



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

RACQUEL OLIVEIRA DA SILVA SOUZA

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE
POLISSACARÍDEOS VEGETAIS**

FORTALEZA

2017

RACQUEL OLIVEIRA DA SILVA SOUZA

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE
POLISSACARÍDEOS VEGETAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S235e Souza, Racquel Oliveira da Silva.
Estudo in vitro da atividade tripanocida de polissacarídeos vegetais / Racquel Oliveira da Silva Souza. –
2017.
155 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos -
Associação UFC/UEPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. Trypanosoma cruzi. 2. polissacarídeos vegetais. 3. necrose. 4. stress oxidativo. I. Título.

CDD 615.1

RACQUEL OLIVEIRA DA SILVA SOUZA

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE
POLISSACARÍDEOS VEGETAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em: 08/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
(UNILAB)

Profa. Dra. Maria Gonçalves Pereira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Isabel Cristina Oliveira de Moraes
Centro Universitário Católica de Quixadá

A Deus, por me guiar pelos caminhos que jamais imaginei chegar. Por sempre me iluminar e me abençoar.

Aos meus pais, Francisco e Sebastiana, pelo amor, pelas orações e palavras positivas.

Ao meu esposo, Márcio, pelo amor, apoio e companherismo.

Aos meus tios (as), primos (as), sogro (a), cunhado (a), por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins, pela acolhida, oportunidade, confiança e orientação. Por toda ajuda e por ser esse ser iluminado.

À profa. Dra. Maria Gonçalves Pereira, pela colaboração e doação dos polissacarídeos para a realização deste trabalho.

À amiga Paloma Leão, por ter te conhecido desde o mestrado na UECE, pelo companherismo, torcida, pela sua alegria e por me ensinar as metodologias necessárias para a execução desse trabalho.

Às amigas de doutorado, Paloma Leão, Renata Eleutério e Suelen Carneiro, pela amizade, ajuda, pelas viagens e por tornarem a caminhada mais leve.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT), Ramon, Tiago, Jáder, Louise, Dânya, Gdayllon, Clarissa, Izabel, Lívia, Marcus Felipe, Márcia, Gabriela, Mariana, Marília, Luiza, Thaiany, Raíssa, Isabella, Brenna e Emanuel, pelos momentos de descontração, por compartilhar nossas dificuldades, pela ajuda direta e indireta nos experimentos, pela aprendizagem e pela torcida.

Aos alunos do Laboratório de Polissacarídeos Bioativos (LAPOBIO), pela extração e fracionamento dos polissacarídeos.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT-UFC), pela disponibilização dos equipamentos.

A Central Analítica da UFC, pela realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

À Banca examinadora, pelo aceite ao convite.

À coordenação, aos professores e a secretaria do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, pela atenção, ensinamentos e auxílio.

À todos os funcionários que fazem parte do Departamento de Farmácia (UFC), pela recepção e manutenção deste espaço.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

*“Ora, a fé é o firme
fundamento das coisas que se esperam, e
a prova das coisas que não se vêem.”*

Hebreus 11:1

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* é considerada uma doença tropical negligenciada. No Brasil, apenas o benzonidazol é utilizado no tratamento apresentando eficácia limitada e efeitos adversos relevantes. Produtos naturais de plantas são uma fonte promissora de drogas para o combate de infecções por *T. cruzi*. Na busca de alternativas terapêuticas, o presente trabalho avaliou o efeito de polissacarídeos vegetais sobre as formas evolutivas de *T. cruzi* e investigou seu mecanismo de ação. O pó obtido das partes vegetais (5 g) foi suspenso em metanol, homogeneizado e filtrado. O resíduo foi suspenso em NaOH 0,1 M (1:50, p/v), homogeneizado e centrifugado (1445 x g, 15 min., TA). Os sobrenadantes foram reunidos, neutralizados, precipitados e centrifugado. O precipitado foi dialisado, centrifugado e o sobrenadante liofilizado (polissacarídeos totais-PLT). Os PLT foram dissolvidos em água destilada (2:1, p/v), aplicados em cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e as frações acídicas eluídas com NaCl (0,1-1,0 M). As frações majoritárias (FI e FII) foram dialisadas e liofilizadas. PLT e frações foram analisados quanto aos teores de carboidratos, ácido urônico e proteínas. Os polissacarídeos foram avaliados sobre as formas epimastigotas (24, 48, 72h), tripomastigotas (24h), amastigota (24 e 48h) de *T. cruzi*. Foi também avaliada a citotoxicidade sobre células LLC-MK₂ (MTT). Ensaio de citometria de fluxo (7AAD/anexina V, Rho123, H₂DCFH-DA e Laranja de Acridina) foram realizados para a avaliação do mecanismo de morte celular. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para observar possíveis alterações ultraestruturais. Os PLT e frações apresentaram altos teores de carboidratos (23-54,6%), ácido urônico (9-30%) e baixa contaminação protéica (0,56-5%). Os PLT de todas as espécies inibiram o crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas, dentre estas os PLT das folhas de *G. americana* destacaram-se por apresentarem as menores CI₅₀ frente aos ensaios tripanocidas, além de baixa citotoxicidade sobre LLC-MK₂. PLT [epimastigota (CI_{50/24h} = 740±0,07 µg/mL; CI_{50/48h} = 710±0,05 µg/mL; CI_{50/72h} = 870±0,05 µg/mL); tripomastigota (LC₅₀ = 470±0,08 µg/mL)]; LLC-MK₂ (CC₅₀=2250±0,07 µg/mL)]. Quanto as frações (FI e FII), apenas FI apresentou CI₅₀ para formas epimastigotas [(CI_{50/24 h} = 580±0,17 µg/mL; CI_{50/48 h} = 530±0,13 µg/mL; CI_{50/72 h} = 500±0,14 µg/mL)]. Já em tripomastigotas apresentaram as seguintes LC₅₀: FI (LC₅₀ = 100±0,09 µg/mL) e FII (LC₅₀ = 23±0,06 µg/mL). FI e FII não causaram toxicidade sobre as células hospedeiras, apresentando índice de seletividade superior a 15 (FI) e 65 (FII). PLT (235 e 470 µg/mL) e frações [FI (50 e 100 µg/mL); FII (11,5 e 23 µg/mL)] também apresentaram efeito antimastigota, com redução do percentual de células infectadas, do número de amastigotas/células e do índice de sobrevivência. Ensaio de citometria de fluxo com 7AAD/anexina V, demonstraram uma maior população de parasitos marcados com 7-AAD, nas concentrações avaliadas [PLT (CI₅₀ -740 µg/mL) e FI (CI₅₀ - 580 µg/mL)] sugerindo morte induzida por necrose. Em seguida foram realizados ensaios com Rho 123, H₂DCFH-DA e Laranja de Acridina, para investigar as alterações do potencial transmembrânico mitocondrial, envolvimento de EROs e a detecção de vacuólos acídicos. Os resultados demonstraram que houve alteração do potencial transmembrânico e aumento de EROs. A via de morte celular do *T.cruzi* por mecanismo necrótico foi confirmada por MEV, onde foi observado alterações no formato típico, arredondamento e encurtamento do parasito e degradação da membrana celular com poros. Em conclusão, os polissacarídeos de todas as espécies vegetais inibiram o crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas, dentre estas os polissacarídeos das folhas de *G. americana* inibiram todas as formas evolutivas de cepa Y de *T. cruzi*, com alto índice de seletividade (FII), com indução de necrose e *stress* oxidativo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, polissacarídeos vegetais, necrose, *stress* oxidativo.

