



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÁDER ALMEIDA CANUTO

Efeito da violaceína sobre formas evolutivas de
Trypanosoma cruzi

FORTALEZA

2016

JÁDER ALMEIDA CANUTO

Efeito da violaceína sobre formas evolutivas de
Trypanosoma cruzi

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C235e Canuto, Jáder Almeida.
Efeito da violaceína sobre formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* / Jáder Almeida Canuto. –
2016.
78 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia
e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. *Chromobacterium*.

CDD 616.9363016

JÁDER ALMEIDA CANUTO

EFEITO TRIPANOCIDA DA VIOLACEÍNA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a Érika Helena Salles de Brito (Examinadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Examinadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

**Dedico essa dissertação a Deus, pela
força e coragem que me deu para superar todos os obstáculos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai e Criador, pelo dom da vida, pela família maravilhosa, pelo Seu chamado em minha vida e a graça da conquista, desde o vestibular, do grande sonho de ser farmacêutico, e agora mestre.

Aos meus pais, por todo o apoio, estímulo e dedicação incondicional. Não seria nada sem vocês e esta conquista não é só minha, mas nossa.

Ao meu irmão Eliseu, por todo o apoio dado antes e durante a graduação. Você será sempre um exemplo para mim.

À minha noiva Isabela, por toda vez que, durante estes anos, me apoiou, alegrou, levantou, incentivou, aceitou minhas ausências para que este trabalho pudesse nascer e me mostrou o verdadeiro sentido da vida.

Aos demais membros da família: Vô Antônio, Vó Ismá, Tio Artur, Tia Branca, Tia Lúcia, Tia Lucilene, Tio Miguel, Tia Edite, Tio Ivan, Tia Socorro, Tio Mendes e Tia Mazé, por todo o incentivo e por todas as vezes que através de pedidos de diagnósticos, indicações de medicamentos, tradução de receitas e outras orientações relativas à saúde, me obrigaram a estudar e a me tornar um profissional melhor.

À D. Maria José e Sr. Vicente, pelo constante incentivo e torcida durante este período de minha vida.

À Professora Dr^a. Alice Maria Costa Martins, por toda a confiança que depositou em mim, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e constantes estímulos, mesmo quando tudo ia mal. Foi com a senhora que pude aprender e me descobrir dentro da área da pesquisa

À Professora Dr^a. Maria de Fátima Oliveira, por ser, desde o início da graduação, uma verdadeira mãe para mim dentro da universidade, sempre me ajudando, confiando e estimulando ao crescimento.

À Professora Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira por todo o ensinamento nas disciplinas, por ter tão gentilmente cedido a violaceína, que deu origem a este trabalho, e aceitado o convite para a banca.

À Professora Dr^a Érika Helena Salles de Brito, por ter gentilmente aceitado o convite para a banca examinadora.

À Comunidade Católica Lírio da Trindade, por ser minha segunda família e estar sempre me ajudando e impulsionando a trilhar o verdadeiro caminho que leva à felicidade: Jesus Cristo.

A meus irmãos e ovelhas no ministério de música da comunidade: Ana Cristina, Angélica, Expedito, Karine, Dayane, Luan e Walber. Pela constante ajuda e compreensão nas minhas ausências.

Aos amigos do Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT): Ramon Róseo, Clarissa Perdigão, Izabel Cristina, Dânya Bandeira, Gdaylon Cavalcante, Tiago Sampaio, Lívia Fernandes, Gabriela Freire, Paloma Leão, Marcus Felipe, Louise Donadello, Kamilla Cavalcante, Isabela Evelyn e Raíssa pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos, e acima de tudo, pela amizade construída ao longo desses anos.

**“[...]Sou agradecido àquele que me deu forças,
Cristo Jesus, nosso Senhor,
pela confiança que teve em mim,
colocando-me a seu serviço [...]”**

1 Timóteo 1, 12

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 7 a 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* no mundo. O tratamento da doença de Chagas apresenta eficácia limitada e efeitos colaterais que limitam a tolerabilidade e a adesão dos pacientes. A busca de novas alternativas terapêuticas a partir de substâncias bioativas cresceu bastante nos últimos anos. A violaceína (VIO), um pigmento bacteriano produzido por *Chromobacterium violaceum* tem mostrado diversas ações biológicas, dentre elas, ações antiulcerogênica, antitumoral, antiviral e antiparasitária. No presente trabalho, estudamos os efeitos da VIO sobre as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT, a 28°C, na presença de VIO (0,97; 1,9; 3,9; 7,8; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000µM) por 24, 48 e 72h. As formas tripomastigotas, foram obtidas após infecção em células LLC-MK2, ressuspensas em meio DMEM 2% de SBF e incubadas com VIO (0,97; 1,9; 3,9; 7,8; 15,62; 31,25µM) por 24h. Formas amastigotas foram cultivadas em lamínulas circulares no interior de placas de cultura contendo células LLC-MK2 e tratadas com violaceína (4,97 e 9,94 µM). A citotoxicidade sobre células de mamíferos LLC-MK2 foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT, após incubação com VIO (3,9; 7,8; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500µM) por 24h. A avaliação do processo de morte celular foi feita a partir da marcação de formas epimastigotas com 7AAD e Anexina V-PE após tratamento com VIO (51,39 e 102,78µM). Para a determinação da produção de espécies reativas de oxigênio, formas epimastigotas foram incubadas com VIO (51,39 e 102,78µM). Na determinação do efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o marcador Rodamina 123 em formas epimastigotas tratadas com VIO (102,78µM). Em formas epimastigotas, a substância demonstrou ação tripanocida, com valor de CI_{50} igual a 51,39; 104,7 e 67,78µM em 24, 48 e 72h de tratamento, respectivamente. Em formas tripomastigotas, a CI_{50} foi de 4,97µM em 24h. A análise sobre formas amastigotas reduziu o percentual de células infectadas e o índice de sobrevivência destes, nos tempos de 24 e 48h, nas concentrações de 4,97 e 9,94 µM. Na determinação do efeito citotóxico sobre LLC-MK2, obteve-se uma CI_{50} de 47,91µM. A análise dos mecanismos de morte celular permitiu inferir que a VIO causa morte nos parasitos predominantemente por apoptose. Foi observado a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem contribuir para o tipo de morte supracitado. Foi ainda observada a redução do potencial de membrana mitocondrial nos grupos tratados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Para comparação dos grupos experimentais, foi utilizado o teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Dunnet, utilizando $p < 0,05$ como critério de significância. Dessa forma, a VIO apresentou efeitos tripanocida em todas as formas do ciclo evolutivo do parasito, sugerindo envolvimento de espécies reativas de oxigênio e alterações no potencial de membrana mitocondrial no processo de morte celular por apoptose.

Palavras-Chave: Violaceína; *Trypanosoma cruzi*; *Chromobacterium*;

ABSTRACT

The World Health Organization estimates that approximately 7 to 8 million individuals are infected with *Trypanosoma cruzi* worldwide. The treatment of Chagas disease has limited efficacy and side effects that limit patient tolerability and compliance. The search for new therapeutic alternatives based on bioactive substances has increased significantly in recent years. Violacein (VIO), a bacterial pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, has shown several biological actions and among them, antiulcer, antitumor, antiviral, and antiparasitic action. In this study, we assessed the effects of VIO on the evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotes were cultured in liver infusion tryptose (LIT) medium at 28 °C in the presence of VIO (0.97; 1.9; 3.9; 7.8; 15.62; 31.25; 62.5; 125; 250 ; 500; 1000µM) for 24, 48 and 72 hours. Trypomastigotes were obtained after infection in LLC-MK2 cells resuspended in 2% DMEM medium of FBS and incubated with VIO (0.97; 1.9; 3.9; 7.8; 15.62; 31.25µM) for 24h. Amastigotes were cultured on circular glass slides within culture plates containing LLC-MK2 cells and treated with violacein (4.97 and 9.94 µM). Cytotoxicity on LLC-MK2 mammalian cells was assessed using the MTT reduction assay, after incubation with VIO (3.9; 7.8; 15.62; 31.25; 62.5; 125; 250; 500µM) for 24h. The cell death process assessment was performed by marking epimastigotes with 7AAD and Annexin V-PE after treatment with VIO (51.39 and 102.78µM). To determine the production of reactive oxygen species, epimastigotes were incubated with VIO (51.39 and 102.78µM). Rhodamine 123 marker was used to determine the effect on the mitochondrial membrane potential in epimastigotes treated with VIO (102.78µM). In epimastigotes, the substance showed trypanocidal action, with an IC₅₀ value of 51.39; 104.7 and 67.78µM at 24, 48 and 72h of treatment, respectively. In trypomastigotes, IC₅₀ was 4.97µM at 24 hours. The analysis of amastigotes reduced the percentage of infected cells and their survival rates at 24 and 48 hours, at concentrations of 4.97 and 9.94 uM, respectively. When determining the cytotoxic effect on LLC-MK2 cells, an IC₅₀ of 47.91µM was obtained. The analysis of cell death mechanisms allowed inferring that VIO causes parasite death predominantly by apoptosis. The production of reactive oxygen species (ROS) was observed, which can contribute to the aforementioned type of death. Mitochondrial membrane potential reduction was also observed in the treated groups. All experiments were performed in triplicate (n = 3). For comparison of the experimental groups, the ANOVA test was used with Dunnett's post-test, using p <0.05 as significance criterion. Thus, VIO showed trypanocidal effects on all forms of the parasite evolutionary cycle, suggesting the involvement of reactive oxygen species and changes in mitochondrial membrane potential in the process of cell death by apoptosis.

Key words: Violacein; *Trypanosoma cruzi*; Chromobacterium;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição Global de casos de doença de Chagas, baseado em estimativas, 2006-2010.	19
Figura 2.	Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica Legal, 2005 a 2013.	20
Figura 3.	Desenhos esquemáticos das formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	23
Figura 4.	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
Figura 5.	Evolução funcional do megaesôfago chagásico.	25
Figura 6.	Estrutura química da violaceína (C ₂₀ H ₁₃ O ₃ N ₃).	27
Figura 7.	Efeito de VIO sobre a viabilidade de formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	43/44
Figura 8.	Efeito citotóxico de VIO sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 9.	Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito de VIO sobre formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i> após 06 horas de incubação.	47
Figura 10.	Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito de VIO sobre formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i> após 06 horas de incubação.	48
Figura 11.	Efeito de VIO sobre a viabilidade de células LLC-MK2	50
Figura 12.	Percentual de células infectadas por amastigotas após 24 e 48h de incubação com violaceína.	52
Figura 13.	Índice de sobrevivência de amastigotas após tratamento com violaceína.	52

- Figura 14.** Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas após tratamento ou não com violaceína. 53
- Figura 15.** Histograma da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). 54
- Figura 16.** Análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas por citometria de fluxo. 55
- Figura 17.** Histograma do potencial de membrana mitocondrial. 56
- Figura 18.** Análise do potencial de membrana em epimastigotas por citometria de fluxo. 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, 22
Unidade da Federação de residência e forma de transmissão.
Brasil, 2000 a 2013.
- Tabela 2.** Percentuais de viabilidade celular das formas epimastigotas 45
tratados com VIO após 24, 48 e 72 horas de incubação.
- Tabela 3.** Percentuais de inibição de crescimento das formas tripomastigotas 46
tratados com VIO após 24 horas de incubação.
- Tabela 4.** Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito de VIO 49
sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T.cruzi* após 06 horas de
incubação.
- Tabela 5.** Viabilidade celular de células LLC-MK2 tratadas com VIO, após 51
incubação por 24h.

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD	7-Aminoactinomicina D
AX V-PE	Anexina V- Ficoeritrina
CI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos.
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FL	Emissão de Fluorescência
IS	Índice de Sobrevivência
LAFIPLAN 1	Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará
Rh-123	Rodamina 123
SBF	Soro Bovino Fetal
SI	Índice de Seletividade
VIO	Violaceína

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	Histórico da doença de Chagas	17
1.2	Epidemiologia da doença de Chagas	18
1.3	Vias de Transmissão	20
<i>1.3.1</i>	<i>Via Vetorial</i>	<i>20</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Transfusão Sanguínea</i>	<i>21</i>
<i>1.3.3</i>	<i>Transmissão por via oral</i>	<i>21</i>
<i>1.3.4</i>	<i>Outras vias de transmissão</i>	<i>22</i>
1.4	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.5	Evolução Clínica da doença de Chagas	24
1.6	Tratamento farmacológico da doença de Chagas	25
1.7	Violaceína	26
<i>1.7.1</i>	<i>Características gerais</i>	<i>26</i>
2.	JUSTIFICATIVA	31
3.	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35

4.1	Obtenção da substância em estudo e preparo das soluções de trabalho.	35
4.2	Ensaio antiparasitários	35
4.2.1	Cultivo de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	35
4.2.2	Efeito citotóxico de VIO sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	35
4.2.3	Cultivo de formas tripomastigotas	35
4.2.4	Efeito citotóxico sobre as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	36
4.3	Cultivo de células LLC-MK2	36
4.3.1	Avaliação da toxicidade de VIO em células LLC-MK2	37
4.3.2	Teste de redução do MTT	37
4.4	Avaliação do efeito de violaceína sobre formas amastigotas.	38
4.5	Efeito de VIO sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	38
4.6	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas.	39
4.7	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.	40
4.8	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS	43
5.1	Efeito citotóxico de violaceína sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
5.2	Efeito citotóxico de violaceína sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45

5.3	Efeito de violaceína sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
5.4	Efeito de violaceína sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em células LLC-MK2 através de citometria de fluxo.	49
5.5	Avaliação da citotoxicidade de violaceína sobre as células de mamíferos LLC-MK2	51
5.6	Avaliação do efeito de violaceína formas amastigotas	54
5.7	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas.	55
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da doença de Chagas

Em 1909, o médico sanitarista e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, nascido na cidade de Oliveira, Minas Gerais – Brasil, foi o responsável pela descoberta da doença de Chagas. Tal descoberta incluiu não apenas o agente etiológico da patologia (*Trypanosoma cruzi*), mas também o vetor, responsável pela disseminação, e a evolução clínica da doença (CHAGAS, 1909; LEWINSOHN, 1981; MALAFAIA, 2010).

Ainda na pré-história, a doença era classificada como uma enzoose, afetando apenas os mamíferos selvagens, tais como morcegos, tatus, marsupiais, coelhos e lebres. Entretanto, com o advento da agricultura, desmatamento, abertura de vias terrestres e domesticação de animais, os triatomíneos (vetores da doença) se inseriram no ambiente peridoméstico e o ser humano passou a ser acometido pelo *T. cruzi*. Sendo hoje classificada como uma zoonose (COURA, 2015; COURA & VIÑAS, 2010). Aufderheide, *et al.*, 2004, identificaram o DNA de *T. cruzi* em múmias pertencentes à cultura Chinchorro, retiradas de sítios arqueológicos localizados ao norte do Chile e ao sul do Peru com datações de até 9000 anos. Assim, evidenciando a inserção gradativa do homem no ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*.

