Chagas, 1909), which actually affects more than 18 million peoples in Latin America (WHO, 2002). Natural transmission to humans occurs through contact with excretas containing metacyclic trypomastigotes of hematophagous reduviid insect of the subfamily Triatominae. Although vector control programs have been established in several countries, new species of triatominae

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, CEP 86051-990, Brazil. Corresponding author. Tel: +55-43-3371-4297; fax: +55-43-3371-4788. *E-mail address*: ogatta@uel.br (S.F. Yamada-Ogatta)

² NEPLAM – Departamento de Química, ICEX, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³ DEFAR, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

⁴ CEFET, Araxá, Minas Gerais, Brazil

⁵ Grupo de Biologia estrutural, Divisão de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁷ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

bugs infected with *T. cruzi* as well as its human environmental invasion and consequent establishment of peridomestic and domestic colonies have been reported in areas not yet controlled (Coura and Castro, 2002; Garcia *et al.*, 2005). This adaptation process represents a constant *T. cruzi* infection risk and Chagas' disease incidence expansion. Furthermore the parasite also can be transmitted by blood transfusion, congenital pathway, or more rarely by organ transplantation, contaminated food or laboratory accidents.

Chagas' disease is characterized by large clinical manifestation spectra ranging from the absence of infection symptoms, to severe chronic disease, involving cardiovascular or gastrointestinal pathologies (Prata, 2001). One of the great Chagas' disease problems is associated to unsatisfactory efficacy of the available therapeutic drugs nifurtimox and benznidazole. These drugs induce serious collateral effects and show limited efficacy during the Chagas' disease chronic phase (Urbina and Docampo, 2003). For the other side, the existence of strains naturally resistant to both nifurtimox and benznidazole contributes to the treatment success failure (Filardi and Brener, 1987; Toledo *et al.*, 1997). Therefore, this scenario indicates that the availability of safer and cheaper new drugs is urgent.

In according to the World Health Organization (WHO), the ideal drug for Chagas' disease treatment should provide the parasitological cure of acute and chronic phases with acceptable or no collateral effects, no drug resistance induction, good efficacy with a single or few doses, low acquisition cost and no hospitalization necessity for the treatment. Despite of the economic and social importance of Chagas' disease, until this moment there are no introduction perspectives by pharmaceutical industries, of a new compounds or vaccines against *T. cruzi*. In this context, several natural compounds obtained from medicinal plants have been showed activity against *T. cruzi* and lower toxicity to the mammalian cells, that represents a great potential for the development of a new drugs adequate for the Chagas' disease treatment (Araya *et al.*, 2003; Luize *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2006). Borneol is a monoterpene-saturated alcohol commonly isolated from plants of different genera (Sokmen *et al.*, 2004; Uzel *et al.*, 2004; Orav *et al.*, 2006; Wenqiang *et al.*, 2006).

Borneol can also be produced by the reduction reaction of camphor. In many Asian regions, camphor is commonly used in traditional medicine for analgesia and anesthesia. In addition, inhibitory effects on mice's bone resorption

(Muhlbauer *et al.*, 2003) and on microtubule depolymerization (Klar *et al.*, 1998) have been attributed for this compound.

Despite several terpenoid compounds have been demonstrated inhibitory activity against *T. cruzi* (Kiuchi *et al.*, 2002; Uchiyama *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 2003; Saeidnia *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2006), until this moment borneol and its derivatives have not assayed against *T. cruzi*. This work presents the antimicrobial activity evaluation of the synthetic borneol derivatives: **R7** and **R8**, against epimastigote forms of *T. cruzi*. The ultrastructural changes of epimastigotes and the cytotoxicity caused by **R7** and **R8** to mammalian cells were also analyzed.