ABSTRACT

Chagas disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* is considered a neglected tropical disease. In Brazil, only benznidazole is used in treatment with limited efficacy and relevant adverse effects. Natural plant products are a promising source of drugs for the fight against *T. cruzi* infections. In the search for therapeutic alternatives, the objective was to evaluate the effect of plant polysaccharides on the evolutionary forms of *T. cruzi* and to investigate its mechanism of action. The powder obtained from the vegetable parts (5 g) was suspended in methanol, homogenized and filtered. The residue was suspended in 0.1 M NaOH (1:50, w/v), homogenized and centrifuged (1445 x g, 15 min, r.t). Supernatants were pooled, neutralized, precipitated and centrifuged. The precipitate was dialyzed, centrifuged and the lyophilized supernatant (total polysaccharides-TP). The TP were dissolved in distilled water (2: 1, w/v), applied in ion exchange chromatography (DEAE-cellulose) and acidic fractions eluted with NaCl (0.1-1.0 M). The majority fractions (FI and FII) were dialysed and lyophilized. TP and fractions were analyzed for carbohydrate, uronic acid and protein contents. The polysaccharides were evaluated on epimastigotes (24, 48, 72 h), trypomastigotes (24 h), amastigote (24 and 48h). Cytotoxicity on LLC-MK2 cells (MTT) was also evaluated. Flow cytometry assays (7AAD/annexin V, Rho123, H₂DCFH-DA and Acridine Orange) were performed for the evaluation of the mechanism of cell death. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe possible ultrastructural changes. TP of all species inhibited the growth of epimastigote and trypomastigote forms, among these the TP of the leaves of *G. americana* were distinguished by their lower IC₅₀ compared to the trypanocidal assays, in addition to low cytotoxicity on LLC-MK₂. TP [epimastigote (IC₅₀/24h = 740 ± 0.07 µg / mL; IC₅₀/48h = 710±0.05 µg / mL; IC₅₀/72h = 870±0.05 µg/mL); trypomastigote (LC₅₀ = 470±0.08 µg/ml)]; LLC-MK2 (CC₅₀ = 2250±0.07 µg/mL)]. As for fractions (FI and FII), only FI presented IC₅₀ for epimastigote forms [IC₅₀/24 h = 580±0.17 µg/mL; IC₅₀/48 h = 530±0.13 µg/mL; IC₅₀/72 h = 500±0.14 µg mL)]. In trypomastigotes, the following LC₅₀ were present: FI (LC₅₀ = 100±0.09 µg/mL) and FII (LC₅₀ = 23±0.06 µg/mL). FI and FII did not cause toxicity on the host cells, with a selectivity index higher than 15 (FI) and 65 (FII). TP (235 and 470 µg/mL) and fractions [FI (50 and 100 µg/mL); FII (11.5 and 23 µg/mL)] also showed antimastigote effect, with a reduction in the percentage of infected cells, number of amastigotes/cells and survival index. After 7AAD/annexin V, flow cytometry assays demonstrated a higher population of 7-AAD-labeled parasites at the concentrations tested [TP (IC₅₀ -740 µg/mL) and FI (IC₅₀ – 580 µg/mL)] suggesting that death induced by the polysaccharides is predominantly by necrosis. Then, Rho 123, H₂DCFH-DA and Acridine Orange tests were performed to investigate the changes of the mitochondrial transmembrane potential, the involvement of RO_s and detection of acidic vacuoles. The results showed that there was alteration of transmembrane potential and increase of RO_s. The cell death pathway of *T.cruzi* by a necrotic mechanism was confirmed by MEV, which demonstrated changes in the typical format, rounding and shortening of the parasite and degradation of the cell membrane with pores. In conclusion, the polysaccharides of all plant species inhibited the growth of the epimastigotes and trypomastigote forms, among which the polysaccharides of *G. americana* leaves inhibited all evolutionary forms of Y strain of *T. cruzi*, with high selectivity index (FII), with induction of necrosis and oxidative stress.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, plant polysaccharides, necrosis, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> nos anos de 2010 a 2013.	20
Figura 2 - Distribuição dos surtos da doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, no período de 2005 a 2013.	21
Figura 3 - Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	23
Figura 4 - Estruturas celulares da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	24
Figura 5 - Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	29
Figura 6 - Curso natural da infecção por <i>T. cruzi</i> .	31
Figura 7 - Vias de morte celular.	35
Figura 8 - <i>Azadirachta indica</i> . (A) Flor; (B) Fruto.	41
Figura 9 - <i>Caesalpinia ferrea</i> . (A) Casca do caule; (B) Flor; (C) Vagem.	42
Figura 10 - <i>Geoffroea spinosa</i> . (A) Folhas; (B) Flor e Fruto.	43
Figura 11 - <i>Ximenia americana</i> . (A) Árvore; (B) Flor e Folhas; (C) Fruto.	43
Figura 12 - <i>Genipa americana</i> . (A) Folhas e espinhos; (B) Caule; (C) Fruto.	44
Figura 13 - Esquema do delineamento experimental.	49
Figura 14 - Esquema da extração dos PLT.	51
Figura 15 - Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	53
Figura 16 - Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	55
Figura 17 - Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer.	57
Figura 18 - Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos vegetais sobre células LLC-MK ₂ .	58
Figura 19 - Protocolo de processamento das amostras para análise do perfil de morte celular.	61
Figura 20 - Protocolo de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.	63
Figura 21 - Protocolo de avaliação da tumefação de reservossomos.	64
Figura 22 - Protocolo de avaliação para a marcação com diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (H ₂ DCFH-DA).	65
Figura 23 - Ensaio de bloqueio da atividade dos polissacarídeos com catalase.	66
Figura 24 - Processamento e análise de amostras de <i>T. cruzi</i> por microscopia eletrônica	67

de varredura.

Figura 25 - Efeito dos PLT de <i>A. indica</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	71
Figura 26 - Efeito dos PLT de <i>C. ferrea</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	72
Figura 27 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	73
Figura 28 - Efeito dos PLT de <i>G. spinosa</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	74
Figura 29 - Efeito dos PLT de <i>X. americana</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	75
Figura 30 - Efeito dos PLT de <i>A. indica</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	76
Figura 31 - Efeito dos PLT de <i>C. ferrea</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	77
Figura 32 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	77
Figura 33 - Efeito dos PLT de <i>G. spinosa</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	78
Figura 34 - Efeito dos PLT de <i>X. americana</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	78
Figura 35 - Efeito dos PLT de <i>A. indica</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	79
Figura 36 - Efeito dos PLT de <i>C. ferrea</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	80
Figura 37 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	80
Figura 38 - Efeito dos PLT de <i>G. spinosa</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	81
Figura 39 - Efeito dos PLT de <i>X. americana</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	81
Figura 40 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .	84
Figura 41 - Fotomicrografia de células LLC-MK ₂ infectadas com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com os PLT de <i>G. americana</i> .	85
Figura 42 - Perfil de morte celular induzido pelos PLT de <i>G. americana</i> avaliado por citometria de fluxo.	86
Figura 43 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	87
Figura 44 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre os reservossomos de <i>T. cruzi</i> .	88
Figura 45 - Efeito dos PLT de <i>G. americana</i> sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.	89
Figura 46 - Alterações ultraestruturais induzidas pelos PLT de <i>G. americana</i> em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	91
Figura 47 - Efeito da fração FI de <i>G. americana</i> sobre formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	93
Figura 48 - Efeito da fração FII de <i>G. americana</i> sobre formas epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	94