1.2 Epidemiologia da doença de Chagas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas faz parte do grupo de 17 doenças denominadas como Doenças Tropicais Negligenciáveis, as quais prejudicam o desenvolvimento sócio econômico das populações pobres (WHO, 2014).

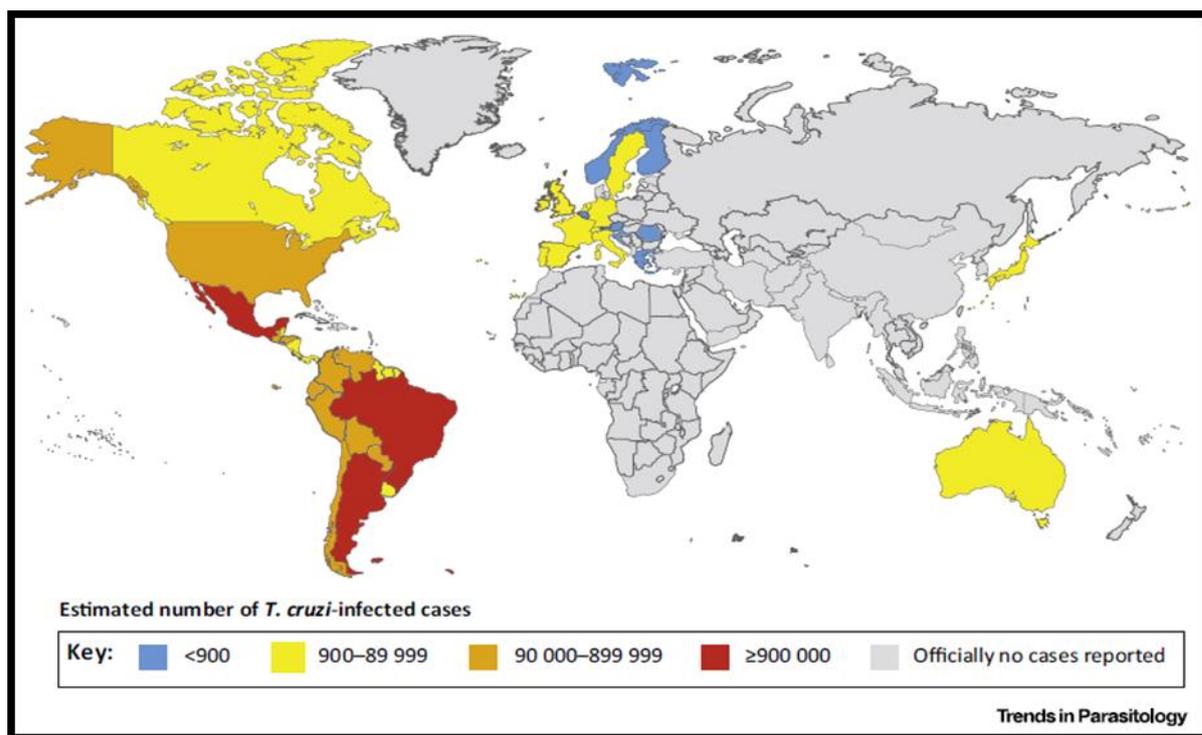
Em 2010, o Ministério da Saúde considerou, no Brasil, sete doenças negligenciadas como prioridade, tendo como base, dados demográficos, epidemiológicos e o impacto da doença na população. São essas: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose. Ainda segundo a Organização Mundial de Saúde

(OMS), um sexto da população mundial encontra-se infectado com uma ou mais doenças negligenciadas, sendo um montante de mais de um bilhão de pessoas (BRASIL, 2010; WHO, 2015).

Segundo dados de 2014, entre sete a oito milhões de indivíduos estão infectados pelo *T. cruzi* no mundo (WHO, 2014) e, aproximadamente 80 milhões de pessoas estão em áreas com risco de infecção (COURA & DIAS 2009). O aumento no número de casos registrados no mundo e a presença da doença de Chagas em países da Europa, Estados Unidos, Canadá e Japão, tem gerado grande preocupação aos setores de saúde pública (GASCON *et al.*, 2010). A prevalência em tais países depende, principalmente, da proporção de imigrantes provenientes das áreas endêmicas, bem como do país de origem desses indivíduos (ORTÍ-LUCAS *et al.*, 2014). Nos Estados Unidos, se encontra o maior número de casos da doença fora da América Latina, com cerca de 300.000 indivíduos portadores crônicos. Tal número está relacionado ao grande contingente de imigrantes que o País recebe, principalmente do México (BERN E MONTGOMERY, 2009).

A doença gera ainda, nos países acometidos, elevados gastos na Saúde Pública. Somente no ano de 2008, na Colômbia, o custo de cuidados médicos para os pacientes com doença de Chagas girou em torno de 267 milhões de dólares. Havendo ainda, diversos custos, como aqueles relacionados ao controle de vetores, que representaram cerca de 5 milhões de dólares (WHO, 2014).

Figura 1: Distribuição Global de casos de doença de Chagas, baseado em estimativas, 2006-2010.

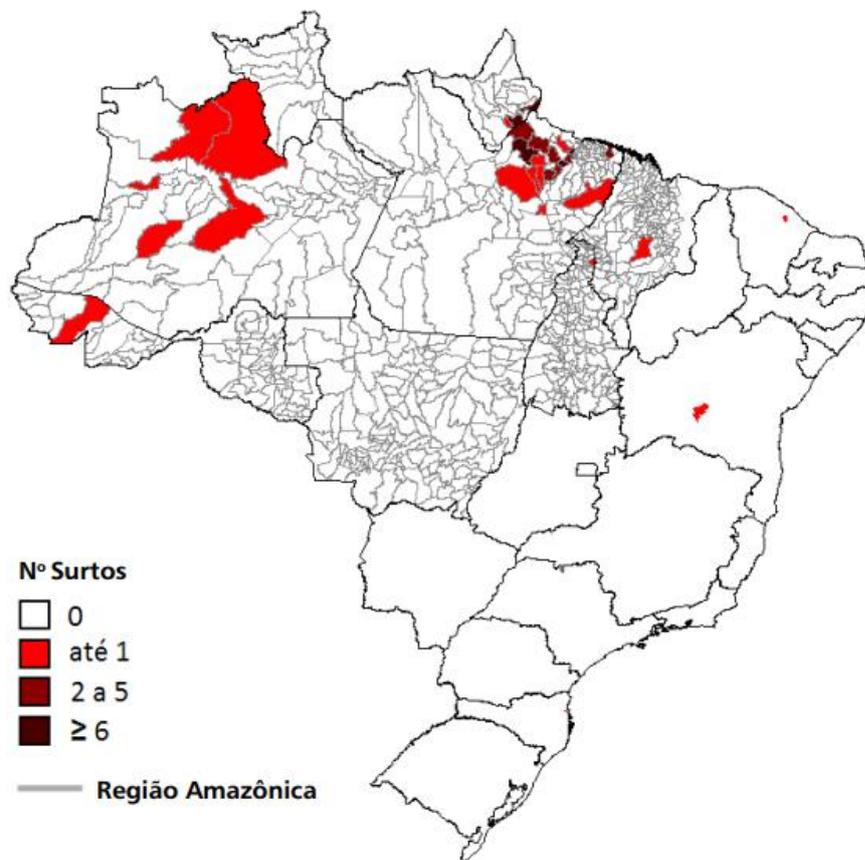


Fonte: WHO, 2013.

No Brasil, o quadro epidemiológico é estimado em 2-3 milhões de indivíduos parasitados por *Trypanosoma cruzi*, e cerca de 6 mil mortes anuais (MARTINS-MELO et al., 2012). Notificações nos órgãos de vigilância indicam que, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada em diferentes estados do País, sobretudo na região Norte, seguida pela região Nordeste (BRASIL, 2014).

No período de 1997 a 2008, somente na região Amazônica, foram registrados 617 casos da forma aguda da doença de Chagas, considerados como pequenos surtos. Tais surtos não são relacionados à transmissão pelo “barbeiro” (via clássica), mas por via oral. Sobretudo devido à ingestão de frutas e sucos regionais (como o açaí) contaminados com *Trypanosoma cruzi* (BARBOSA-FERREIRA et al, 2010). Por isso, a região Amazônica é considerada área endêmica para doença de Chagas (figura 2) (PINTO et al, 2008).

Figura 2: Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, em destaque para Região Amazônica Legal, 2005 a 2013.



Fonte: Ministério da Saúde, (2015).

1.3 – Vias de Transmissão

1.3.1 – Via Vetorial

Classicamente, a doença de Chagas é transmitida pela via vetorial, sendo a principal via de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, que ocorre através do triatomíneo hematófago, conhecido popularmente como “barbeiro”, “chupança”, ou “chupão”. Esse inseto pode ser classificado em três principais gêneros: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Possui hábitos noturnos e apresenta, em sua saliva, propriedades anestésicas e anticoagulante, substâncias que tornam sua picada indolor. Ao realizar o repasto sanguíneo, o triatomíneo defeca na pele da vítima, depositando formas tripomastigotas de *T. cruzi* junto às fezes. Tais formas do

parasito também são capazes de penetrar em um hospedeiro através dos olhos, boca, ferimentos e abrasões na pele (GARCIA & AZAMBUJA, 1991).

1.3.2 – Transfusão Sanguínea

O primeiro caso de transmissão transfusional da doença de Chagas no Brasil, foi registrado em 1952, em São Paulo. Na década de 70, as doações de sangue concentravam-se nos grandes centros urbanos e o aparato tecnológico para coleta de sangue era rudimentar. Havia remuneração para os doadores, e nenhum controle do sangue transfundido. Em 1976, o Ministério da Saúde definiu a necessidade de se implantar hemocentros públicos, baseados na doação voluntária de sangue (DIAS, 2002; FREITAS et al., 1952; SILVA, 2010).

Apenas na VIII Conferência Nacional de Saúde, em 1986, a questão da transmissão transfusional da doença de Chagas foi discutida. Tornou-se então proibida a remuneração do doador, foi normatizada a prática da hemoterapia e instituiu-se a obrigatoriedade da seleção sorológica dos candidatos à doação (DIAS, 2006). Porém, mesmo com tais ações, vários fatores ainda contribuem para a persistência do risco de transmissão transfusional da doença de Chagas, tais como: falhas na triagem clínica e sorológica, a prevalência da doença na região, a forma e quantidade de produto sanguíneo infectado transfundido, a situação imune do receptor, o baixo nível de cobertura da sorologia para *T. cruzi* nos serviços de hemoterapia e o grau de sensibilidade dos testes para diagnóstico sorológicos utilizados nos possíveis doadores (FERREIRA-SILVA, 2006; MORAES-SOUZA, 2011; SILVA, 2010).

1.3.3 – Transmissão por via Oral

Nos últimos anos, casos por transmissão oral tem sido relatado em diversos estados brasileiros. Ocorrem pela ingestão de alimentos contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi*, provenientes de triatomíneos, ou suas dejeções. Em 2006, na cidade de Redenção, Ceará, foi confirmado o primeiro caso de transmissão oral da doença no estado, estando envolvidos 8 indivíduos da mesma família, infectados através da ingestão de uma sopa contaminada com *T. cruzi* (CAVALCANTI et al., 2009). A amamentação também pode ser considerada um meio de contaminação por via oral. Estudos comprovaram achados de *Trypanosoma cruzi* no leite de mães nas fases aguda e crônica da doença (LAMOUNIER; MOULIN; XAVIER, 2004).

1.3.4 – Outras vias de transmissão

Também são formas de transmissão os acidentes de laboratório, a manipulação de animais infectados, o transplante de órgãos, transmissão congênita e o ato sexual (feridas, esperma ou fluidos menstruais). Nos últimos anos, a maioria dos novos casos da doença de Chagas está relacionada às transmissões pelas vias oral, congênita e por transfusão de sangue (COURA, 2007).

Tabela 1: Casos confirmados de doença de Chagas aguda segundo a forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2013.

Forma de transmissão	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1.081	68,9
Ignorada*	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial	-	-	-	1	1	-	4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras**	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1.570	100,0

*Foram incluídos os casos com a variável "forma provável de transmissão" em branco.

**Transmissão acidental e transfusional.

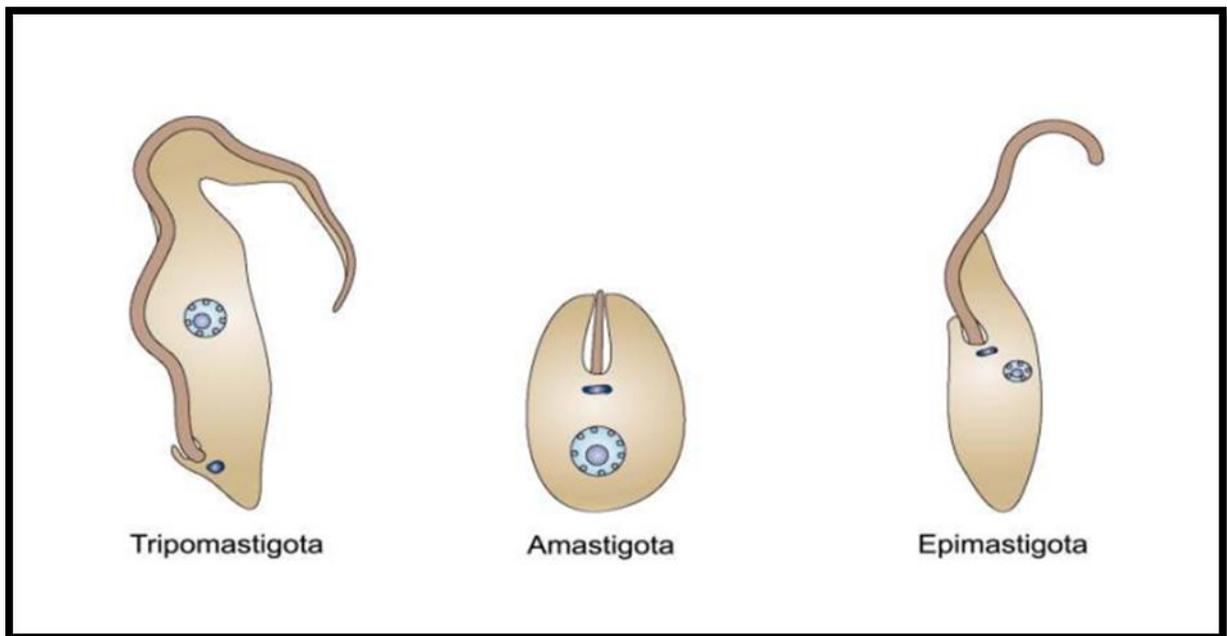
Fonte: Ministério da Saúde, (2015).