Material and methods

Preparation of solutions

The bornyl benzoates compounds were synthesized at the Núcleo de Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAM), Departamento de Química, ICEX, of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Stock solutions (10.0 mg/mL) of **R7** or **R8** were prepared in 10% DMSO (v/v). These solutions were sterilized by filtration (0.22 µm, Millipore, Brazil) and added aseptically only once to growth medium at determined concentrations.

Microorganism

T. cruzi Dm28c epimastigotes (Contreras *et al.*, 1988) were maintained by weekly transfer in liver infusion tryptose (LIT) medium (Camargo, 1964), at 28 °C.

Antitrypanosomal activity

Epimastigotes of *T. cruzi* Dm28c clone in logarithmic growth phase (5×10^5 cells) were added to 18 x 180 mm screw-capped tubes containing 2 ml of growth medium containing R7 or R8 (5, 10, 50 or 100 µg/ml). The cultures were incubated at 28 °C, and the cell growth was estimated by direct counting in a hemocytometer (Improved Double Neubauer) at 48, 72 and 144 h. Tubes containing

medium alone and medium plus 1% DMSO were used as growth and sterility controls.

Citotoxicity assay

HEp-2 cells (human larynx carcinoma, ATCC, CCL-23) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphoterecin B and 5% CO₂ at 37 °C. The cell line was cultured into 96 wells culture plate at a density of 1 x 10⁵ cells/well, and incubated during 24 h. At confluence, non-adherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of R7 or R8 (1.95; 3.9; 15.62; 31.25; 125; 500 or 1000 µg/mL) was respectively added to each well containing the cells, and the plates were incubated during 48 h.

The cell viability was determined by the MTT [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA)] method according to the manufacture's recommendation. The compound concentration needed to inhibit the viable cells up to 50% after 96 h was observed by regression analysis, correspond to 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), and the selectivity index (SI) were calculated using the equation: $SI = CC_{50}/MIC_{50}$. The toxicity for HEp-2 cells and the inhibitory activity against *T. cruzi* were compared by using the selectivity index (SI), where a value greater than 1 is considered more selective for activity against the parasite.

Transmission electron microscopy

T. cruzi Dm28c epimastigote forms treated with IC₅₀ of R7 and R8 were fixed during 2 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. Post-fixation was carried out in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 0.8% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl₂ during 1 h at room temperature. The cells were dehydrated in acetone and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a Zeiss CEM-900 electron microscope.

Statistical analysis

The results were evaluated by Tukey-Kramer using the software Statistic for Windows, version 6.0 (Statsoft, Inc., Oklahoma city, Okla., USA). A *P* values less than 0.05 were considered significant.

Results and discussion

The development of microbial resistance to commercially available drugs is a widespread problem associated to *T. cruzi* and other human pathogenic microorganisms treatments. In function of this resistance, the search of new compounds with potential properties for its use in infections therapy has been stimulated. The use of plant materials for microbial infections treatments is cosmopolitan since ancient time. The chemical structure and biological activity of the natural products mainly those related to *T. cruzi* treatments have been gradually studied by many researchers (Luize *et al.*, 2006). Then, natural products have been served as building blocks or scaffolds in the synthesis of the active analogues. The synthesis of more active molecules in laboratory conditions are involved in combinatorial strategies in order to obtain a potent antimicrobial derivative without collateral effects to the host and with low cost of large-scale production (Nielsen, 2002).

Terpenoids comprise a large class of natural products that are used as commercial flavor, fragrance compounds and as drug for different diseases treatments. Recently, the biological activities of terpenoids obtained from plants have been extensively reported in the literature including the antimicrobial effect against *T. cruzi* (Kiuchi *et al.*, 2002; Uchiyama *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 2003; Saeidnia *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2006).