Figura 49 - Efeito das f-PL de <i>G. americana</i> sobre formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	95
Figura 50 - Efeito das frações de <i>G. americana</i> sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂ .	96
Figura 51 - Efeito da fração FI de <i>G. americana</i> em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .	98
Figura 52 - Efeito da fração FII de <i>G. americana</i> em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> .	99
Figura 53 - Fotomicrografia de células LLC-MK ₂ infectadas com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 h de tratamento com as f-PL de <i>G. americana</i> .	100
Figura 54 - Fotomicrografia de células LLC-MK ₂ infectadas com formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 48 h de tratamento com as f-PL de <i>G. americana</i> .	101
Figura 55 - Perfil de morte celular induzido pela FI de <i>G. americana</i> avaliado por citometria de fluxo.	103
Figura 56 - Efeito da FI de <i>G. americana</i> sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.	104
Figura 57 - Alterações ultraestruturais induzidas por FI de <i>G. americana</i> em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	106

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Atividade antiparasitária *in vitro* dos PLT e do BZ sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e células LLC-MK₂. 82
- Tabela 2 - Avaliação da influência de H₂O₂ sobre o efeito antiparasitário dos PLT de *G. americana*. 90
- Tabela 3 - Avaliação da influência de H₂O₂ sobre o efeito antiparasitário da FI de *G. americana*. 105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	<i>7' amino actinomicyn D</i>
Anexina V/PE	Anexina V marcada com ficoeritrina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BZ	Benzonidazol
CAT	Catalase
CC ₅₀	Concentração Capaz de inibir o crescimento de 50% do parasito
CG	Cromatografia Gasosa
CO ₂	Dióxido de carbono
CNE-2	Células de Carcinoma nasofaríngeal
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DCF	Diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos
FD	Fator de Diluição
FECLESC	Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central
f-PL	Frações Polissacarídicas
GMPLY	Galactomanana do Líquen <i>Ramalia celastri</i>
H	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorofluoresceína
HCl	Ácido Clorídrico
HepG2	Células de Hepatocarcinoma Humano
IFA	<i>Imunofluorescência Indireta da Imunoabsorção</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco

LAPOBIO	Laboratório de Polissacarídeos Bioativos
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LC ₅₀	Concentração que causa 50% de morte em tripomastigotas
LLC-MK ₂	Célula de Mamíferos <i>Rhesus Monkey Kidney</i>
LNDT	Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais
MCP	Morte Celular Programada
MIN	Minuto
MRBs	Modificadores Exógenos de Respostas Biológicas
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5difeniltetrazólio
NaCL	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NFX	Nifurtimox
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIDC	Programa Integrado de Doença de Chagas
PLT	Polissacarídeos Totais
RPM	Rotações por Minuto
Rho123	Rodamina 123
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Surfactante Dodecilsulfato de Sódio
SeI	Índice de Seletividade
SuI	Índice de Sobrevivência
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura Ambiente
UFC	Universidade Federal do Ceará
$\Delta\Psi_m$	Potencial Transmembrânico Mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Doença de Chagas: histórico e epidemiologia	19
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.3	Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.4	Vias de transmissão	25
1.4.1	<i>Transmissão vetorial</i>	25
1.4.2	<i>Transmissão congênita</i>	26
1.4.3	<i>Transmissão oral</i>	26
1.4.4	<i>Transmissão transfusional</i>	27
1.4.5	<i>Transmissão transplantar</i>	27
1.5	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.6	Evolução clínica da doença de Chagas	30
1.7	Tratamento farmacológico	32
1.8	Mecanismos de morte celular	34
1.9	Produtos naturais com atividade antiparasitária	36
1.10	Polissacarídeos vegetais: atividades biológicas	38
1.11	Espécies vegetais	41
1.11.1	<i>Azadirachta indica</i>	41
1.11.2	<i>Caesalpinia ferrea</i>	41
1.11.3	<i>Geoffroea spinosa</i>	42
1.11.4	<i>Ximenia americana</i>	43
1.11.5	<i>Genipa americana</i>	44
2	JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Materiais	47
4.1.1	<i>Plantas</i>	47
4.1.2	<i>Preparo das soluções</i>	47
4.1.3	<i>Linhagens celulares</i>	47
4.1.4	<i>Reagentes</i>	48

4.2	Métodos	49
4.2.1	<i>Desenho experimental</i>	49
4.2.2	<i>Obtenção dos polissacarídeos vegetais</i>	50
4.2.3	<i>Ensaio com formas epimastigotas cepa Y de T. cruzi</i>	51
4.2.3.1	<i>Cultivo e manutenção das formas epimastigotas</i>	51
4.2.3.2	<i>Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas epimastigotas</i>	52
4.2.4	<i>Ensaio com formas tripomastigotas cepa Y de T. cruzi</i>	53
4.2.4.1	<i>Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas</i>	53
4.2.4.2	<i>Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais sobre as formas tripomastigotas</i>	54
4.2.5	<i>Ensaio de citotoxicidade em células hospedeiras (LLC-MK₂)</i>	55
4.2.5.1	<i>Cultivo e manutenção das células LLC-MK₂</i>	55
4.2.5.2	<i>Determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos vegetais em células LLC-MK₂</i>	56
4.2.6	<i>Ensaio com formas amastigotas cepa Y de T. cruzi</i>	59
4.2.6.1	<i>Cultivo das formas amastigotas</i>	59
4.2.6.2	<i>Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais sobre formas amastigotas cepa Y de T. cruzi</i>	59
4.2.7	<i>Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo</i>	60
4.2.7.1	<i>Avaliação de apoptose e/ou necrose</i>	60
4.2.7.2	<i>Avaliação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	62
4.2.7.3	<i>Avaliação da tumefação de reservossomos</i>	63
4.2.7.4	<i>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio</i>	64
4.2.8	<i>Bloqueio da atividade antiparasitária dos polissacarídeos com catalase</i>	66
4.2.9	<i>Avaliação das alterações morfológicas induzidas pelos polissacarídeos em T. cruzi</i>	66
4.2.10	<i>Análise estatística</i>	68
	PARTE 1: Estudo <i>in vitro</i> da atividade tripanocida dos extratos polissacarídicos em cepa Y de Trypanosoma cruzi	69
5	RESULTADOS	70
5.1	Efeitos dos extratos polissacarídicos vegetais nas formas epimastigotas de T. cruzi	70
5.2	Efeitos dos extratos polissacarídicos vegetais nas formas	76

	tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	
5.3	Efeito citotóxico dos extratos polissacarídicos vegetais sobre a viabilidade de células LLC-MK ₂	79
5.4	PLT de <i>G. americana</i> reduz o número de amastigotas	83
5.5	PLT de <i>G. americana</i> induz morte celular por necrose	85
5.6	PLT de <i>G. americana</i> induz alteração no potencial transmembrânico mitocondrial	87
5.7	PLT de <i>G. americana</i> não induz morte celular por autofagia	88
5.8	PLT de <i>G. americana</i> induz a produção de EROs	89
5.9	H ₂ O ₂ não influencia o efeito antiparasitário dos PLT de <i>G. americana</i>	90
5.10	PLT de <i>G. americana</i> promove alterações morfológicas em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	91
	PARTE 2: Estudo <i>in vitro</i> da atividade tripanocida das frações polissacarídicas isoladas das folhas de <i>Genipa americana</i> em cepa Y de <i>Trypanossoma cruzi</i>	92
6	RESULTADOS	93
6.1	FI e FII reduzem a viabilidade celular de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	93
6.2	FI e FII reduzem a viabilidade celular de formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	95
6.3	FI e FII não reduzem a viabilidade de células LLC-MK ₂	96
6.4	FI e FII reduzem o número de amastigotas	97
6.5	Fração de <i>G. americana</i> induz morte celular por necrose	102
6.6	Fração de <i>G. americana</i> induz a produção de EROs	102
6.7	H ₂ O ₂ não influencia o efeito antiparasitário de FI de <i>G. americana</i>	105
6.8	Fração (FI) de <i>G. americana</i> promove alterações morfológicas em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	106
7	DISCUSSÃO	107
8	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICE	149

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: histórico e epidemiologia

No ano de 1909, no município de Lassance, Minas Gerais, o cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas fez a descoberta da Tripanossomíase Americana, conhecida popularmente por doença de Chagas (DC). Neste período, Chagas observou a presença abundante de barbeiros nas casas de pau-a-pique típicas da região, caracterizando-os como insetos hemípteros da família Reduviidae e subfamília Triatominae. Além disso, identificou também o agente etiológico da doença, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, descreveu as formas clínicas da doença e os comprometimentos dos sistemas digestivo, cardíaco e neurológico. Hoje, essa doença é considerada negligenciada e possui ampla distribuição pelo mundo (CHAGAS, 1909; CHAGAS, 1911; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009; SILVEIRA, 2011).

A DC é endêmica em 21 países latino-americanos, do sul dos Estados Unidos (EUA) ao norte da Argentina e do Chile. Tem se limitado a áreas rurais pobres da América Central e do Sul, onde a transmissão vetorial é a principal via de contágio (FELICIANGELI et al., 2003; SAMUELS et al., 2013).

Com a recente migração interna das áreas rurais para as áreas urbanas, a transmissão congênita e a doação de sangue permitiram que a doença se espalhasse para regiões anteriormente não afetadas, principalmente para as grandes áreas urbanas, onde os ciclos da doença urbana foram estabelecidos em áreas periféricas (BOWMAN et al., 2008). A prevalência da infecção por *T. cruzi* é mais alta na Bolívia, Argentina, Paraguai, Equador, El Salvador e Guatemala (WHO, 2010). Nos EUA, ciclos enzoóticos de transmissão de *T. cruzi* foram estabelecidos em algumas áreas dos estados do sul, embora apenas algumas infecções autóctones tenham sido relatadas (BERN et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2016).

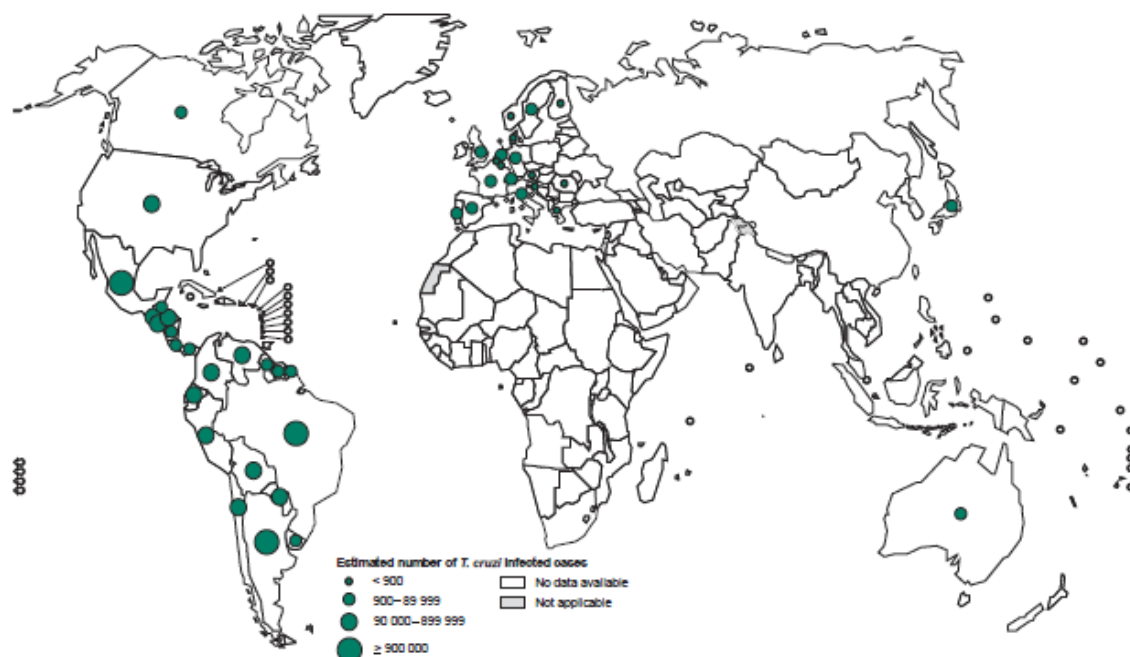
Desde o início da década de 90, as medidas mais eficazes para o controle da DC na América Latina foram programas de controle vetorial e testes obrigatórios para bancos de sangue (YAMAGATA; NAKAGAWA, 2006; WHO, 2002). Consequentemente, a prevalência diminuiu substancialmente, e a transmissão vetorial foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999, e na maior parte do Brasil em 2000 (WHO, 2002, SALVATELLA; IRABEDRA; CASTELLANOS, 2014). No entanto, a frequência de transmissão aumentou em regiões como a bacia amazônica

(transmissão oral) (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012) e algumas áreas do Gran Chaco (devido à resistência aos piretróides pelo vetor) (GUREVITZ et al., 2013).

A DC atravessou fronteiras internacionais e tornou-se uma epidemia global (SCHMUNIS; YADON, 2010), na medida em que pode ser transmitida em regiões não endêmicas. A prevalência de infecção em migrantes latino-americanos que vivem na Europa é estimada em 4,2%, com maior prevalência entre migrantes da Bolívia (18,1%) e do Paraguai (5,5%) (REQUENA-MENDEZ et al., 2015). Nos EUA, cerca de 300.000 imigrantes são estimados com infecção por *T. cruzi* (BERN; MONTGOMERY, 2009). No entanto, o índice estimado de subdiagnóstico é de cerca de 95% (BASILE et al., 2011) somados a experiência insuficiente dos profissionais de saúde nessa área (STIMPERT; MONTGOMERY, 2010).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima em 8 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina, com mais de 10.000 mortes por ano (WHO, 2017). A figura 1 apresenta a distribuição mundial da DC.