1.4 – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, do subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Seu ciclo biológico envolve um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor), podendo apresentar as seguintes formas evolutivas: epimastigotas, formas multiplicativas encontradas no aparelho digestivo do triatomíneo e possuem intensa mobilidade. O seu cinetoplasto é localizado anteriormente ao núcleo e possui membrana ondulante pouco desenvolvida. Enquanto que os tripomastigotas, não possuem capacidade de replicação e corresponde à forma infectante extracelular. São encontrados tanto em hospedeiros invertebrados (tripomastigota metacíclico), quanto em vertebrados (tripomastigota sanguíneo). Morfologicamente, apresentam um núcleo grande e central, cinetoplasto arredondado posterior ao núcleo e seu flagelo emerge lateralmente à bolsa flagelar, aderindo ao longo do corpo (MARTINS et al., 2012). A terceira forma é a amastigota, forma

intracelular, encontradas em tecidos do hospedeiro vertebrado e caracterizadas morfológicamente por ausência de flagelo e de membrana ondulante (ZINGALES; COLLI, 1985).

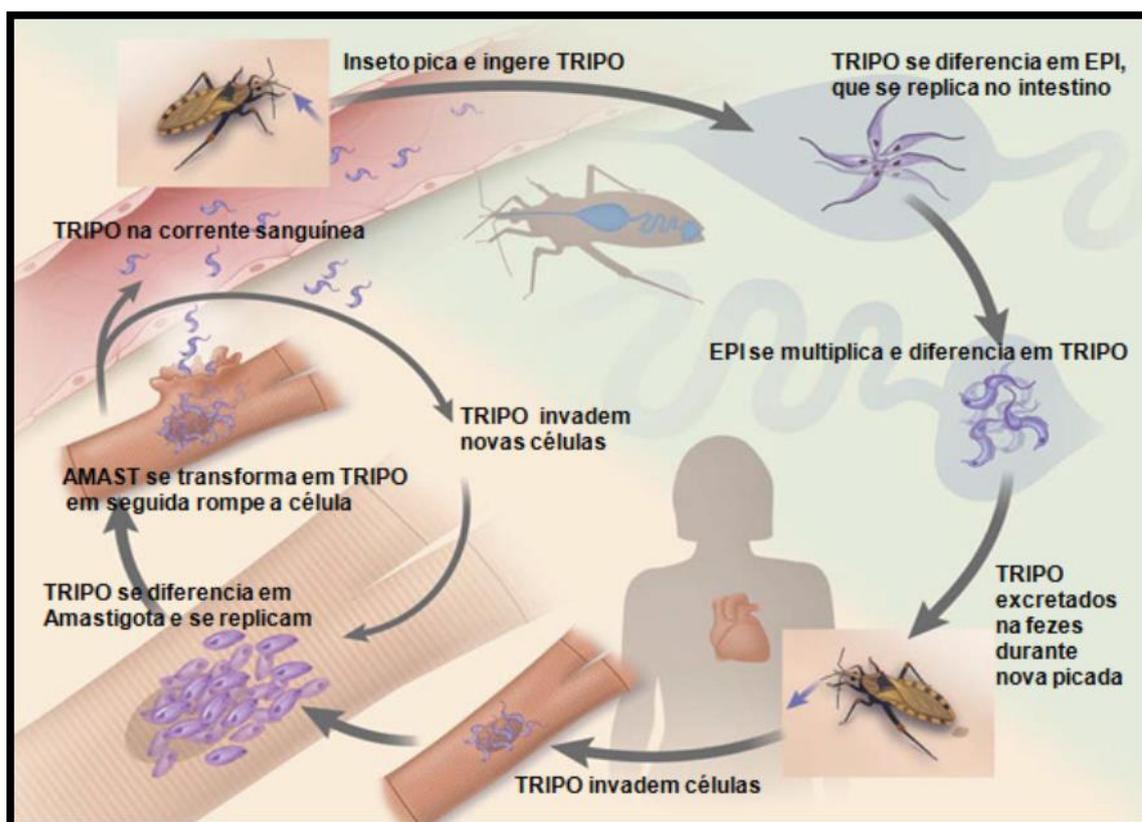
Figura 3: Desenhos esquemáticos das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: DOCAMPO (2005).

O *T. cruzi* possui um ciclo heteroxêmico: a infecção ocorre no momento da picada, quando o inseto defeca no hospedeiro, e o ato de coçar o local, estimulado por uma substância irritante liberada pelo vetor provoca a inoculação das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (CESTARI, 2006). No organismo do mamífero, o parasito invade o citoplasma de algumas células nucleadas, como macrófagos, e se converte em sua forma reprodutiva, chamada amastigota. Após vasta reprodução no interior dessas células, os amastigotas se diferenciam na forma tripomastigota, que lisam a célula hospedeira, voltando para a circulação. A transmissão ocorre quando um triatomíneo se alimenta do sangue de um vertebrado infectado e pica outro indivíduo, reiniciando o ciclo (SILVA *et al.*, 2007). Uma representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* é representada na figura 4.

Figura 4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Bern (2011).

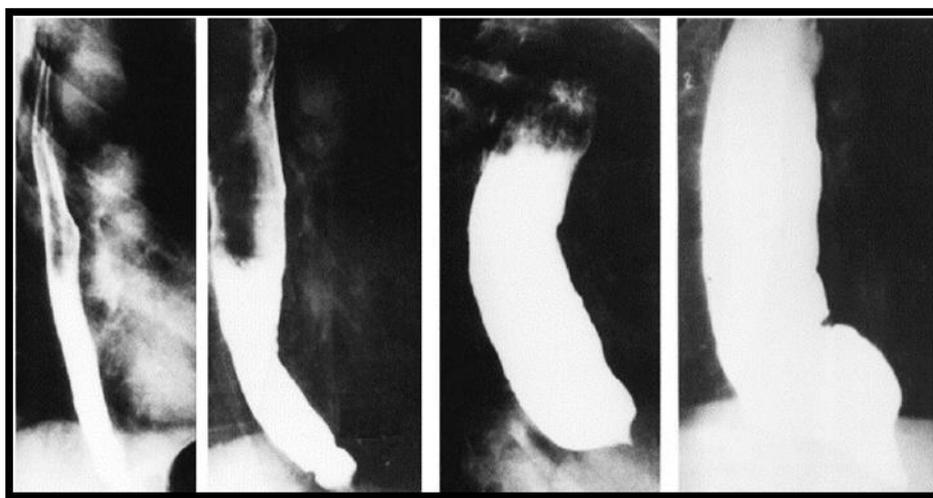
1.5 – Evolução Clínica da doença de Chagas.

O curso clínico da doença inclui uma fase aguda, que aparece logo após a infecção, com elevada parasitemia e, em muitos casos, ausência de sintomas. Nos casos sintomáticos, podem haver sinais no local da infecção, como chagoma de inoculação e sinal de Romaña, febre, adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves. Após esse quadro, a doença evolui para a fase crônica, que pode manifestar-se em algumas formas principais, sendo uma indeterminada (assintomática e com resultados normais para eletrocardiograma e radiografia de coração, esôfago e cólon) (HENRIQUE et al., 2015; COURA, 2007; BILATE; CUNHA-NETO, 2008). Ainda na fase crônica, alterações digestivas e cardíacas podem ser desenvolvidas com consequências fatais, em resultado da destruição progressiva dos órgãos afetados. Estima-se que 30% dos pacientes que se encontram na fase crônica da doença apresentam problemas cardíacos, e cerca de 10%, patologias no trato gastrointestinal (TGI), com destaque para megacólon e megaesôfago

(figura 5), também podem ocorrer alterações neurológicas. É sugerido que essa variabilidade clínica pode ser resultante da heterogeneidade entre os isolados de *T.cruzi* e/ou a resposta imune do hospedeiro (NEVES, 2009; TANOWITZ *et al.*, 1992; VERA-CRUZ *et al.*, 2003).

O curso da infecção pode ser influenciado por diversas características inerentes ao hospedeiro, como a temperatura ambiental, idade, sexo, características genéticas e morfológicas da cepa infectante e fatores externos, como por exemplo, agentes físicos e químicos (BRENER, 2000).

Figura 5: Evolução funcional do megaesôfago chagásico.



Fonte: COURA; BORGES-PEREIRA, 2010.

1.6 – Tratamento farmacológico da doença de Chagas.

O benzonidazol (ROCHAGAN® /ROCHE – GRUMBERG *et al.*, 1972) e o nifurtimox (LAMPIT® /BAYER – BOCK *et al.*, 1968), são as drogas disponíveis para o tratamento de pacientes chagásicos. Tais medicamentos atuam produzindo radicais livres que lisam o *T. cruzi*. (SOEIRO; de CASTRO, 2009).

Diversos estudos admitem a alta efetividade de ambos fármacos no tratamento da fase aguda, com cerca de 80% de cura parasitológica (CANÇADO, 1999; COURA E CASTRO, 2002; RASSI JR, *et al.*, 2010). Porém, uma vez que a doença tenha progredido para fase crônica, nenhum dos dois apresenta atividade satisfatória. A taxa de cura, segundo a

literatura, em tal fase da doença pode variar de 8% a 30% em adultos e, em crianças menores de 15 anos, essa taxa é elevada para 50% - 60% (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Há ainda, um baixo investimento por parte da indústria farmacêutica para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos contra doença de Chagas, devido aos elevados custos e baixo retorno financeiro. Estima-se que desde a descoberta, até a comercialização de um novo medicamento, um período de 10 a 12 anos, atrelado a um gasto de, aproximadamente, 1 bilhão de reais sejam necessários (GUIDO, 2010).

Na década de 80, devido a ocorrência de numerosos efeitos colaterais graves, o uso de Nifurtimox® foi proibido no Brasil. Desde então, o benzonidazol é a única droga de atividade tripanocida disponível no mercado, e sua produção está restrita ao LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) sob a marca Benzonidazol LAFEPE, desde 2008. Além de possuir uma eficácia limitada na fase crônica da infecção, outro grande inconveniente deste fármaco é a ocorrência de reações adversas, que podem ser classificadas em três grupos, segundo Coura e Castro (2002): a) sintomas de hipersensibilidade, dermatite com erupção cutânea (entre o 7º e 10º dia), febre generalizada com edema, linfadenopatia, dores musculares e articulares; b) depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica e agranulocitose, a mais severa manifestação; c) polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos.

1.7 - Violaceína

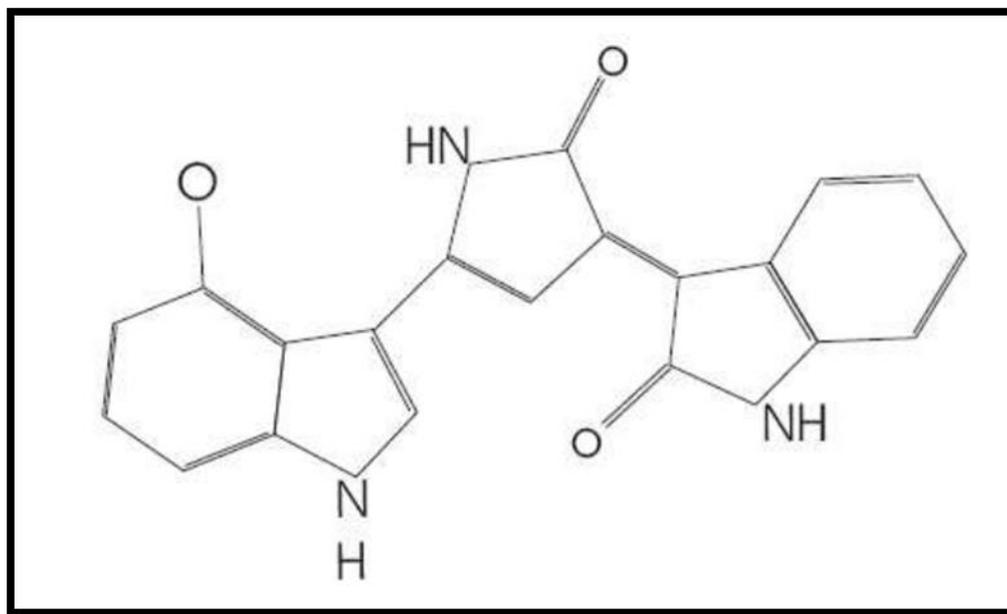
1.7.1 – Características gerais

A violaceína é um pigmento de cor roxa, produzido por diversas espécies de bactérias. É um produto derivado indol, gerado a partir da condensação de duas moléculas de triptofano, caracterizada como 3-(1,2-dihidroxi-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3 dihidro-2H-indol-2-ona, conforme a figura 6 (FERREIRA *et al.*, 2004). Possui uma massa molar igual a 343,34g mol⁻¹, sendo insolúvel em água e solúvel em acetona, etanol, tetrahidrofurano, n-butanol e DMSO. Apresenta propriedades fluorescentes, fotoquímicas, e fotodinâmicas características.

As espécies bacterianas responsáveis pela produção de violaceína são: *Chromobacterium violaceum* (Duran & Menck, 2001), *Janthinobacterium lividum* (Pantenella

et al., 2007), *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Collimonas* sp (Hakvag *et al.*, 2009) e *Duganella* spp (Aranda *et al.*, 2011).

Figura 6: Estrutura química da violaceína (C₂₀H₁₃O₃N₃).



Fonte: LIMA, (2013).

Os principais estudos envolvendo violaceína são relacionados principalmente a *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria Gram-negativo pertencente à família *Neisseriaceae*, que apresenta formato de bastonetes, é anaeróbia facultativa, essencialmente saprófita, encontrada em abundância no Rio Negro – Amazonas, Brasil e em amostras de água e solos em regiões subtropicais e tropicais. Tal bactéria tem sido responsável por septicemias em animais e humanos, registradas em diversos países, como Vietnã, Taiwan, Malásia, Estados Unidos e Brasil (KIM *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2005; MARTINEZ, 2000;).

No ano de 1881, foram relatados por Curzio Bergonzini, os primeiros estudos sobre tal bactéria e seu pigmento arroxeadado. O esclarecimento sobre a estrutura química foi apenas obtido em 1960, por Ballantine e colaboradores. Desde então, a violaceína tem sido bastante estudada e diversas ações tem sido relatadas na literatura, dentre essas: as ações antiulcerogênica (DURAN *et al.*, 2003), antiparasitária (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*) (DURAN *et al.*, 1988; LEON *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2009), antioxidante (KONZEN *et al.*, 2006), antiviral (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003), antitumoral (de

AZEVEDO, 2000) e indutora de apoptose em linhagens de células eucarióticas tumorais, tais como HL60 (DURAN *et al.*, 2005) e HT-29 (de CARVALHO, 2006). Atividade antidiarréica e efeito protetor de ulceração foram ainda registrados em animais (ANTONISAMY *et al.* 2009).