This study demonstrates for the first time the biological activity of 2-bornyl benzoate derivatives (**R7** and **R8**) against epimastigotes forms of *T. cruzi* Dm 28c. The *in vitro* effects of compounds R7 and R8 against epimastigote form are showed in Figure 1. Dose-dependent antiprotozoan effect was observed for both compounds. R7 at 100 µg/mL inhibited more than 98% of the parasites growth after 72 h of incubation. At the same concentration, R8 completely inhibited epimastigote proliferation. The IC₅₀/72 h (50% inhibitory concentration after 72 h of incubation)

calculated for R7 and R8 were 10.1 and 12.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The addition of 1% DMSO in the culture did not interfere in the parasite growth pattern.

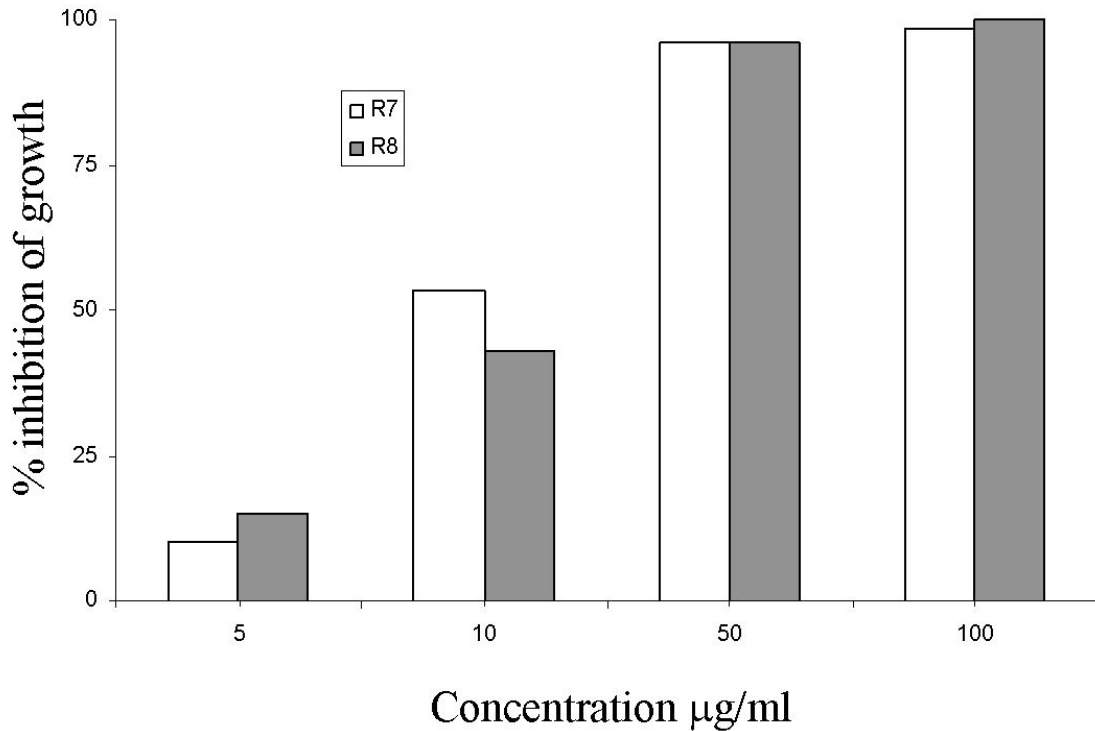


Figure 1 – Percentage of growth inhibition provoked by R7 and R8 on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* in LIT medium at 28 °C after 72h incubation.

Few reports related to the antimicrobial activity of borneol are available. The antimicrobial activity (Candan *et al.*, 2003; Sokmen *et al.*, 2004; Wenqiang *et al.*, 2006), and antioxidant property (Candan *et al.*, 2003, Sokmen *et al.*, 2004) of borneol have been related to the essential oil containing this compound. The isolated compound isoborneol, a stereoisomer of borneol extracted from *Salvia fruticosa* showed virucidal activity against herpes simplex virus type 1 (Armaka *et al.*, 1999). In addition, the bornyl piperate isolated from *Piper aff. Pedicellatum* presented inhibitory activity on *Mycobacterium tuberculosis* (Rukachaisirikul *et al.*, 2004). On the other hand, Kiuchi *et al.*, (2002) showed the inhibitory activity of four monoterpene hydroperoxides against epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*. The substitution of the hydroperoxide radicals by hydrogen, to obtain the corresponding alcohol derivatives, abolished these effects.