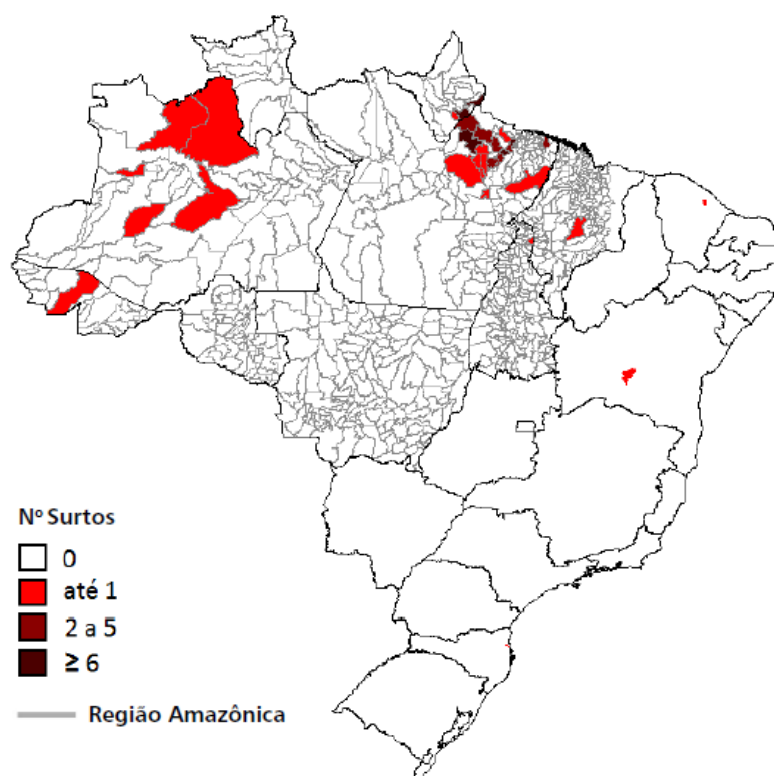
Figura 1 - Distribuição mundial de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* nos anos de 2010 a 2013.



No Brasil, a prevalência da DC teve início entre os anos de 1975 e 1980, na população rural, com aproximadamente 6,5 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Em 1996, o número foi estimado para 1,96 milhões de pessoas infectadas e, posteriormente, após 2000, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) estimou o número de pessoas expostas ao risco em áreas endêmicas em 21,8 milhões, sendo de 1,9 milhões o número de pessoas infectadas. Neste estudo, as maiores prevalências foram verificadas em mulheres, maiores de 60 anos, residentes nas regiões Nordeste e Sudeste e em áreas mistas, urbana/rural (DIAS et al., 2016)

Entre os anos de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos da doença de Chagas aguda (DCA), onde a maioria destes casos (1.430 - 91,1%) concentrava-se na região Norte, seguidos das regiões Nordeste (73 - 4,7%), Sul (28 - 0,2%), Centro-Oeste (27 - 1,8%) e Sudeste (12 - 0,8%) (Figura 2). Ressalta-se que o estado do Pará foi responsável por 75% de todos os casos no país e por 82% dos casos da região Norte (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015).

Figura 2 - Distribuição dos surtos da doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil, no período de 2005 a 2013.



Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014

1.2 *Trypanosoma cruzi*

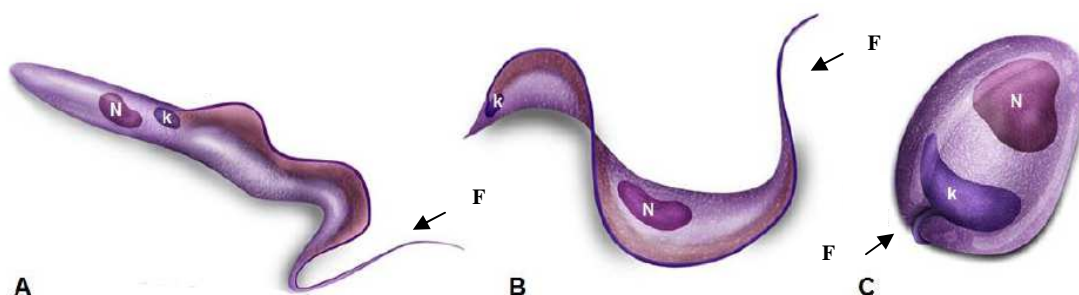
O agente etiológico da doença, um protozoário flagelado pertencente ao filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (NEVES; FILIPPIS, 2010). São parasitos heteroxenos, que apresentam uma variedade de hospedeiros vertebrados, representados por diferentes animais domésticos e silvestres. Quanto aos hospedeiros invertebrados são representados por numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae, conhecidos popularmente como “barbeiros” (NEVES; FILIPPIS, 2010).

O *T. cruzi* possui ciclo de vida complexo que requer passagem obrigatória por um hospedeiro invertebrado, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado (BONNEY; ENGMAN, 2010). Durante seu ciclo de desenvolvimento, o parasito apresenta três formas evolutivas morfológica e funcionalmente distintas: epimastigota, forma replicativa não infectante, presente no intestino superior do inseto; tripomastigota, forma não replicativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto e sangue periférico; e amastigota, forma replicativa intracelular (Figura 3) (ABE et al., 2002; ROMERO; MORILLA, 2010).

A forma epimastigota possui forma alongada e achatada, o cinetoplasto situa-se próximo ao núcleo e a bolsa flagelar abre-se lateralmente. O flagelo emerge afastado da extremidade anterior, porém se mantém colado à membrana do citossomo por uma prega da bainha flagelar denominada “membrana ondulante” porção não funcional que acompanha o flagelo. Este se torna livre só depois de ultrapassar o pólo anterior da célula (BRENER et al., 2000; SOUZA, 2013; REY, 2013).

As formas tripomastigotas são classificadas em metacíclicas e sanguíneas. Os tripomastigotas metacíclicos são encontrados em hospedeiros invertebrados, apresentam forma fina, com cinetoplasto grande, redondo e afastado da extremidade posterior, núcleo alongado e de estrutura frouxa, membrana ondulante estreita e curto flagelo livre (NEVES; FILIPPIS, 2010; REY, 2013). Enquanto que os tripomastigotas sanguíneos são encontrados nos hospedeiros vertebrados, podendo apresentar formas finas ou largas, o citossomo quando fixado, adota em geral a forma de um “C”, outras vezes a de um “S”, com extremidade posterior. A membrana ondulante tem proporção estreita e pouco pregueada, o segmento livre do flagelo representa aproximadamente um terço do comprimento total e o núcleo ocupa uma porção média do corpo celular (BRENER et al., 2000; NEVES; FILIPPIS, 2010; REY, 2013).

Figura 3 – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: (A) Epimastigota, (B) Tripomastigota, (C) Amastigota. N= núcleo, k= cinetoplasto, F= flagelo.
 Fonte: Adaptado de ESCHENAZI (2009).

A forma amastigota apresenta pequenas dimensões e contornos circulares, ovoides ou fusiformes. O corpo é achatado, com pouco citoplasma e núcleo redondo e excêntrico com tamanho relativamente grande. O cinetoplasto se faz bem visível na microscopia óptica, sendo o oposto do flagelo, por estar invaginado ao segmento intracelular, logo não sendo evidenciado em preparações coradas e examinadas. A mobilidade desta forma do parasito é quase nula devido à ausência da parte externa do flagelo. Esta forma evolutiva encontra-se em hospedeiros vertebrados e possui localização intracelular (REY, 2013; SOUZA, 2013).