Ainda não é totalmente elucidado o papel exato da violaceína na fisiologia dos microorganismos produtores, porém, acredita-se que seja um metabólito secundário com uma possível função de proteção contra protozoários e outros tipos de bactérias. Em experimentos com bactérias produtoras de pigmentos, dentre elas as produtoras de violaceína, notou-se que, com o aumento da pressão predatória por protozoários, tais bactérias aumentavam a produção dos seus respectivos pigmentos. Por isso, tem se sugerido que a formação de tais metabólitos pelas bactérias heterotróficas pode ter um papel protetor, não somente contra a radiação solar, mas também contra a predação por protozoários (MATZ *et al.*, 2004).

Foi ainda observado por MATZ *et al.*, (2004) que colônias bacterianas com pigmentação vermelha, verde ou violeta não eram ingeridas por amebas do solo, ou que estas inibiam o crescimento amebiano. Foi possível ainda comprovar que a violaceína é altamente tóxica para os protozoários nanoflagelados. Sugerindo que tal pigmento seja, para a bactéria, um mecanismo de sobrevivência altamente efetivo. Tais dados sugerem que a violaceína pode ser utilizada como um importante produto biotecnológico no combate de protozoários, corroborando os achados de LEON *et al.*, (2001) e DURAN *et al.*, (1989), os quais relataram atividades antileishmanias e antitripanossomatídeas respectivamente.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As doenças parasitárias necessitam de fundamental atenção, tanto devido ao aumento significativo da resistência dos parasitos aos agentes terapêuticos disponíveis, como ao fato de serem comumente classificadas como doenças negligenciadas, as quais afligem preferencial ou exclusivamente países em desenvolvimento e possuem pouco incentivo para a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e para a inovação geradora de produtos necessários à saúde das populações desfavorecidas.

O atual cenário farmacológico aplicado à doença de chagas chama a atenção para a necessidade da busca de drogas mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Dessa forma, a descoberta de novas substâncias com atividade tripanocida pode fornecer um potencial biotecnológico para serem utilizadas como fármacos para doença de chagas. Dentro deste contexto, as toxinas bacterianas têm despertado grande interesse da comunidade científica, podendo representar um rico potencial terapêutico.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o potencial tripanocida da Violaceína (VIO) sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Avaliar a toxicidade da violaceína sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.
- b. Avaliar a toxicidade da violaceína sobre células de mamíferos LLC-MK2 e determinar o índice de seletividade (SI).
- c. Analisar o efeito da violaceína sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- d. Determinar o percentual de inibição e o índice de sobrevivência (IS) de formas amastigotas de *T. cruzi* em células LLC-MK2 tratadas com violaceína.
- e. Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com violaceína.
- f. Determinar os efeitos da violaceína sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da substância em estudo e preparo das soluções de trabalho.

A violaceína utilizada neste trabalho foi extraída da cepa *C. violaceum* ATCC 12472, no Laboratório de Genética Molecular e purificada e caracterizada no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará (LAFIPLAN 1), conforme descrito por Batista (2014).

As diferentes concentrações de violaceína utilizadas no estudo (1000 - 0.97µM) foram obtidas através de diluições seriadas, a partir de uma solução estoque de violaceína (289µM) em DMSO puro, de forma que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,34%. Adicionalmente, nos ensaios biológicos, foi utilizada uma solução DMSO 0,34% para confirmar que tal diluente não possui efeitos tóxicos nas concentrações utilizadas.

4.1.2 Obtenção dos parasitos e células LLC-MK2.

Os parasitos e as células LLC-MK2 utilizadas foram doadas pelo Laboratório de Química do Instituto de Bioquímica da Universidade de São Paulo.

4.2 - Ensaios antiparasitários

4.2.1 - Cultivo das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

As formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*liver infusion tryptose*) de acordo com o procedimento descrito por Camargo (1964). Os parasitos foram mantidos a 28°C em incubadora B.O.D (Fanem, Brasil) e repicados a cada 7-8 dias, quando a concentração de parasitos, na fase logarítmica, atingiu a densidade de 5×10^7 a 1×10^9 parasitos/mL. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer, após diluição em meio LIT.

4.2.2 - Efeito citotóxico de VIO sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliar a ação tripanocida, diferentes concentrações de violaceína (0,97; 1,9; 3,9; 7,8; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000µM) foram incubadas em placas de microcultura, com inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/poço, em meio LIT (*Liver infusion tryptose*), a 28°C por 24h, 48h e 72h. Como controle negativo, foi utilizada a cultura de

parasitos em presença de tampão fosfato salina (PBS). A quantificação foi feita conforme citado no ítem 4.2.1.

4.2.3 - Cultivo de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK2 (*Rhesus monkey* kidney) infectadas, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium - Vitrocell) enriquecido com antibióticos e 2% de Soro Bovino Fetal (SBF), em atmosfera com 5% de CO₂ por 5-6 dias, período em que se observou a eclosão das células e, conseqüentemente, tripomastigotas no sobrenadante. Em seguida, os parasitos foram retirados do sobrenadante, centrifugados (3500rpm / 7 minutos) e assim, utilizados para a realização dos ensaios.

4.2.4 - Efeito citotóxico sobre as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas através da infecção de células LLC-MK2, foram subcultivadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^6 parasitos/mL e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM enriquecido com antibióticos (acrescido de penicilina 100 U/mL e Estreptomicina 130mg/L) e 2% de Soro Bovino Fetal (SBF). As alíquotas de diferentes concentrações de violaceína (0,97; 1,9; 3,9; 7,8; 15,62; 31,25µM) foram adicionadas à suspensão de parasitos. As placas foram incubadas por 24h nas condições de cultivo supracitadas. Como controle negativo, DMSO 0,5% foi utilizado. Culturas de parasito sem nenhum tratamento foram consideradas como 100% de crescimento. Após o período de incubação, a quantificação foi realizada conforme descrito no ítem 4.2.1 para forma epimastigota de *T. cruzi*.

4.3 - Cultivo de células LLC-MK2.

As células LLC-MK2 utilizadas para infecção por formas tripomastigotas e para ensaio de citotoxicidade foram cultivadas em garrafas de cultura celular (25cm² ou 75cm²) em meio DMEM acrescido de penicilina (100 U/mL), Estreptomicina (130mg/L) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. A cultura foi mantida em atmosfera de 5% de CO₂ a 37° com visualização diária do crescimento em microscópio óptico invertido.

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1 mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos, a 37°C para desprendimento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1mL de DMEM, e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com DMEM completo (APARICIO *et al.*, 2004).

Para produção de estoques celulares, as células foram periodicamente removidas, quantificadas e ressuspensas em meio DMEM completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Essas suspensões foram armazenadas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a -80°C, mantidas por até 3 meses.

4.3.1 - Avaliação da citotoxicidade de VIO sobre células LLC-MK2.

O potencial citotóxico de VIO sobre a linhagem LLC-MK2 teve o propósito de selecionar as concentrações a serem testadas nos experimentos das formas intracelulares de *T. cruzi*. Para tal, foi realizado o teste de redução do MTT (ítem 4.3.2).

Antes de cada experimento de citotoxicidade, as células LLC-MK2 foram mantidas em DMEM sem SBF por 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para sincronização na fase G₀ do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas e tripsinizadas como descrito no ítem 4.3 e centrifugadas a 3500 RPM por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de meio DMEM completo. Alíquotas foram removidas para quantificação em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1×10⁵ células/mL em placas de 24 poços.

4.3.2 - Teste de redução do MTT

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. Se trata de um sal de tetrazólio com cor amarelada, que é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan, de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Em seguida, deve ser

adicionado um agente surfactante para solubilização dos cristais formados. Os produtos finais são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica das células (LIU et al., 1997; MOSMANN, 1983).

Para determinar o efeito citotóxico de VIO sobre células LLC-MK2, placas de 96 poços tratadas com diferentes concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31.25; 15.12; 7.56; 3.9 μ M) foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 μ L de sobrenadante foram removidos e descartados. 10 μ L de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro e, em seguida, 90 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS, 10% em HCl 0,01N) foram adicionados. Após 17 horas de incubação, as placas foram lidas em leitor de placas a 570 nm. Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular \pm EPM em relação ao controle negativo.

4.4 - Avaliação do efeito de violaceína sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliar o efeito de violaceína sobre as formas amastigotas, primeiramente as células LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 poços (10⁶ cel/mL), contendo lamínulas de vidro de 13mm, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h de cultivo, as culturas foram lavadas com DMEM e infectadas com formas tripomastigotas na proporção de 10:1 parasito/célula. Após 48 horas de interação, os parasitos não internalizados foram retirados por lavagem com DMEM e os internalizados, incubados em meio fresco na presença de violaceína, nas concentrações de 4,97 e 9,94 μ M. Após 24 e 48 horas de tratamento, o meio foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida as células foram fixadas por 5 minutos em metanol e corados por 20 minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA). Então, lavou-se as lamínulas com água destilada, deixou-se secar em condições ambiente e foram montadas em lâminas com Etellan (Merk KGaA, Darmstadt, ALE) (Adade *et al*, 2011). O número de amastigotas foi analisado por contagem em microscópio óptico totalizando 300 células. Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas, e Índice de Sobrevivência (IS). O IS é calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IS = \%células\ infectadas \times \frac{Número\ de\ Amastigotas}{Células\ Totais} \quad (Vendrametto\ et\ al.,\ 2010).$$

4.5 - Efeito de VIO sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A avaliação do tipo de morte celular induzido pela violaceína foi realizada pela determinação de características celulares indicativas de morte por necrose ou apoptose por citometria de fluxo. Essa é uma metodologia usada para o estudo de diversas características celulares, uma vez que um dos princípios deste método é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população celular em estudo, inclusive de avaliação funcional. Para realização das análises, as células são conduzidas por um fluxo de líquido unidirecional e forçadas a passar individualmente por um canal, onde são interceptadas por feixes de luz provenientes de lasers específicos (BACAL e FAULHABER, 2003).

Para tanto, foi utilizado o 7-amono-actinomicina D (7AAD), um marcador fluorescente de DNA, impermeável à membrana celular intacta, sendo dessa forma um marcador importante de aumento de permeabilidade de membrana, um evento característico nas células necróticas. E também, o marcador Anexina V-Ficoeritrina (Anexina V-PE) que se liga à fosfatidilserina, uma proteína de membrana exposta durante processo apoptótico.

As formas epimastigotas (1×10^6 cel/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com VIO (51,39 e 102,78 μ M) por 6 horas e após este período, as culturas foram centrifugadas (4000rpm/7min), lavadas com PBS pH 7,4 e ressuspensas em tampão de ligação (Hepes/NaOH 10Mm, NaCl 140Mm, CaCl₂ 2,5 Mm, pH 7,4). Em seguida, foram incubadas com uma solução de 7AAD (1mg/mL, Becton-Dickinson) e Anexina V-PE (50 μ g/mL, Becton-Dickinson) por 15 min ao abrigo da luz (MATSUO *et al.*, 2010). Após esse período, as células foram lavadas novamente e então realizada leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton-Dickinson) (DEOLINDO *et al.*, 2005; IZUMI *et al.*, 2012). Os resultados foram expressos em percentual de eventos positivos.

4.6 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas.

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de outros peróxidos tais como peróxidos lipídicos foi monitorada eletrofluoreticamente com 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

(H2DCFDA), o qual é oxidado ao composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) sendo utilizada como marcador para o estresse oxidativo da célula (CARTHCART; SCHWIERS; AMES 1983).

No estudo, placas de 24 poços, com 1×10^6 células/mL foram incubadas com a concentração de 51,39 e 102,78 μ M de violaceína em meio LIT. Após 3 horas de incubação, adicionou-se DCF (2 mM). A placa foi mantida ao abrigo da luz até o fim do período de tratamento (6 horas). Em seguida, as células foram coletadas, centrifugadas (3500 rpm por 5 minutos) e lavadas com PBS. Por fim, o pellet foi ressuspendido e analisado em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), para análise da emissão de fluorescência (FL1). Como controle positivo, foi usado o terc-butilhidroperóxido (25 μ M), um indutor do estresse oxidativo.

A intensidade de fluorescência emitida foi estimada pela média geométrica da intensidade de fluorescência nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi feita a partir da intensidade relativa de fluorescência, determinada usando a fórmula:

$$\text{Intensidade Relativa de fluorescência} = \frac{\text{Fluorescência teste}}{\text{Média de fluorescência C -}}$$

A Fluorescência teste foi determinada pela intensidade apresentada por VIO e a fluorescência C- determinada pelo controle negativo (PBS).

4.7 - Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial através de citometria de fluxo.

Na investigação do efeito de violaceína sobre o potencial de membrana mitocondrial das formas epimastigotas, foi realizado o ensaio com rodamina 123 por meio de citometria de fluxo. A rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior dessas organelas, emitindo uma fluorescência vermelha (FL2). Alterações ao nível da membrana mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectadas em ensaios de citometria de fluxo por meio da diminuição da emissão de fluorescência vermelha mitocondrial, indicando a redução do acúmulo de Rh-123 nessa organela (JOHNSON *et. al.*, 1980).

As formas epimastigotas na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas com violaceína nas concentrações de 51,39 e 102,7 μM (CI_{50} e $2 \times \text{CI}_{50}$) e PBS (controle negativo) durante 24 horas, em placas de 24 poços. Em seguida, os parasitos foram centrifugados a 3500 rpm por 7 minutos. O precipitado obtido foi lavado duas vezes com PBS e ressuspensão em 490 μL de PBS. As suspensões foram tratadas com rodamina (na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, lavadas duas vezes, ressuspensas em 500 μL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmingen) para contagem de células marcadas com Rh-123 (DE LIMA, *et al.*, 2005). A intensidade de fluorescência e análise estatística para o experimento foram realizadas de maneira semelhante à descrita para a produção de espécie reativa (ítem 4.7).

4.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$), e os resultados foram expressos como valores médios \pm erro padrão médio (EPM). Para comparação dos grupos experimentais, foi utilizado o teste estatístico ANOVA, com pós-teste de Dunnet, utilizando $p < 0,05$ como critério de significância. Para realização dos testes estatísticos, foram utilizados os softwares Microsoft Excel® 2010 e GraphPad Prism® versão 5.0.