The 50% citotoxic concentration for HEp-2 line cells after 96 h of incubation ($CC_{50}/96h$) were 689.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 643.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for R7 and R8, respectively (Figure 2). The SIs of R7 (68.3) and R8 (50.3) indicate that these two 2-borneol derivatives are more selective against the *T. cruzi* epimastigotes than the mammalian cells.

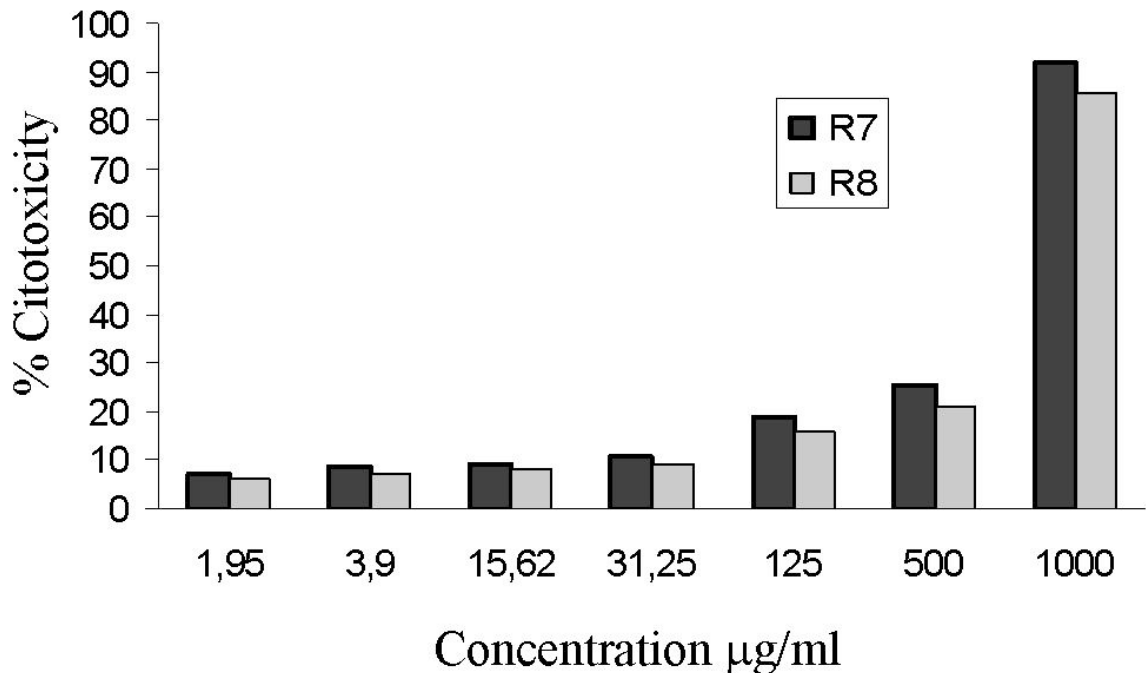


Figure 2 – Effect of R7 and R8 on HEp-2 cell line. The cell viability was determined by the MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide).

The epimastigotes treated with R7 at $IC_{50}/72h$ corresponding concentration were analysed by transmission electron microscopy. The results showed multiple cytoplasm vacuolization and the presence of myelin-like figures (Figure 3). Some of the vacuoles in the R7 treated cells appeared to contain cytoplasmic components [Figure 3 (d) e (e), asterisk]. Interestingly, a cellular aggregation with possible parasites' membrane fusion was also observed after R7 treatment [Figure 3 (c) e (e), black arrow]. Similar ultrastructural alterations induced by R8 are observed. R8 treated cells also displayed altered shape, great vacuoles and myelin-like figures (Figure 4). The cellular aggregation was not observed after R8 treatment.