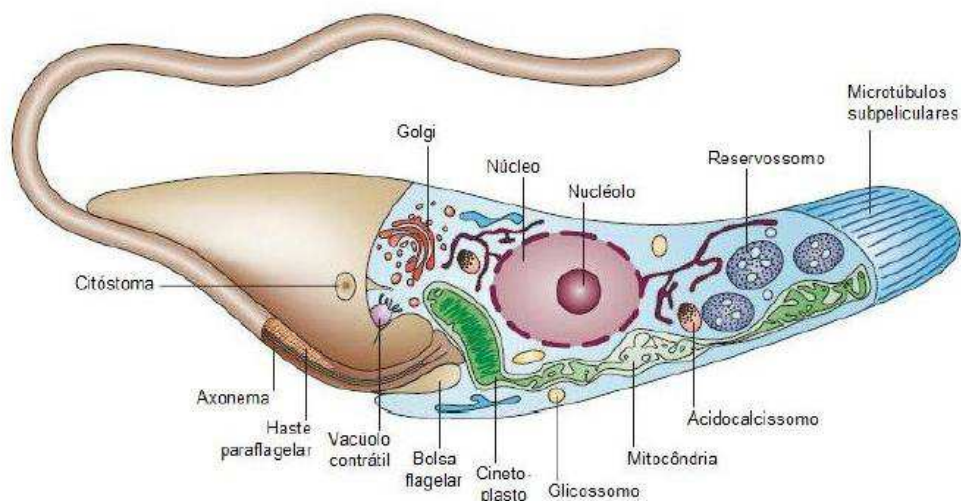
1.3 Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

Semelhantemente a outros eucariotos, os tripanosomatídeos apresentam diversas estruturas e organelas (Figura 4), algumas delas são encontradas em outros organismos, enquanto que outras são exclusivas, exercendo funções essenciais para sua sobrevivência e interação com hospedeiros.

O flagelo, que emerge ao longo do parasito, é responsável pela mobilidade das formas tripomastigotas e epimastigotas (DE SOUZA, 2002; ELIAS et al., 2007). A mitocôndria contém uma região especializada conhecida como cinetoplasto onde se localiza uma vasta rede de ácido desoxirribonucléico (DNA), chamado de DNA do

cinetoplasto (kDNA) (LIU et al., 2005; DE SOUZA, 2009). Nas formas epimastigotas e amastigotas, o cinetoplasto apresenta uma morfologia similar (STUART et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011).

Figura 4 – Estruturas celulares da forma epimastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de DOCAMPO et al., 2005.

O núcleo apresenta um diâmetro de aproximadamente 2,5 μm , com cromatina altamente condensada, associada à face interna do envelope nuclear que apresenta continuidade com a membrana do retículo endoplasmático. Nas formas tripomastigotas o núcleo é central e alongado, enquanto que nas formas epimastigotas e amastigotas apresenta-se arredondado e com nucléolo evidente (DE SOUZA, 2002).

Os reservossomos apresentam forma esférica e são encontrados na região posterior de formas epimastigotas. Essas organelas são únicas e apresentam papel central no ciclo de vida do *T. cruzi*, em particular, nos epimastigotas. Além de armazenar macromoléculas e concentrar hidrolases lisossômicas, também degradam e regulam proteínas (SOARES, 1999; DE SOUZA, 2002).

Outra organela importante para *T. cruzi*, assim como para outros tripanosomatídeos, são os acidocalcissomos, que estão envolvidos em diversas funções, tais como armazenamento do cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e fósforo; contribuindo para a osmorregulação celular, em associação com o vacúolo contrátil (DE SOUZA, 2002; MIRANDA et al., 2008). Os microtúbulos subpeliculares conferem maior resistência mecânica ao parasito (DE SOUZA, 2009; MENNA-BARRETO et al.,

2009). Os glicossomos são estruturas distribuídas no citoplasma e representam um tipo especializado de peroxissomo, albergando algumas enzimas da via glicolítica, que em outros organismos, localizam-se no citoplasma (HANNAERT et al., 2003).

Algumas estruturas especializadas da membrana plasmática conhecidas como microdomínios apresentam características distintas e estão envolvidas em funções vitais no protozoário (DE SOUZA, 2002; 2009; PARSONS, 2004). O citóstoma é uma dessas estruturas, visualizado nas formas amastigotas e epimastigotas, está localizado próximo à bolsa flagelar, constituído de uma profunda invaginação da membrana que se estende até a região do núcleo. Juntos o citóstoma e a bolsa flagelar estão envolvidos na absorção de nutrientes, através do mecanismo de endocitose (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; PORTO-CARREIRO et al., 2000; DE SOUZA, 2009).

1.4 Vias de transmissão

1.4.1 Transmissão vetorial

Por essa via é necessário que ocorra a interação vetor-hospedeiro, onde o vetor é o principal elo na cadeia dessa modalidade de transmissão. O *T. cruzi* desenvolve-se principalmente em insetos da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Os triatomíneos são considerados os vetores mais importantes da doença (SILVEIRA; DIAS, 2011).

O *T. cruzi* infecta mais de 100 espécies de mamíferos domésticos e silvestres e pode ser transmitido por mais de 150 espécies de triatomíneos. Existem 15 gêneros que transmitem a infecção para seres humanos, representados principalmente por *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (WHO, 2015), agrupados em cinco principais espécies com a seguinte distribuição geográfica: *Triatoma infestans* é encontrado normalmente no sudeste da América do Sul; *Rhodnius prolixus* no norte da América do Sul e América Central; *Triatoma dimidiatas* América do Sul e Central e México; *Panstrongylus megistus* na região do sudoeste dos Estados Unidos e central da Argentina, Brasil e Paraguai e *Triatoma brasiliensis* no Brasil (GALVÃO et al., 2003).

No Brasil a transmissão vetorial foi substancialmente reduzida frente aos avanços tecnológicos utilizados no controle das atividades de vigilância epidemiológica, juntamente com estratégias para a identificação da presença do vetor, desencadeando assim ações de combate ao mesmo. O controle da transmissão vetorial foi realizado com

êxito em diversos países do Cone Sul (FERREIRA; SILVA, 2006; SOBREIRA et al, 2001).

Apesar das medidas adotadas, o Brasil ainda apresenta cerca de dois a três milhões de pessoas cronicamente infectadas com o parasito (MARTINS-MELO et al., 2012). Atualmente, as regiões de risco para a transmissão vetorial estão concentradas em: Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe, São Paulo e Tocantins. Estas são áreas em que a Secretaria de Vigilância em Saúde do país visa realizar uma vigilância epidemiológica com a finalidade de detecção vetorial e de prevenção a formação de colônias domiciliares do vetor (MINUZZI-SOUZA et al., 2016).

1.4.2 Transmissão congênita

A transmissão vertical da DC acontece predominantemente pela via transplacentária, que ocorre tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença em qualquer período da gestação, sendo mais provável no último trimestre. Porém, a transmissão também pode acontecer no canal do parto, através do contato de mucosas do feto com o sangue da mãe contaminado por *T. cruzi* (GONTIJO et al, 2009).