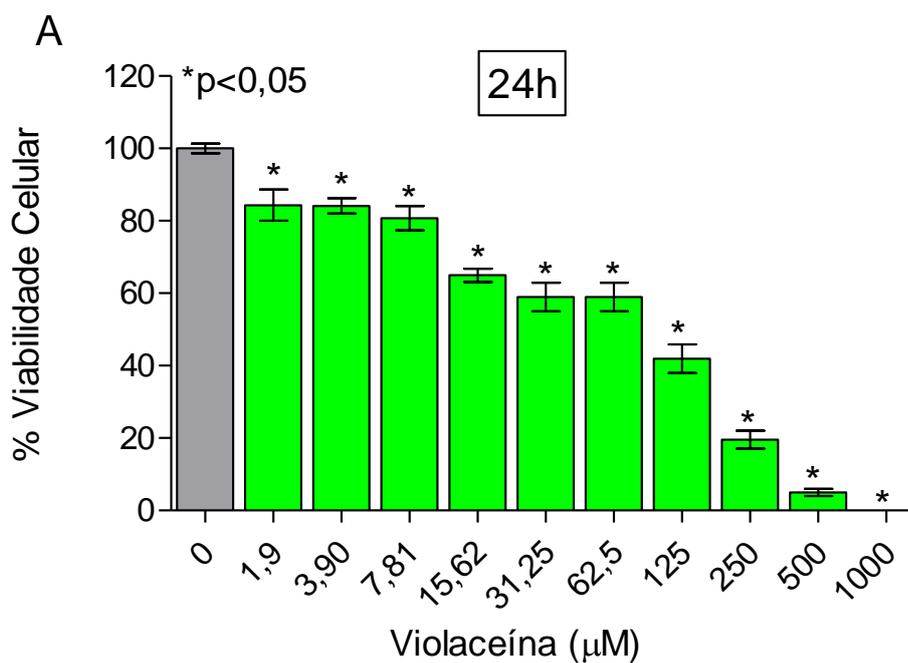
RESULTADOS

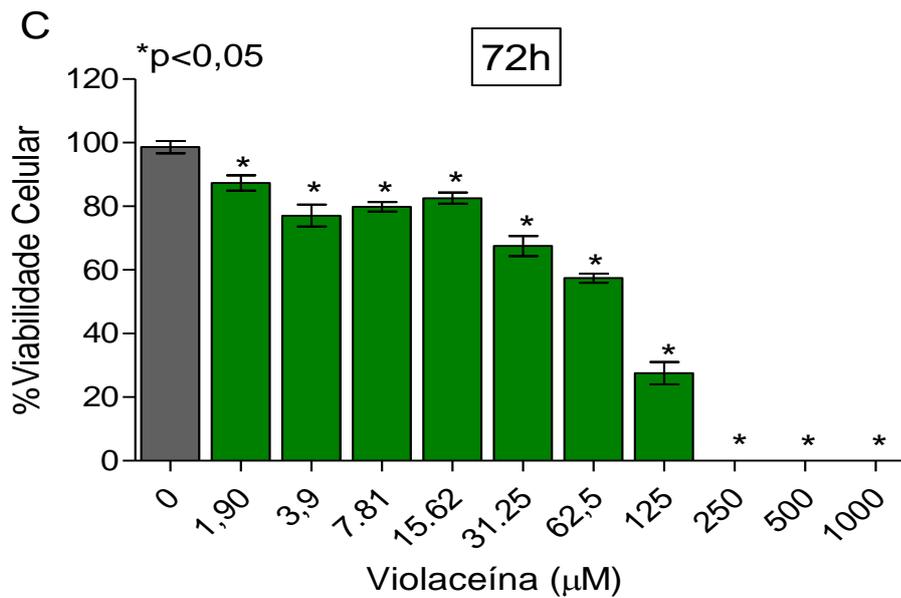
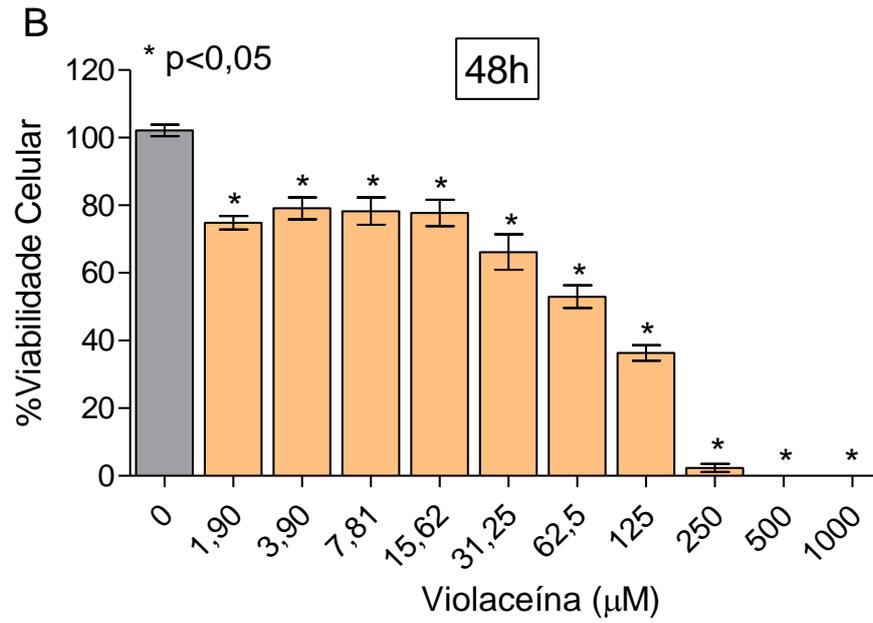
5. RESULTADOS

5.1 Efeito citotóxico de violaceína sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A violaceína apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* em todas as concentrações estudadas, após 24, 48 e 72 horas de incubação. Estes efeitos apresentaram um comportamento dose-dependente e o valor de CI₅₀ encontrado foi de 51,39, 104,7 e 67,78μM, respectivamente (Figura 7 e tabela 2).

Figura 7. Efeito de VIO sobre a viabilidade de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*





Legenda: Inibição no percentual de viabilidade celular dos parasitos (10^6), após 24(A), 48 (B) e 72 horas de incubação (C). Os dados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes ($n=3$). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por pós-teste de Dunett, com $*p < 0,05$ vs. grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2: Percentuais de viabilidade celular das formas epimastigotas tratados com VIO após 24, 48 e 72 horas de incubação.

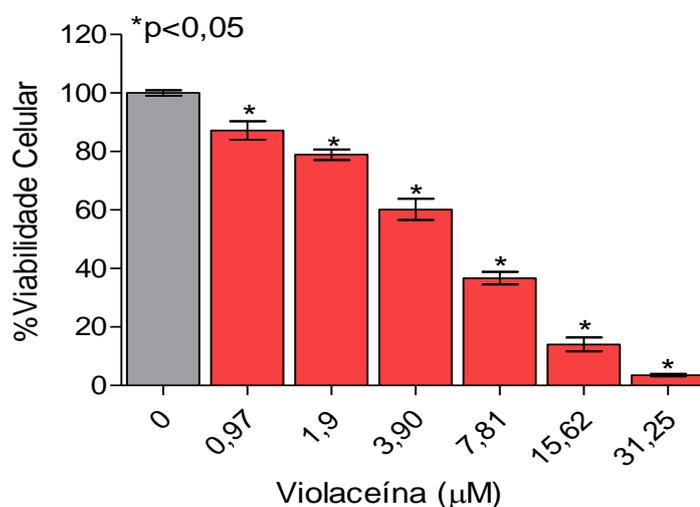
VIO (μM)	Viabilidade celular (média \pm E.P.M.)		
	24 h	48 h	72 h
0	100,0 \pm 1,346	102,2 \pm 1,70	98,62 \pm 1,94
1,90	84,32 \pm 4,30*	74,83 \pm 1,99*	87,35 \pm 2,42*
3,90	84,15 \pm 2,11*	79,12 \pm 3,26*	77,10 \pm 3,41*
7,81	80,76 \pm 3,37*	78,29 \pm 4,02*	79,88 \pm 1,49*
15,62	64,96 \pm 1,87*	66,19 \pm 3,89*	82,58 \pm 1,78*
31,25	58,95 \pm 3,96*	52,97 \pm 5,28*	67,50 \pm 3,16*
62,5	58,95 \pm 3,96*	36,35 \pm 3,36*	57,41 \pm 1,43*
125	58,95 \pm 3,94*	2,36 \pm 2,28*	27,53 \pm 3,52*
250	41,96 \pm 2,48*	0 \pm 0*	0 \pm 0*
500	4,965 \pm 1,00*	0 \pm 0*	0 \pm 0*
1000	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Efeito citotóxico de violaceína sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A VIO (0,97;1,90;3,90;7,81;15,62;31,25 μM) reduziu a viabilidade das formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi* após 24 horas de incubação, mesmo nas menores concentrações testadas, com o valor de CI_{50} equivalente a 4,97 μM (figura 8 e tabela 3).

Figura 8 - Efeito citotóxico de VIO sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*.



Legenda: Percentual de viabilidade celular após 24h de tratamento. Os dados são expressos em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por pós-teste de *Dunnett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3: Percentuais de inibição de crescimento das formas tripomastigotas tratadas com VIO, após 24 horas de incubação.

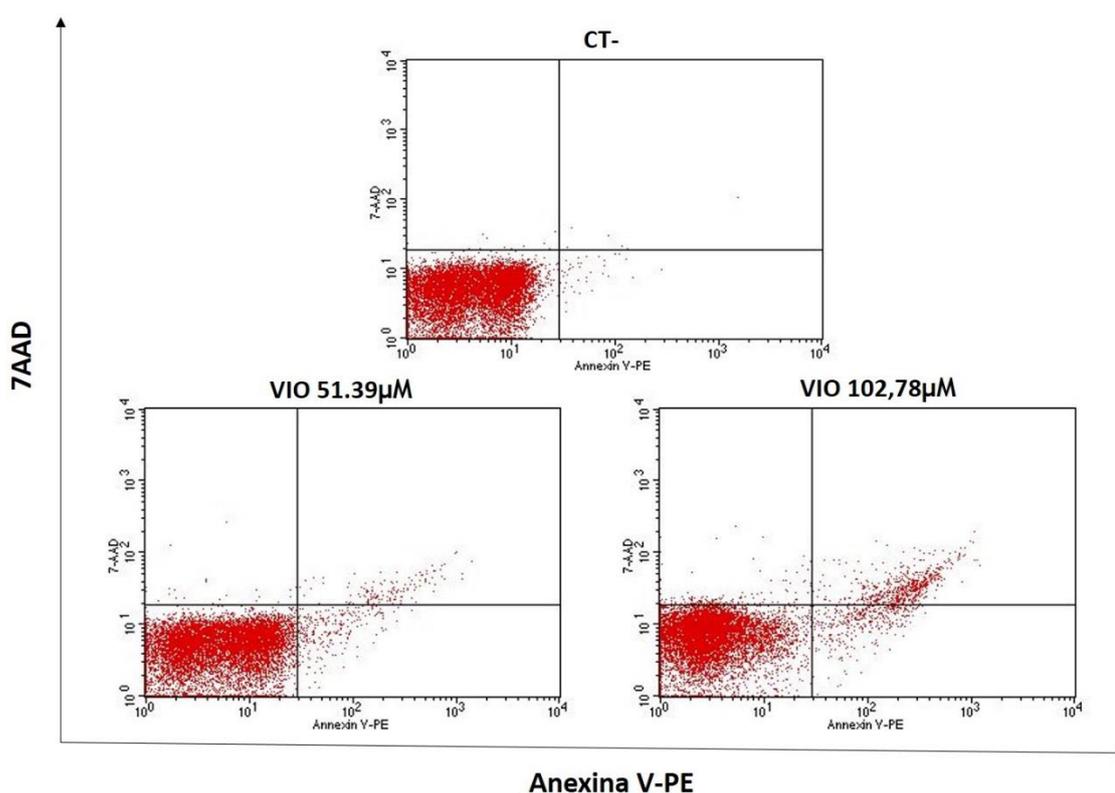
VIO (μM)	Viabilidade celular (média ± E.P.M.)
0,97	87,18 ± 3,12*
1,90	78,93 ± 1,84*
3,90	60,19 ± 3,59*
7,81	36,70 ± 2,18*
15,62	14,10 ± 2,42*
31,25	3,54 ± 0,45*

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Efeito de violaceína sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* através de citometria de fluxo.

Com o objetivo de identificar as alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por VIO nas concentrações de 51,39 μ M e 102,78 μ M, as células tratadas por 6 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por 7AAD e Anexina V-PE. Os resultados encontrados indicam a ocorrência de eventos apoptóticos, principalmente na concentração de 102,78 μ M (2xIC₅₀), conforme demonstrado nas figuras 9 e 10 e na tabela 4.

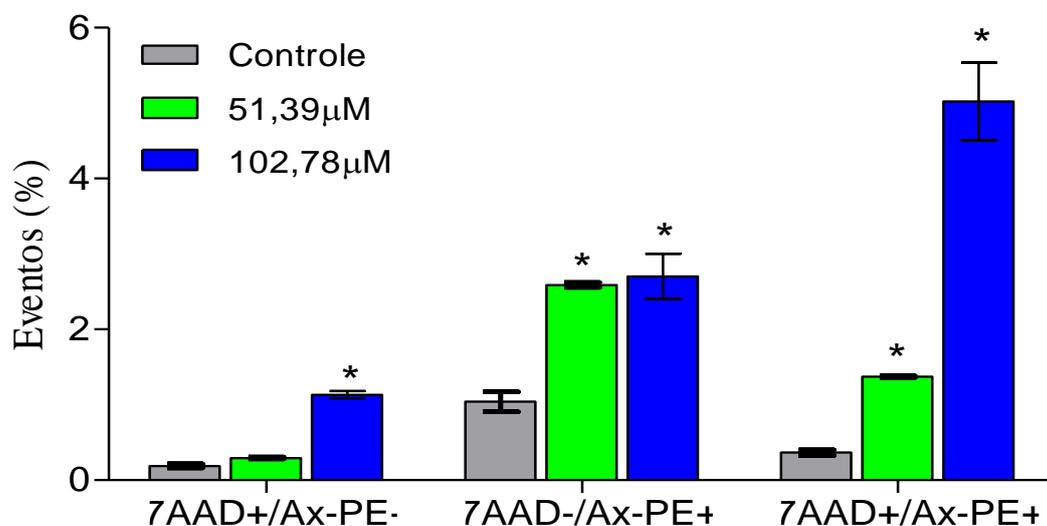
Figura 9. Tipo de morte celular envolvido no efeito de VIO sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.



Legenda: Representação da marcação simultânea de Anexina V-PE e 7AAD. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V-PE; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7AAD e Anexina V-PE.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10. Efeito de VIO sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.



Legenda: O gráfico representa o percentual de eventos positivos após a marcação com 7AAD e anexina V-PE, analisados por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), e os dados expressos como porcentagem de eventos \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, * $p < 0,05$ vs. grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4. Tipo de morte celular envolvido no efeito de VIO sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.