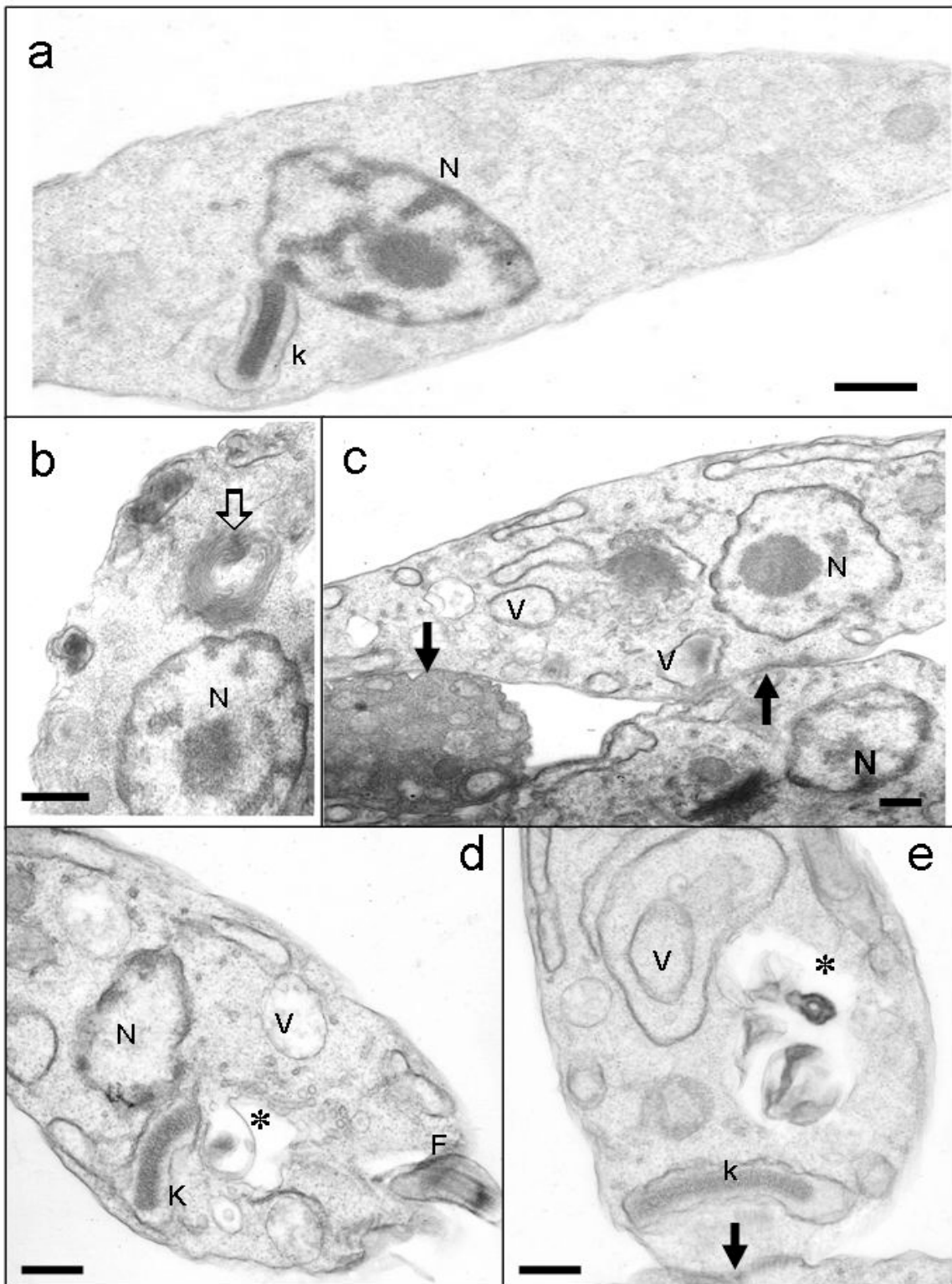


Figure 3 – Electron micrographs showing morphological features after R7 treatment. Epimastigotes of *T. cruzi* were incubated in LIT medium containing 10.1 $\mu\text{g/ml}$ of R7 during 72 h. (a) Untreated cell with normal morphology showing the nucleus (N) and kinetoplast (k). (b-d) R7-treated cell: note the myelin-like figures inside of cytoplasm (arrow); vacuoles (v); vacuoles containing cytoplasmic material (asterisk). The filled arrows show a membrane aggregation. Scale bar, 1 μm .