Segundo dados da OMS, estima-se que 1.125.000 mulheres em idade fértil estão infectadas com *T. cruzi* na América Latina, com incidência de infecção congênita de cerca de 8.668 casos anualmente e aproximadamente 50% destes casos ocorrem no México, Argentina e Colômbia (WHO, 2015).

Contudo, é importante ressaltar que mulheres infectadas em idade reprodutiva podem transmitir o parasito aos seus descendentes durante sucessivas gestações, desta forma esta via é considerada um importante problema de saúde, visto que pode ser facilmente disseminado no tempo e no espaço, devido as migrações (CARLIER; TRUYERS, 2010).

1.4.3 Transmissão oral

Várias são as possibilidades de transmissão oral do *T. cruzi*, entre elas estão, ingestão de leite materno da mãe infectada; ingestão de sangue de mamífero infectado; ingestão de carne mal cozida de mamífero infectado, especialmente reservatórios

silvestres; ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes ou urina de triatomíneos infectados por *T. cruzi*; ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com urina ou secreção perianal de marsupiais infectados por *T. cruzi* (CHIEFFI; AMATO NETO, 2000; DIAS; AMATO NETO, 2011; REY, 2013).

Registros epidemiológicos no Brasil remetem que a transmissão oral de *T. cruzi* vem ampliando a sua relevância, registrando surtos ou microepidemias, principalmente, nos estados do Amazonas, Rio Grande do Sul, Pará, Paraíba, Santa Catarina, Bahia e Ceará (DIAS; AMATO NETO, 2011).

O Ministério da Saúde contabilizou 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo em sua totalidade 35 municípios da Região Amazônica. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles, açaí, bacaba, jaci, caldo de cana e palmito de babaçu (DIAS et al., 2016).

1.4.4 Transmissão transfusional

A transmissão de *T. cruzi* através da transfusão sanguínea teve sua ampliação devido ao processo de expansão da doença para as grandes cidades e capitais de países endêmicos na América Latina (DIAS et al., 2016). Estima-se que 60% dos indivíduos contaminados residem em espaços urbanos e nas grandes metrópoles, destes, aproximadamente 50% o parasito é identificado apenas na fase crônica constituindo um grupo de potenciais doadores de sangue, aumentando assim o risco da DC transfusional (CIMERMAN; CIMERMAM, 2008).

Na década de 80, o Brasil iniciou um rigoroso controle sobre os bancos de sangue, como alternativa no controle da transmissão por transfusão sanguínea. De fato, os números mostraram que na América Latina a prevalência da infecção diminuiu de 20 milhões, início dos anos 90, a 10 milhões no ano de 2000, e a população de risco de 100 para 40 milhões no mesmo período (DIAS et al, 2002).

1.4.5 Transmissão transplantar

A disseminação do parasito em doadores infectados já foi observada em transplantes de coração, fígado, medula óssea, pâncreas e rim (CHIEFFI; AMATO NETO, 2000; DIAS; MACEDO, 2005). A conduta básica para o processo de transplante de órgãos tem por princípio o diagnóstico da infecção da DC no doador e no

receptor, não sendo recomendada a realização do transplante se o doador estiver infectado e se o receptor estiver suscetível. No Brasil, com a cobertura integral na seleção de doadores, a transmissão transplantar está sob controle (DIAS; MACÊDO, 2005; DIAS; AMATO NETO, 2011).

1.5 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre predominantemente através da transmissão vetorial por insetos triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Esses triatomíneos sugam o sangue de vertebrados infectados com tripomastigotas, e inicia o ciclo de vida do parasito. Uma vez ingeridos pelo inseto vetor, os tripomastigotas são transformados no intestino médio anterior em formas esferomastigotas ou epimastigotas. Os epimastigotas se multiplicam no intestino médio e se juntam às membranas perimicrovilares das células intestinais do triatomíneo (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; NOGUEIRA et al., 2015).

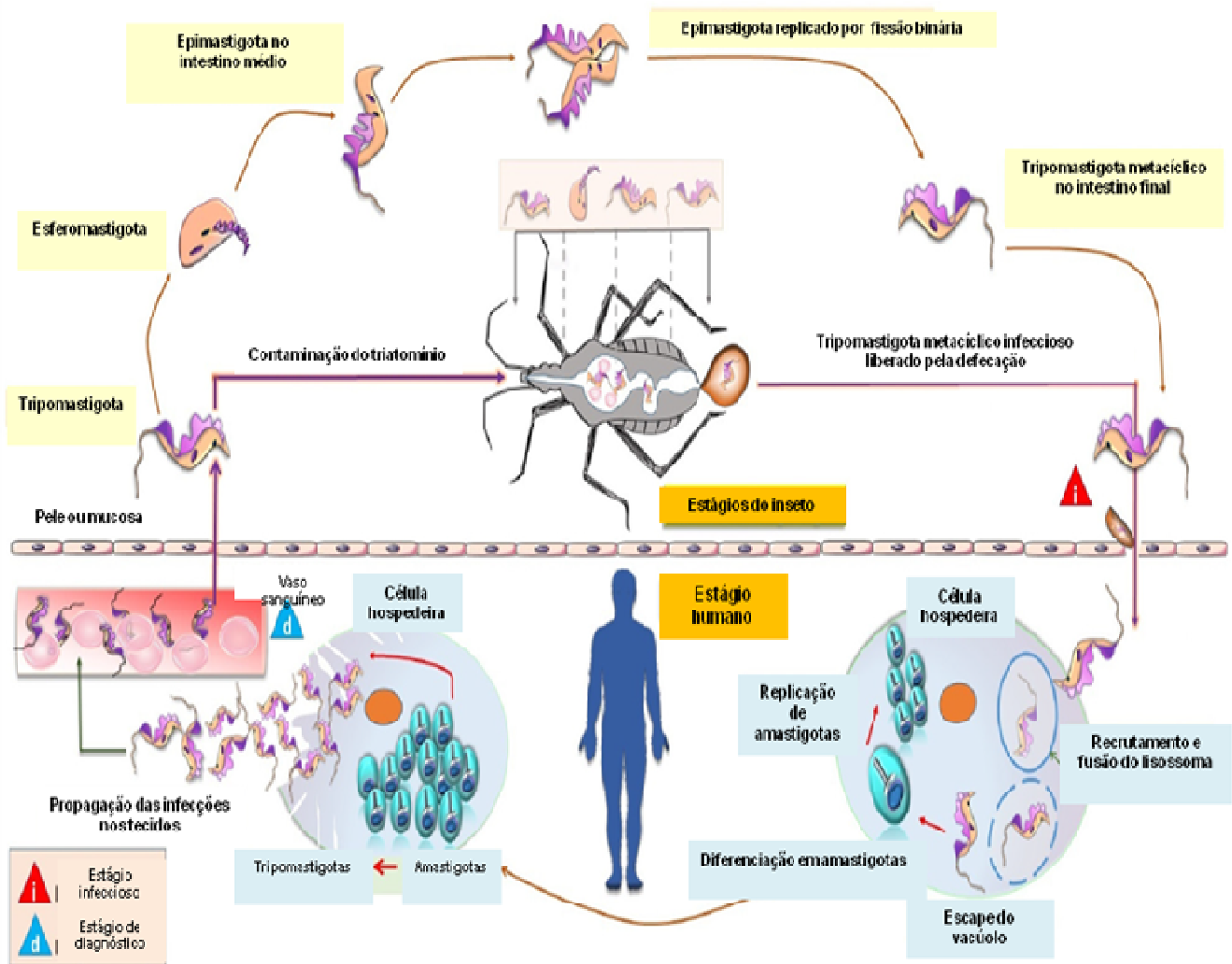
Na região posterior do intestino do vetor e no reto, muitos epimastigotas se separam da superfície intestinal e se transformam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos, que são então liberados junto com as fezes e urina durante o repasto sanguíneo. Contudo, os tripomastigotas metacíclicos não conseguem penetrar a pele do hospedeiro intacta, assim, entram através da fricção, cortes, feridas, ou através de superfícies de membranas mucosas como as do conjuntivo no local da inoculação. O recrutamento e a fusão do lisossoma do hospedeiro com o parasito envolvem a formação de um vacúolo endocítico parasitóforo, necessário para a invasão em fibroblastos, macrófagos e células epiteliais pelos parasitos (SOUZA et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2015).