Violaceína (μ M)	Células viáveis	Células marcadas com 7AAD	Células marcadas com Anexina V-PE	Células com marcação dupla
0	98,40 \pm 0,15	0,18 \pm 0,26	1,04 \pm 0,13	0,36 \pm 0,03
51.39	95,74 \pm 0,29*	0,29 \pm 0,01*	2,59 \pm 0,31*	1,37 \pm 0,01*
102.78	91,13 \pm 0,85*	1,13 \pm 0,04*	2,71 \pm 0,30*	5,02 \pm 0,51*

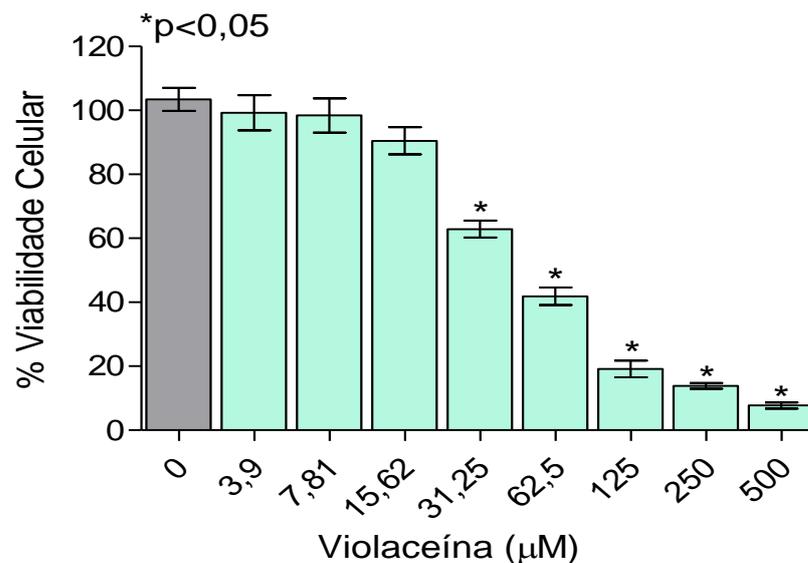
Fonte: Elaborado pelo autor.

5. 4 Citotoxicidade de VIO sobre as células de mamíferos LLC-MK2

A VIO foi capaz diminuir o percentual de viabilidade celular nas maiores concentrações estudadas (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 μ M), após 24 horas de tratamento, com a CI₅₀ equivalente a 47,91 μ M (Figura 11 e tabela 5). O resultado do ensaio de citotoxicidade possibilitou a determinação das concentrações a serem testadas nos ensaios sobre as formas intracelulares, garantindo que não haveria prejuízo à célula hospedeira. A partir do valor de CI₅₀ obtido, foi possível calcular o Índice de Seletividade (SI), que representa a seletividade da substância em estudo ao parasito, em relação à célula de mamífero. Sendo calculada através da seguinte equação:

$$\frac{\text{CI50 em LLC-MK2}}{\text{CI50 em tripomastigotas}} = \frac{47,91\mu\text{M}}{4,97\mu\text{M}} = 9,63.$$

Figura 11. Efeito de VIO sobre a viabilidade de células LLC-MK2



Legenda: O gráfico representa o percentual de viabilidade celular após 24 horas de incubação. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, *p<0,05 vs. grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5. Viabilidade celular de LLC-MK2 tratadas com VIO, após incubação por 24h.

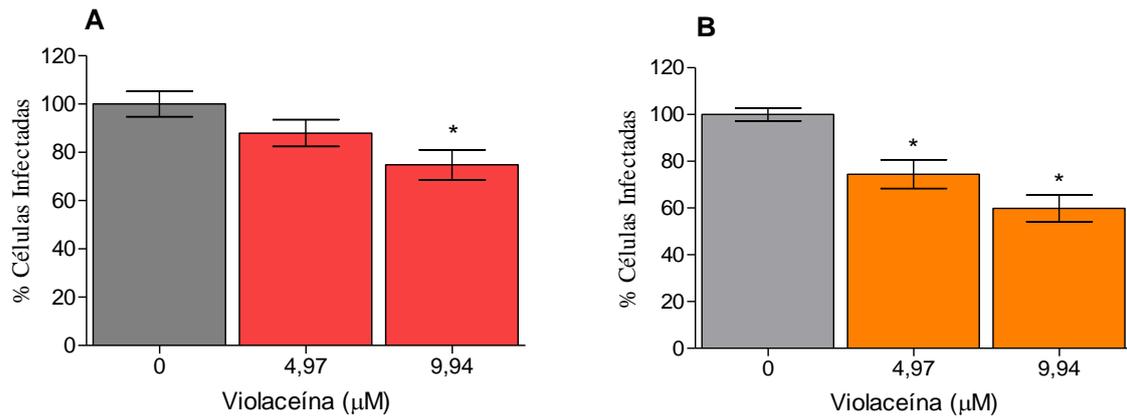
VIO (μM)	Viabilidade celular (média \pm E.P.M.)
3,90	99,25 \pm 5,54*
7,81	98,41 \pm 5,32*
15,62	90,48 \pm 4,27*
31,25	62,88 \pm 2,64*
62,5	41,89 \pm 2,76*
125	19,16 \pm 2,57*
250	13,86 \pm 0,86*
500	7,72 \pm 0,96*

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 - Efeito de violaceína sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Após a obtenção dos resultados de violaceína sobre células LLC-MK2, foi possível selecionar as concentrações inferiores à CI_{50} nestas, para prosseguir com os testes em formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Foram testadas as concentrações de 4,97 e 9,94 μM , nos tempos de 24 e 48h. Violaceína apresentou efeito tripanocida estatisticamente significante, reduzindo o percentual de células infectadas e o índice de sobrevivência (IS) nas formas amastigotas incubadas por 48h com ambas concentrações testadas. O teste com 24h de incubação mostrou que a concentração de 9,94 μM foi capaz de reduzir significativamente o percentual de células infectadas e o IS dos amastigotas (Figuras 12, 13 e 14).

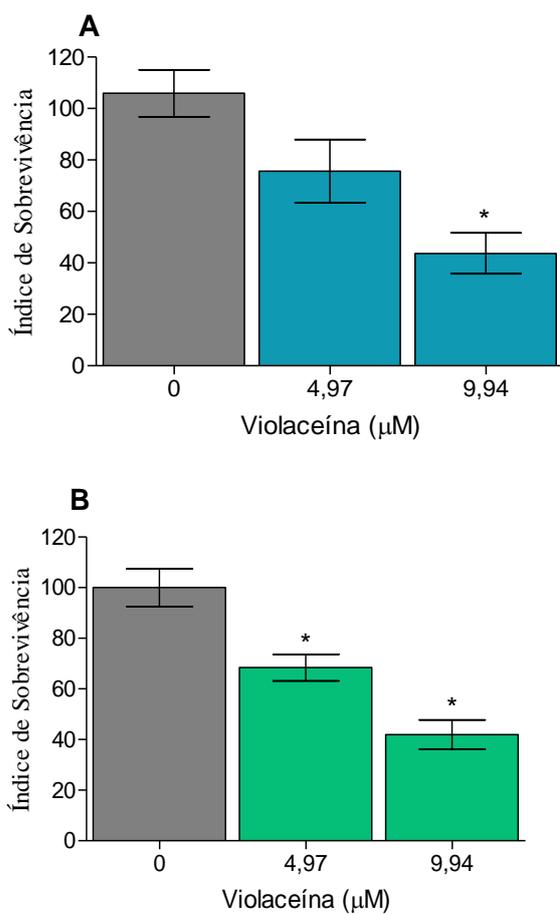
Figura 12: Percentual de células infectadas por amastigotas após 24 e 48h de incubação com violaceína.



Legenda: Percentual de células infectadas após tratamento, ou não com 4,97 e 9,94μM de violaceína após 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, de experimentos independentes (n=3). A Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p<0,05$, comparados ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

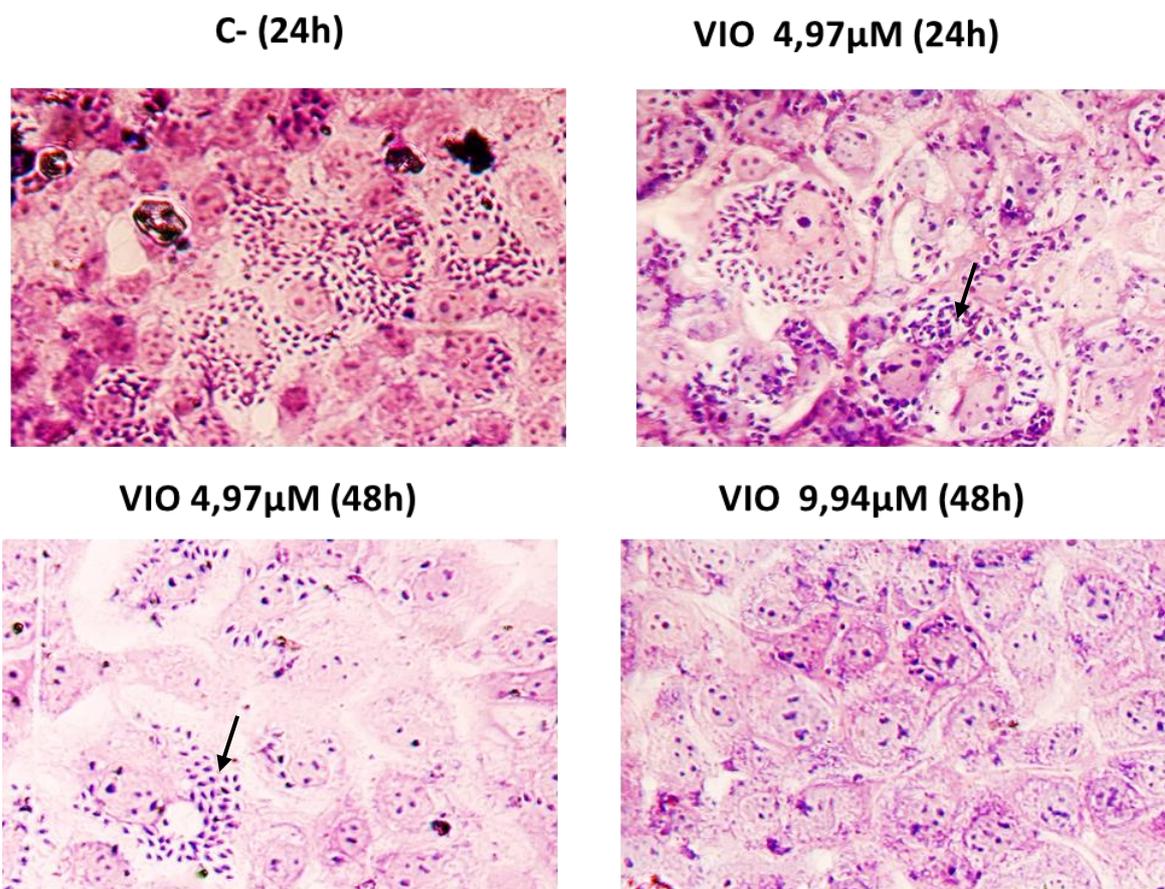
Figura 13: Índice de sobrevivência de amastigotas após tratamento com violaceína.



Legenda: Índice de sobrevivência de amastigotas (IS) após tratamento com 4,97 e 9,94 μM de violaceína, após 24 (A) e 48h (B) de tratamento. Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M, de experimentos independentes (n=3). A Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida por teste *Dunett*, com $*p < 0,05$, comparados ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14: Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas após tratamento ou não com violaceína.



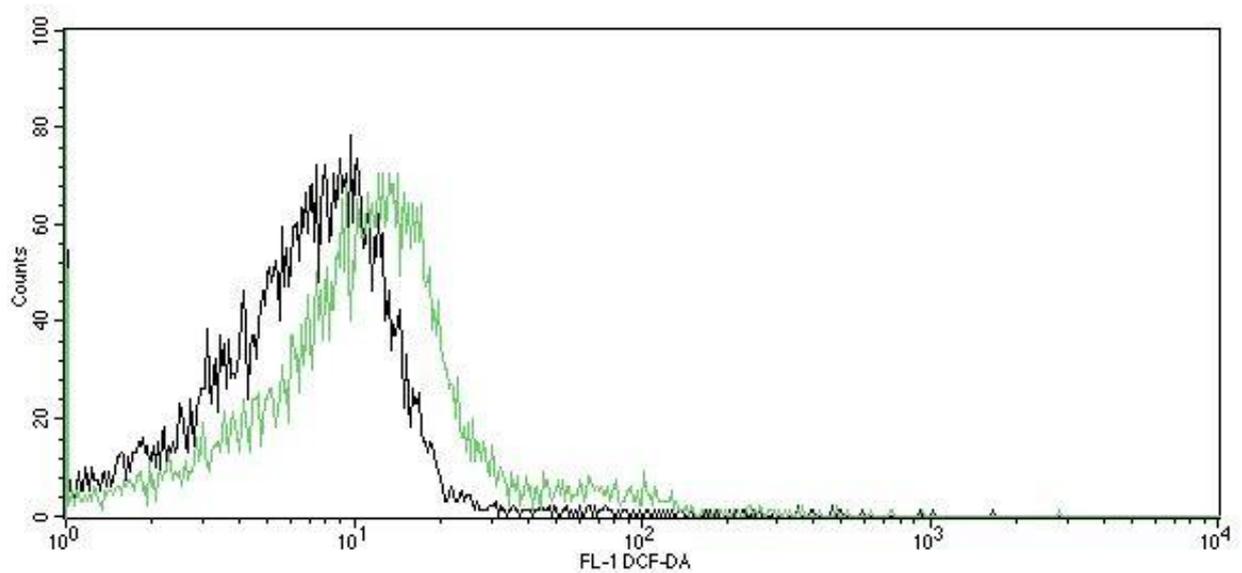
Legenda: Células LLC-MK2 infectadasna presença e ausência de violaceína em diferentes concentrações (4,97 e 9,94µM) após 24h e 48h de tratamento. As formas amastigotas no interior das células estão indicadas por meio de seta. Visualização em microscópio óptico (400x).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 - Produção de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas.

A produção de espécies reativas foi analisada após 6h de incubação de violaceína (102,78µM) com formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi observado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, sendo encontrado um deslocamento à esquerda da população tratada, em relação ao grupo controle, como demonstrado na figura 15. Além disso, como ilustrado na figura 16, houve um aumento significativo na intensidade relativa de fluorescência, quando comparado ao grupo controle negativo (PBS). O grupo controle positivo, tratado com terc-butilhidroperóxido (25 µM), demonstrou efeito semelhante.

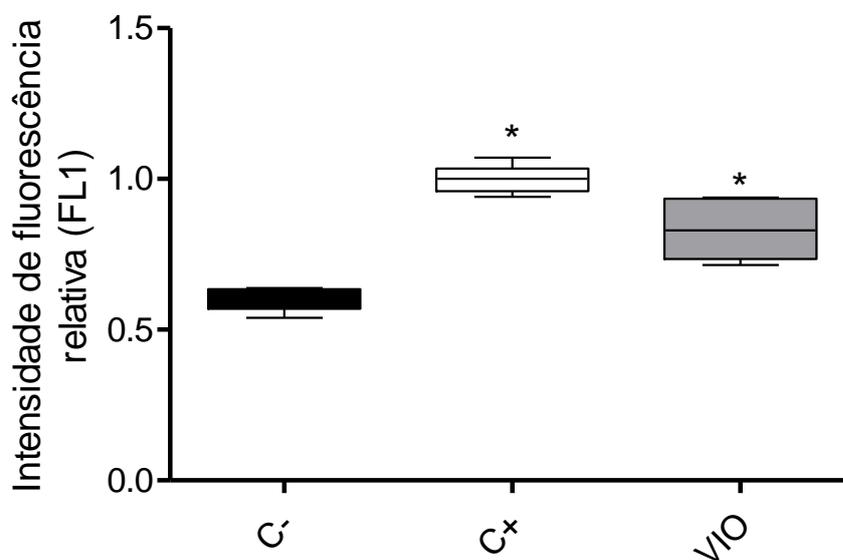
Figura 15 - Histograma da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).