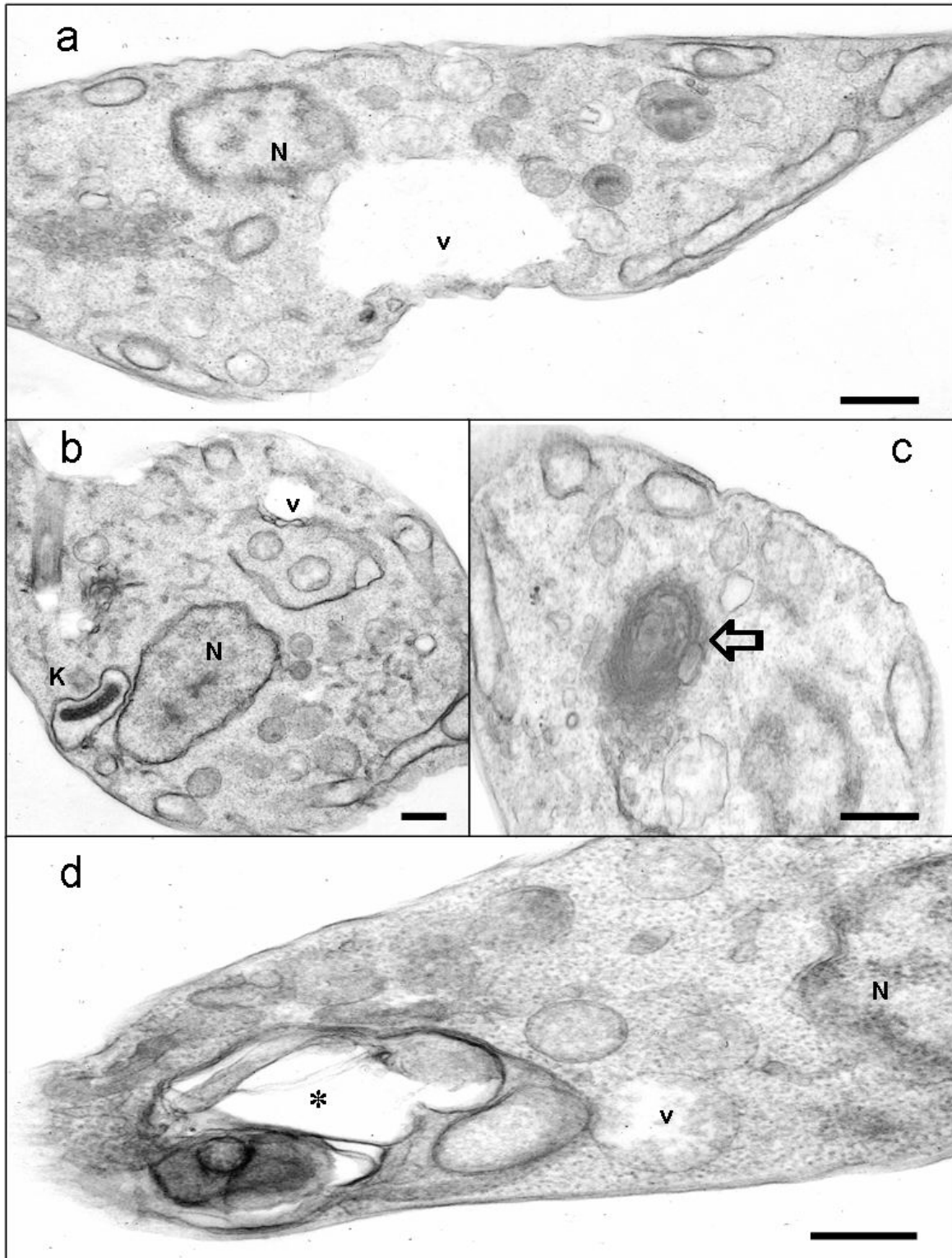


Figure 4 – Electron micrographs showing morphological features after R8 treatment. Epimastigote of *T. cruzi* were incubated in LIT medium containing 12.8 μg/ml of R8 during 72 h. (a-d) R8-Treated cell: observe the presence of vacuoles (v); myelinlike figure inside of the cytoplasm (arrow); and vacuoles containing cytoplasmic material (asterisk). Nucleus (N) and kinetoplast (k). Scale bar, 1 μm.

The mechanisms which both compounds affect the parasites growth are unclear. The comparison of R7 and R8 solubility shows that R8 is more non polar, therefore more fat-soluble than R7. The presence of methoxy group in 3', 4' and 5' benzoyl ring position became R7 more adequate to be submitted to phase I and phase II metabolic reactions. This conditions may explain the difference observed in R7-treated epimastigotes in relation to its effect on plasma membrane.

Programmed cell death is a conserved mechanism that has evolved to regulate the growth and development in multicellular organisms as well to protect them against several microbial infections and the emergence of cancer (Bursch, 2004). However, some unicellular organisms, including trypanosomatids, have evolved an active self-destruction pathway analogous to those in metazoans (Welburn *et al.*, 1997; Debrabant and Nakashi, 2003). Overall, the apoptosis cell death is characterized by intranucleolar fragmentation associated with cytoplasmic condensation, but preservation of organelles. On the other hand, autophagic cell death exhibits extensive degradation of cytoplasmic components, and limited damage to nucleus and mitochondria. One the first visible ultrastructural changes is the formation of autophagic vacuoles, which gradually degrade the cytoplasmic content.

Although the prominent cytoplasmic alterations were observed in R7 and R8 treated parasites, the nuclear morphology was well preserved and there was no evidence of mitochondrial swelling. In addition, the presence of cytoplasmic materials in some vacuoles suggested that they may be derived from autophagosomes. These alterations are compatible to those observed during the autophagic cell death mechanism. Further studies are warranted to understand the effects provoked by the treatment with both compounds and such investigations are currently underway in our laboratory.