Legenda: Histograma da intensidade de fluorescência (FL1) após adição de Violaceína. O eixo X representa a intensidade DCF-DA, enquanto o eixo Y indica a contagem de células em intensidade de fluorescência correspondente. O traço de cor preta representa a interpretação de fluorescência do controle negativo (CT-; PBS). A linha verde corresponde à atividade de produção de ERO pela violaceína.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Produção de espécies reativas citoplasmáticas em formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.



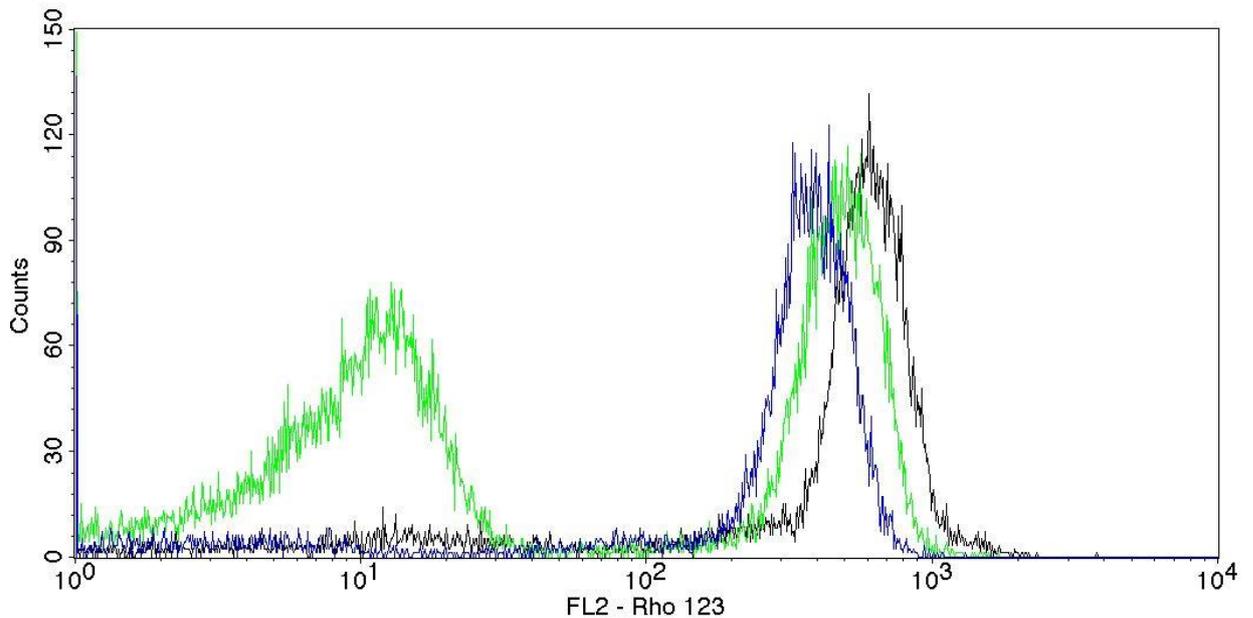
Legenda: Intensidade de fluorescência dos grupos: controle negativo (CT-PBS); controle positivo (CT+, terc-butilhidroperóxido) e violaceína (VIO). A Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p < 0.05$ quando comparados com o grupo controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Efeito de violaceína sobre o potencial transmembrânico mitocondrial.

Com o objetivo de identificar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial induzidas por violaceína, as células tratadas por 24 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por rodamina (Rh-123). No ensaio realizado, os resultados mostraram uma diminuição do potencial de membrana dos parasitos, observado pela redução da fluorescência, conforme demonstrado nas figuras 17 e 18.

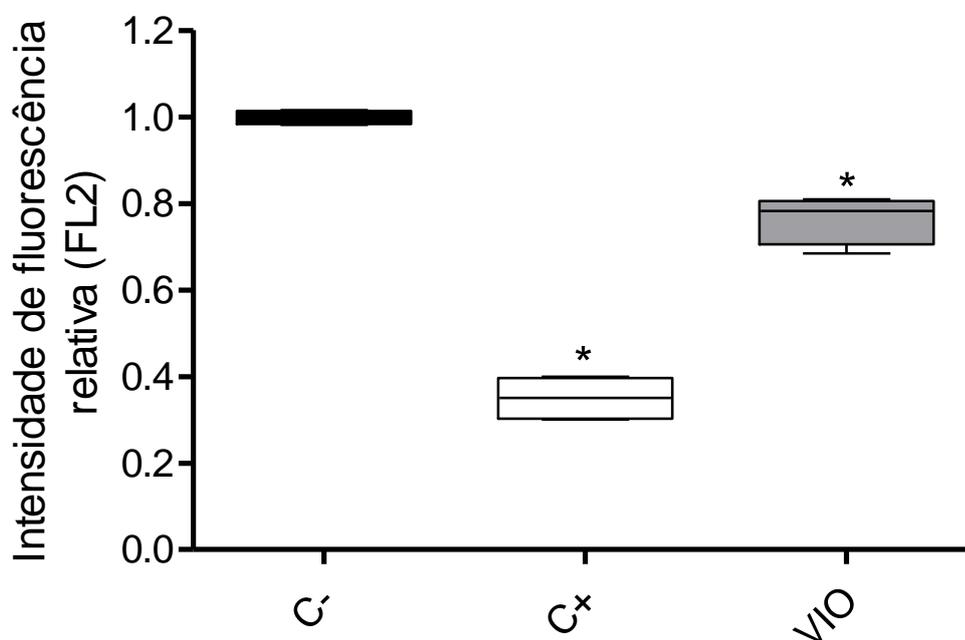
Figura 17 - Histograma do potencial de membrana mitocondrial.



Legenda: Histograma da intensidade de fluorescência (FL2) após marcação com Rh-123. O eixo X representa a intensidade fluorescência de Rh-123, enquanto o eixo Y indica as contagens de células em intensidade de fluorescência correspondente. A linha de cor preta representa a fluorescência do controle negativo (PBS). A linha azul corresponde ao potencial de membrana do controle positivo (terc-butilhidroperóxido) no histograma superior e a linha verde corresponde ao efeito de violaceína.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Efeito de violaceína sobre o potencial de membrana mitocondrial em formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*.



Legenda: Intensidade de fluorescência dos grupos CT⁻ (PBS); CT⁺ (terc-butilhidroperóxido) e violaceína (VIO). A Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), *p<0.05 quando comparados com o grupo controle negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas causa anualmente 6 mil mortes no Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2012) e o aumento do número de casos em áreas não endêmicas está gerando preocupação em países da Europa e nos Estados Unidos. Além disso, o atual cenário farmacológico aplicado à doença de chagas chama a atenção para o desenvolvimento de novos fármacos adequados ao tratamento, ou seja, com perfil farmacológico de eficácia e segurança para utilização em todas as fases da doença (Martins-Melo, 2014).

O potencial farmacêutico da violaceína tem sido relatado em diferentes sistemas biológicos, e suas atividades antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e antiviral foram previamente descritas em diversos trabalhos (LICHSTEIN & VAN DE SAND, 1945; DE SOUZA *et al.*, 1999; DURAN & DE SOUZA, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2003; ARANDA *et al.*, 2011; CAZOTO *et al.*, 2011; DURAN *et al.*, 1988 DURAN *et al.*, 2007).

DURAN *et al.*, (1988) em estudo, avaliaram a ação de violaceína sobre *T. cruzi*, porém este demonstrou apenas a atividade de VIO sobre formas epimastigotas da cepa Tulahaen. Não avaliando o efeito tripanocida sobre as outras formas evolutivas e sobre células hospedeiras. Desta forma, o presente estudo objetivou a investigação da ação tripanocida da violaceína sobre as diferentes formas do parasito. Avaliando o possível mecanismo de ação e a citotoxicidade de VIO sobre células hospedeiras.

Os resultados obtidos demonstram que a violaceína inibiu notavelmente as formas epimastigotas (forma proliferativa e não infectante, presente no vetor) após 24, 48 e 72h de incubação. Lirussi *et al.* (2004), afirma que essa forma, apesar de não estar presente em hospedeiros humanos, é adequada para o estudo do potencial tripanocida de substâncias, devido à sua semelhança com a forma infectante e sua facilidade de cultivo *in vitro*. A partir de um efeito tripanocida observado sobre epimastigotas, outras metodologias devem então ser realizadas para comprovação de atividade semelhante sobre as demais formas.

Na análise sobre as formas tripomastigotas (forma infectante e não proliferativa), a violaceína mostrou ser capaz de inibir a viabilidade celular, mesmo em baixas concentrações. Pereira, (2014), em estudo com o benzonidazol sobre formas tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, obteve um valor de CI₅₀ igual a 5,39µg/mL. A violaceína mostrou um efeito tripanocida ainda maior sobre esta forma evolutiva de *T. cruzi*, com um valor de CI₅₀ igual a 4,97µM

(equivalente a 1,70µg/mL). Tal resultado tem grande importância, por se tratar da forma infectante em humanos.

Foi ainda investigado o efeito de violaceína sobre as formas amastigotas (forma infectante e proliferativa) de *T. cruzi*. A importância de se avaliar a atividade contra tal forma evolutiva é devido ao envolvimento desta com a cronicidade, a diversos sintomas e sinais clínicos da doença (LEY, V; ANDREWS, N. M.; ROBBINS, E. S., 1988). Nossos resultados mostram que a violaceína teve um efeito tóxico sobre a forma intracelular. Havendo redução no percentual de células infectadas e no índice de sobrevivência de amastigotas. Assim, foi possível sugerir a atividade tripanocida de violaceína sobre todas as formas evolutivas do parasito.

Dando prosseguimento aos estudos, foi avaliada a citotoxicidade de violaceína sobre as células LLC-MK2, através do ensaio de redução do MTT, afim de obter-se dados para o cálculo do índice de seletividade (SI). Esse ensaio permite auxiliar a avaliação da toxicidade em células de mamíferos, e/ou na seleção de doses não tóxicas para as células a serem usadas nos ensaios contra as formas amastigotas. O índice de seletividade (SI) obtido (9,63) demonstra que a violaceína foi bem mais tóxica para as formas tripomastigotas, que para as células LLC-MK2.

Para a investigação do possível mecanismo de morte, os parasitos foram tratados com violaceína e marcados com anexina V-PE e 7AAD. No presente estudo, os resultados indicam que houve uma acentuada marcação por anexina V-PE, indicando que a fosfatidilserina foi translocado para o folheto externo da membrana das formas epimastigotas tratadas com violaceína e menos intensamente, mas ainda estatisticamente significativa, por 7AAD. Dessa forma, os resultados indicam um efeito predominantemente apoptótico. A baixa marcação por 7AAD pode indicar células que passaram pelo processo de indução apoptótica e, por não terem sido fagocitadas, são lisadas e entram em necrose secundária.

Slater et al. (1995) postularam que a perda na capacidade redox tamponante da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes, afeta a produção de energia, por consequência, a célula incha e sofre “necrose secundária” (apoptose tardia). Estudos demonstraram que a morte celular apoptótica pode sofrer uma transição para a necrótica durante uma situação de estresse oxidativo. Tal fato pode estar relacionado à concentração da substância à qual a célula é exposta (PEC et al., 2003).

A maioria dos estudos de atividade biológica da violaceína tem seu foco na sua atividade antitumoral e capacidade de induzir apoptose nessas células, assim como as vias moleculares para atingir esse efeito (LOPES, 2012). O resultado em epimastigotas vem corroborar os resultados já obtidos em diversas células tumorais (DE CARVALHO et al., 2006; KODACH et al., 2006; FERREIRA et al., 2004; JUSTO et al., 2005; BROMBERG et al., 2010).

Na tentativa de melhor compreender o efeito tripanocida de violaceína, foi investigada a participação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no provável mecanismo de citotoxicidade sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* através da análise em citometria de fluxo. Foi utilizado o DCF, marcador de estresse oxidativo, e foi observado que a violaceína aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que um dos efeitos citotóxicos de VIO sobre cepas Y de *T. cruzi* pode estar relacionado ao metabolismo oxidativo do parasito.

Durante o metabolismo oxidativo, uma parte do oxigênio que é consumido pela mitocôndria é reduzido parcialmente, levando à formação de ERO (DEOLINDO, *et. al.* 2010). Essa organela é considerada a responsável pela produção de energia para os processos bioquímicos na célula, porém, quando a quantidade de espécies reativas excede a capacidade antioxidante da mitocôndria, o estresse oxidativo leva ao dano mitocondrial. Este efeito pode ser ocasionado devido a um aumento da síntese de lipídeos da membrana em resposta (TOOZE, 2013).

GUO *et al.*, (2012) demonstraram que espécies reativas de oxigênio aumentam o estresse oxidativo, ativando, por choque térmico, as proteínas e iniciando uma desorganização da membrana e do citoplasma da célula afetada. DE CARVALHO *et al.*, (2006) demonstraram que o estresse oxidativo induzido pela violaceína é um dos mediadores dos níveis de apoptose em células Caco-2 do cólon intestinal. Tais achados reforçam os resultados obtidos no presente estudo, onde as concentrações testadas geraram na célula uma morte com mecanismo sugestivo de apoptose, com a produção de espécies reativas de oxigênio.

Dando continuidade à investigação do mecanismo de ação da violaceína sobre o parasito, foi ainda avaliado o efeito da substância sobre o potencial de membrana mitocondrial. O aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial pode ser consequência de vários fatores, sendo considerado um indicador de dano mitocondrial e definido como um estágio inicial de morte celular (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2013).

Os resultados mostram que as formas epimastigotas tratadas com a concentração de 102,78 μ M de violaceína após 24h, apresentaram uma diminuição na emissão de fluorescência por rodamina 123. De acordo com Deolindo e colaboradores (2010), o H₂O₂ pode levar a alterações na função mitocondrial do parasito através da produção de espécies reativas de oxigênio.