Acknowledgements:

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

REFERENCES

- Araya, J.E.; Neira, I.; Silva, S.; Mortara, R.; Manque, P.; Cordero, E.; Sagua, H.; Loyola, A.; Borquez, J.; Morales, G.; Gonzáles, J. (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(3): 413-418.
- Armaka, M.; Papanikolau, A.; Sivropoulou, A.; Arsenakis, M. (1999). Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex vírus type 1. *Antiviral Research*. 43: 79-92.
- Bursch, W. (2004). Multiple Cell Death Programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Research*. 5: 101-110.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 6: 93-100.
- Candan, F.; Unlu, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sokmen, A.; Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* sub sp *millefolium* Afan. *Journal of Ethnopharmacology* 87(2-3): 215-220.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotripanum cruzi*; n. gen., n.. Sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1: 1-59.
- Coura, J.R.; Castro, S.L. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97(1): 3-24.
- Contreras, V.T.; Araujo-Jorge, T.C.; Bonaldo, M.C.; Thomas, N.; Barbosa, H.S.; Meirelles, M.N.S.L.; Goldenberg, S. (1988). Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 83(1): 123-133.
- Debrabant, A.; Nakashi, H. (2003). Kinetoplastid biology and disease programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2:7. doi: 10.1186/1475-9292-2-7.
- Filardi, L.S.; Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81(5): 755-759.
- Garcia, S.; Ramos, A.O.; Senra, J.F.V.; Vilas-Boas, F.; Rodrigues, M.M.; Carvalho, A.C.; Santos, R.; Soares, M.B.P. (2005). treatment with benznidazole during the chronic phase experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 49(4):1521-1528.
- Gonzalez, P.; Marin, C.; Rodriguez-Gonzales, I.; Illana, A.; Mateo, H.; Longoni, S.S. (2006). Diterpenoid alkaloid derivates as potential chemotherapeutic agents in American trypanosomiasis. *Pharmacology*. 76(3): 123-128.

Kiuchi, F.; Itano, Y.; Uchiyama, N.; Honda, G.; Tsubouchi, A.; Nakajima-Shimada, J.; Aoki, T. (2002). Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *The Journal of Natural Products* 65: 509-512.

Klar, U.; Graf, O.; Schenk, O.; Rohr, B.; Schulz, H. (1998). New synthetic inhibitors of microtubule depolymerization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 8(11): 1397-1402.

Leite, A.P.V.; Oliveira, A.b.; Lombardia, J.A.; Filho, J.D.S.; Chiara, E. (2006). Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(11): 2307-2309.

Luize, P.S.; Nakamura, T.U.; 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*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(10): 2126-2130.

Muhlbauer, R.C.; Lozano, A.; Palácio, S.; Reinli, A.; Felix, R. (2003). Common herbs essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone*. 32(4): 372-380.

Nielsen, J. (2002). Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6: 297-305.

Orav, A.; Arak, E.; Raal, A. (2006). Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L from various European countries. *Natural Product Research*. 20(12): 1082-1088.

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Disease*. 1: 92-100.

Rukachaisirikul, T.; Prabpai, S.; Kongsaree, P.; Suksamrarn, A. (2004). (+)-Bornyl piperate, a new monoterpene ester from *Piper aff. pedicellatum* roots. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52(6): 760-761.

Saeidnia, S.; Gohari, A.R.; Uchiyama, N.; Ito, M.; Honda, G.; Kiuchi, F. (2004). Two new monoterpene glycosides and trypanocidal terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 52(10): 1249-1250.

Sanchez, A.M.; Jimenez-Ortiz, V.; Sartor, T.; Tonn, C.E.; García, E.E.; Nieto, M.; Burgos, M.H.; Sosa, M. (2006). A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 98: 118-124.

Sokmen, A.; Sokmen, M.; Daferara, D.; Polissiou, M.; Candan, F.; Unlu, M.; Akpulat, H.A. (2004). The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan (Asteraceae). *Phytotherapy Research:PTR*. 18(6): 451-456.

Toledo, M.J.O.; Kuhl, J.B.; Silva, S.V.; Gasperi, M.V.; Araujo, M. (1997). Estudos sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, sul do Brasil. Resultados preliminares. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30(3):197-203.

Uchiyama, N.; Matsunaga, K.; Fumiya, K.; Honda, G.; Tsubouchi, A.; Nakajima-Shimada, J.; Aoki, T. (2002). Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 50(11): 1514-1516.

Urbina, J.A.; Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 19(11): 495-501.

Uzel, A.; Guvensen, A.; Cetin, E. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopada* O Schwarz from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. 95(2-3):151-154.

Welburn, S.C.; Barcinski, H.A.; Williams, G.T. (1997). Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitology Today*. 13(1): 22-26.

Wenqiang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Yanfeng, H. (2006). Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*. 20(11): 992-998.

World Health Organization (WHO). (2002). Chagas disease. Tropical disease research In: Eighteenth programme report of UDNP/World Bank/ WHO Special Programme for research and training in tropical disease research: progress 1995-1996. Geneva: WHO, 122-123.