Assim, os ensaios apresentados contribuem para a melhor compreensão da ação biológica de violaceína sobre o parasito *Trypanosoma cruzi*, e células de mamífero LLC-MK2. Abrindo novas perspectivas para estudos objetivando a cura e tratamento da doença de Chagas.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A violaceína apresentou baixa toxicidade em células de mamíferos, efeito tripanocida em todas as formas do ciclo evolutivo do parasito, com envolvimento de espécies reativas de oxigênio e alterações no potencial de membrana mitocondrial no processo de morte celular por apoptose.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C.M., CONS, B.L., MELO, P.A., SOUTO-PADRÓN, T., **Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol* n.138, p. 46-58, 2011.**

ADADE, C. M. OLIVEIRA, I. R.; PAIS, J. A.; SOUTO-PADRÓN, T. **Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon*, n. 69, p. 227-239, 2013**

ANDRIGHETTI-FRÖHNER CR, ANTONIO RV, CRECZYNSKI-PASA, TB, BARARDI, CRM, SIMÕES CMO. 2003. **Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98, 843-848.**

ANTONISAMY, P.; KANNAN, P.; IGNACIMUTHU, S. **Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* in Wistar rats. v. 23, p. 483–490, 2009.**

ARANDA S, MONTES-BORREGO M, LANDA BB. 2011. **Purple-pigmented Violacein-Producing *Duganella spp.* Inhabit the Rhizosphere of Wild and Cultivated Olives in Southern Spain. *Microb. Ecol.* 62, 446-459.**

AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* **A 9.000-years record of Chagas' disease. *Proc Nat Acad Sci SA*. v. 101, p. 2034-2039, 2004.**

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. **Introdução à Citometria de Fluxo. Aplicação Prática em Citometria de Fluxo. São Paulo: Atheneu, cap.1, p. 1-4.**

BALLANTINE JA, BEER RJS, CRUTCHLEY DJ, DODD GM, PALMER DR. 1960. **The Chemistry of Bacteria**. Part VIII. The Synthesis of Violacein and Related Compounds. J. Chem. Soc. 2292-2299.

BARBOSA-FERREIRA, J. M.; GUERRA, J. A. O.; SANTANA FILHO, F. S.; MAGALHÃES, B. M. L.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. **Acometimento cardíaco em casos de doença de Chagas aguda da Amazônia**. Arq. Bras. Card. v. 94, nº 6, p. 147-149. 2010.

BENITEZ JJ, TOPOLANCIK J, TIAN HC et al (2012) **Microfluidic extraction, stretching and analysis of human chromosomal DNA from single cells**. Lab Chio 12:4848-4854.

BERN, C. **Antitrypanosomal Therapy for chronic Chagas' Disease**. The New Engl J of Med, n. 364, p. 2527-2534, 2011.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. **An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States**. Clin Infect Dis, n. 49, p. 52-54, 2009.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. **Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil, v.50, p. 67-74, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Sistema de Vigilância Sanitária – Sistema de Agravos de Notificação – SINAN**. Net, 2014b. Acessado dia 28 de outubro de 2014.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2000.

BROMBERG, N., et al., **Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites**

CAMARGO EP 1964. **Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi***. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.

CANÇADO, J. R. **Criteria of Chagas Disease Cure**. v. 94, p. 331–335, 1999.

CARTHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B. **Detection of picomole levels of hydroperoxides using a dichlorofluorescein fluorescent assay**. Analytical biochemistry, New York, v. 134, p. 111-116, 1983.

CAVALCANTI, L. P. G.; ROLIM, D. B.; PIRES NETO, R. J.; VILAR, D. C. L. F.; NOGUEIRA, J. O. L.; POMPEU, M. M. L.; TEIXEIRA, M. J.; SOUSA, A. Q. **Microepidemia de doença de Chagas aguda por transmissão oral no Ceará**. Cad. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, n° 17, v. 4, p. 911-921. 2009.

CESTARI, I. S. ***Trypanosoma cruzi* e o Sistema Complemento**: mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHAGAS, C. **Carlos Chagas and the discovery of Chagas disease “(American trypanosomiasis)”**. v. 74, n. February, p. 451–455, 1981.

CLARDY, J.; WALSH, C. **Lessons from natural molecules**. Nature, v. 432, p. 829-837, 2004.

COURA JR 2007. **Chagas disease**: what is known and what is needed. A background article. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 113-122.

COURA, J. R. **The main sceneries of Chagas disease transmission . The vectors , blood and oral transmissions - A comprehensive review.** v. 110, n. October 2014, p. 277–282, 2015.

COURA JR, BORGES-PEREIRA J 2010. **Chagas disease:** 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 115: 5-13.

COURA JR, DIAS JC 2009. **Epidemiology, control and surveillan of Chagas disease:** 100 years

COURA, JR.; de CASTRO, S. L. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil*, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, JR.; VIÑAS, P. A. **Chagas disease:** a new worldwide challenge. *Nature*. v. 465, n. 7301, suppl. S6—S7, 2010.

COURA, JR.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease:** 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, v. 115, p. 5–13, 2010.

DE AZEVEDO MBM, ALDERETE J, RODRIGUEZ JA, SOUZA AO, RETTORI D, TORSONI MA, FALJONI-ALARIO A, HAUN M, DURAN N. 2000. **Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin.** *J. Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem.* 37, 93-101.

DEOLINDO, P. TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J.; ARNHOLDT, A. C.; COUZA, W. D., ALVES, E. W.. DAMATTA, R. A. **Programmed cell death in Trypanossoma cruzi induced by *Bothrops jararaca* venom.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 1, p. 33-38, 2005.

DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. v. 28, nº 2. 2006

DIAS, J. P. et al. **Chromobacteriosis in Ilhéus, Bahia : epidemiologic, clinical and laboratorial investigation.** v. 38, n. 6, p. 503–506, 2005.

DIAS, J. C. P **Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas Disease.** Historical aspects, present situation, and perspectives. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, suppl.1, 2007.

DOCAMPO R, DE SOUZA W, MIRANDA K, ROHLOFF P, MORENO SN. **Acidocalcisomes conserved from bactéria to man.** Nat Rev Microbiol, 2005; 3; 251-261.

DURAN N, JUSTO GZ, MELO PS, DE AZEVEDO MB, BRITO AR, ALMEIDA AB, HAUN M. 2003. **Evaluation of the Antiulcerogenic Activity of Violacein and its Modulation by the Inclusion Complexation with Beta-Cyclodextrin.** Can. J. Physiol. Pharmacol. 81, 387-396.

DURAN N, MENCK CFM. 2001. ***Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives.** Critical Rev. Microbiol. 27, 201-222.

DURAN N', CAMPOS C., RIVEROS R, JOYAS A, HAUN M. **Bacterial Chemistry-111: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of Chromobacterium violaceum Products.** An. Acad. bras. Ci., (1989)61 (1), v. 61, 1989.

DURAN, N. et al. Violacein: properties and biological activities. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 48, n. Pt 3, p. 127-33, Nov 2007. ISSN 1470-8744.

ESPERANDIM, V. R. **Perfil tripanocida de lignanas dibenzilbutirolactônicas: avaliação das propriedades terapêuticas in vivo nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental.** 2010.

FERREIRA, C.V., et al., **Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death.** Blood, 2004. 104(5): p. 1459-64.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. **Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39, n° 5, p. 507-509. 2006.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA P. **Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector.** Parasitol Today. v. 7, n. 9, p. 240-4, 1991.

GASCON, J., BERN, C., PIZANO, M-J. **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.** Acta Tropica, n. 115, p. 22–27, 2010.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas,** Estudos Avançados, v 24 (70), p 80-98, 2010.

GUO, C. LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M. Z. **Past decade study of snake venom Laminoacid oxidase.** Toxicon n. 60, p. 302-311, 2012.

HAKVAG S, FJAERVIK E, KLINKENBERG G, BORGOS SE, JOSEFSEN KD, ELLINGSEN TE, ZOTCHEV SB. 2009. **Violacein-Producing *Collimonas sp.* from the Sea Surface Microlayer of Costal Waters in Trøndelag, Norway.** Mar. Drugs. 7, 576-588.

HENRIQUE, L. et al. **Case Report First Report Of Acute Chagas Disease By Vector Transmission In Rio De Janeiro State , Brazil.** v. 57, n. 4, p. 361–364, 2015.

IZUMI E. UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. **Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity.** J Med Chem., v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

KIM, M.H.; LEE, H.J.; SUH, J.T.; XHANG, B.S.; CHO; K.S. **A case of *Chromobacterium* infection after car accident in Korea.** Yonsei Medical Journal., 2005, vol. 46(5), p. 700-702.

KIRKPATRICK, P. **Antibacterial drugs: stitching together naturally.** Nat. Rev. Drug Discov., v.1, p.748, 2002.

KONZEN M, DE MARCO D, CORDOVA CA, VIEIRA TO, ANTÔNIO RV, CRECZYNSKI-PASA TB. 2006. **Antioxidant Properties of Violacein: Possible Relation on its Biological Function.** Bioorg. Med. Chem. 14, 8307-8313.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL- DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M.,KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. AND MELINO, G. (2009). **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** Cell Death and Differentiation 16, 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.

LAMOUNIER, J. A.; MOULIN, Z. S.; XAVIER, C. C. **Recomendações quanto à amamentação na vigência de infecção materna.** Jornal de Pediatria, v. 80, n° 5, p. 181-188. 2004.

LEON LL, MIRANDA CC, DE SOUZA AO, DURAN N. 2001. **Antileishmanial Activity of the Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum*.** J. Antimicrob. Chemother. 48, 449-450.

LIRUSSI D, et al., **Inhibition of Trypanosoma cruzi by plant extracts used in Chinese medicine.** Fitoterapia 75: p 718-723, 2004.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. **Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction.** J. Neurochem, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOPES SC, BLANCO YC, JUSTO GZ, NOGUEIRA PA, RODRIGUES FL, GOELNITZ U, WUNDERLICH G, FACCHINI G, BROCCHI M, DURAN N, COSTA FT. 2009. **Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits Plasmodium Growth In Vitro and In Vivo.** Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2149-2152.

MALAFAIA, G. **Editorial Centenário do descobrimento da doença de Chagas : desafios e perspectivas.** v. d, n. 5, p. 483–485, 2010

MARTINEZ R.; SANCHES M.A.; VELLUDO. L.; DOS SANTOS, V. R.; DE DINAMARCO, P.V. **Chromobacterim violaceum infection in Brazil - A case report.** .Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo., 2000, vol 42(2) p. 111-113.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. Jr.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. **Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences.** J Infect Dev Ctries, v. 6, n. 11, p.817-24, 2012.

MATSUO A. L, SILVA, L. S.; TORRECILHAS, A. C.; PASCOALINO, B. S.; RAMOS, T.C.; RODRIGUES, E. G.; SCHENKMAN, S.; CAIRES, A. C.; TRAVASSOS, L. R. **In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' Disease.** Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 8, p. 318-325, 2010.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico doença de Chagas.** Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Vol 46, nº 21 – 2015.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. **O controle da transmissão transfusional.** Rev. História sobre a Doença de Chagas no Brasil, v. 44, supl. II, p. 64-67, 2011.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:** application to proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEVES, D.P., GOMES, C. F. L., IGLÉSIAS, J. D. F., BARCANTE, J. M. DE P., DOS OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JR., A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. **Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil.** Atualização, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

ORTÍ-LUCAS, R. M.; PARADA-BARBA, M. C.; DE LA RUBIA-ORTÍ, J. E.; CARRILLO-RUIZ, A.; BESO-DELGADO, M.; BOONE, A. L. **Impact of Chagas Disease in Bolivian immigrants living in Europe and the risk of stigmatization.** J of Parasitol Res, 2014.

PANTANELLA F, BERLUTTI F, PASSARIELLO C, SARLI S, MOREA C, SCHIPPA S. 2007. **Violacein and Biofilm Production in *Janthinobacterium lividum*.** J Appl. Microbiol., 102, 992-999.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. Biochem. Pharmacol., v. 65, p. 1451–1461, 2003.

PEREIRA, TICIANA PRACIANO. **Efeito da L-amino ácido oxidase isolada do veneno da *Bothrops marajoensis***. Fortaleza: UFC, 2014. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2014.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; FERREIRA JUNIOR, A. G.; COURA, J. R. **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 1995**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 41, n° 6, p. 602-614. 2008.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, A. **Chagas Disease**. Lancet, v. 375, p. 1388–13402, 2010

SANTOS, R. LA C.; **Parasitologia Dinâmica**, 3ª ed., Atheneu: São Paulo, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. **Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem**. Acta Trop, v. 115, n 1-2, p. 14-21, 2010.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. **The future of Chagas disease control**. v. 22, n. 12, 2006. after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1: 31-40.

SILVA, C. F.; MEUSER, M.B.; DE SOUZA, E. M.; MEIRELLES, M. N.; STEPHENS, C. E.; SOM, P.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. **Celular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi***. Antimicrob. Agents Chemother., v. 51, p. 3803-3809, 2007.

SILVA, V. L. C. **Subsídios ao processo de certificação do Brasil como área livre da transmissão transfusional da doença de Chagas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Ciências Médias da Santa Casa de São Paulo. São Paulo. 2010.

SLATER, A. F. G. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. Toxicol. Letters, n. 82/83, p. 149-153, 1995.

SLOVITER RS. Apoptosis: a guide for the perplexed. Trends Pharmacol Sci. 2002;23:19–24.

SOEIRO, M. N. C.; de CASTRO S. L. **Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches.** Expert opinion on therapeutic targets. England, v.13, p. 105-121, 2009.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; AQUINI, A.C. **Electrocardiograma en la enfermedad de Chagas experimental.** Revista argentina de cardiología, Argentina, v.8, p.115-21, 1992.

TOOZE, S.A. **Current views on the source of the autophagosome membrane.** Essays. Biochem. v. 55, p. 29-38, 2013.

VENDRAMETTO, M. C. ; DOS SANTOS, A. O. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G. ; UEDA-NAKAMURA, T. **Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of Piper regnellii var. pallescens.** Parasitol Intern n 59, p 154-158, 2010.

VERA-CRUZ, J. M.; MAGALLÓN-GASTCLUM, E.; GRIJALVA, G.; RINCÓN, A. C.; RAMOS-GARCIA, C.; ARMENDÁRIZ-BORUNDA, J. **Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of animal model to study parasite tropism.** Parasitology research, Germany, v.89, p. 480-486, 2003.

VEIGA-SANTOS, P. DESOTI, V. C.; MIRANDA, N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIASFILHO, B. P.; SILVA, S. O.; CORTEZ, D. A.; DE MELLO, J. C; NAKAMURA, C. V.. **The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*.** Acta Tropica, n. 125, p. 349-356, 2013.

WHO (2013) **Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases**, WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Fact Sheet No 340. 2014.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en> (acessado em 07 de janeiro de 2016)

ZINGALES, B. *et al.* **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature:** rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect Genet Evol.** v.12, n. 2, p. 240-53, 2012.

ZINGALES, B.;COLLI, W. **Trypanosoma cruzi:** Interaction with host cells. Current topics in microbiology and immunology, Germany, v.117, p.129- 152, 1985.