Posteriormente, o parasito promove a lise enzimática do vacúolo da membrana, diferenciando-se em amastigotas intracelulares, que após nove ciclos de divisão binária tornam-se tripomastigotas que eventualmente são lançados na circulação como tripomastigotas sanguíneos. Estes infectam novas células ou são absorvidos por um novo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, repetindo o ciclo do parasito (DVORAK; HYDE, 1973,1976).

Uma vez na corrente sanguínea de um hospedeiro mamífero, o *T. cruzi* é capaz de infectar vários tipos de células de uma variedade de tecidos espalhando-se para

novos locais de infecção onde eles se diferenciam em amastigotas intracelulares (WATANABE COSTA; SILVEIRA; BAHIA, 2016) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo de vida do *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de LIDANI et al. (2017).

1.6 Evolução clínica da doença de Chagas

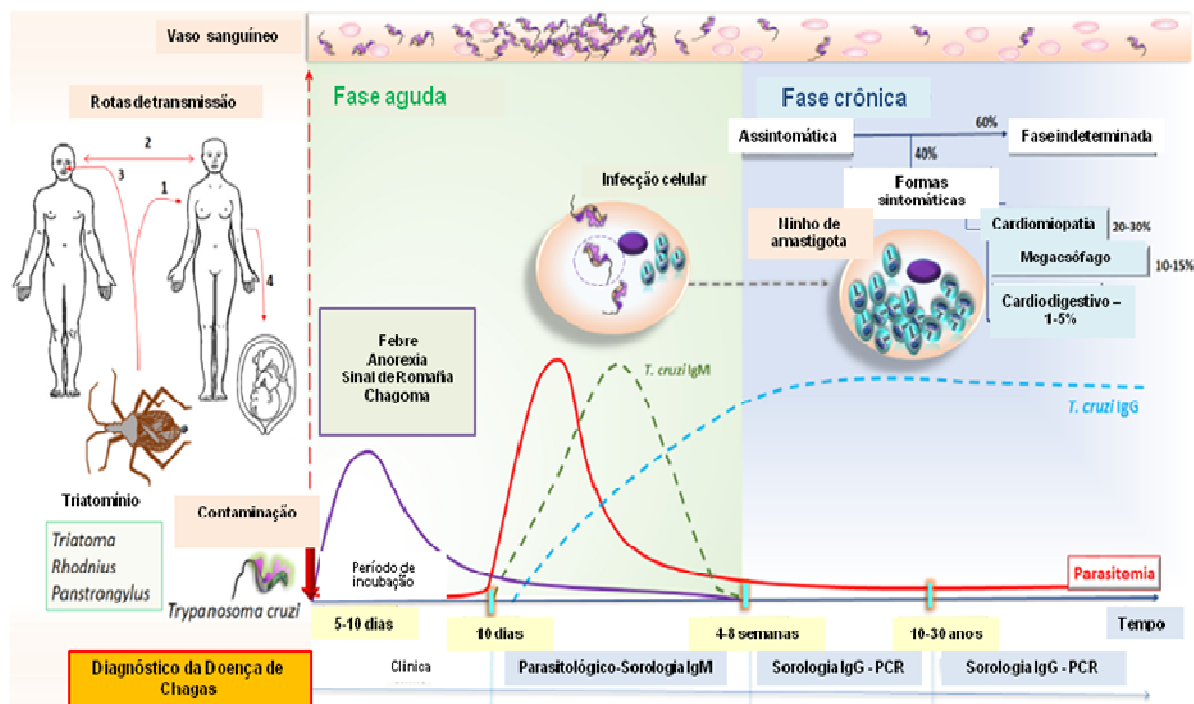
Várias manifestações clínicas podem surgir em humanos infectados por *T. cruzi*. A doença possui duas fases clínicas distintas: fase aguda e fase crônica definidas de acordo com a evolução clínica e o perfil laboratorial.

A fase aguda tem duração de cerca de dois meses, caracterizada por alta parasitemia. Nesta fase, o diagnóstico pode ser estabelecido por visualização direta do parasito no sangue e pela detecção do anticorpo IgM contra antígenos de *T. cruzi*. Embora a maioria dos casos agudos sejam oligossintomáticos ou assintomáticos, manifestações dermatológicas iniciais resultando em uma lesão na pele (chagoma), edema da pálpebra e conjuntivite (sinal de Romana) ou erupção morbilliforme generalizada (esquizotripanídeos) podem estar presentes (NUNES et al., 2013). Outros sinais e sintomas podem incluir anorexia, febre, dor de cabeça, dispnéia, dor abdominal, tosse, hepatoesplenomegalia, erupção cutânea, nódulos dolorosos, inchaço generalizado e miocardite (HIDRON et al., 2010; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015).

Após a fase aguda, a maioria das pessoas infectadas entra na fase latente ou indeterminada (assintomática), caracterizada por um período de latência que se inicia a partir de oito a dez semanas após a fase aguda, podendo durar meses ou anos, ou até mesmo por toda a vida do indivíduo infectado. Nesta fase ocorre redução da parasitemia circulante devido a ação da resposta humoral. Porém ninhos de amastigotas são formados em diferentes tecidos, principalmente os musculares, que estimulam resposta imune das próprias células afetadas, podendo desenvolver a formação de um processo inflamatório, podendo causar fibrose no tecido comprometido, criando lesões similares às encontradas na fase crônica sintomática da doença (REY, 2013, SOUZA, 2013).

A fase crônica sintomática da doença pode ser caracterizada por algumas manifestações clínicas, como cardiomiopatia (20-30%), comprometimento digestivo (10-15%) ou ambos (1-5%) (Figura 6) (RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 6 – Curso natural da infecção por *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de LIDANI et al. (2017).

A cardiomiopatia crônica representa a manifestação mais grave e potencialmente fatal da DC em humanos, variando de anormalidades no eletrocardiograma assintomáticas a insuficiência cardíaca congestiva, arritmias e/ou eventos tromboembólicos (BIOLO et al., 2010) que estão associados a alta morbidade e mortalidade. No entanto, a mortalidade relacionada à DC deve-se ao comprometimento cardiovascular, com aproximadamente 12.000 mortes por ano (SALVATELLA et al., 2013), com morte súbita (60%), insuficiência cardíaca (25-30%) e acidente vascular cerebral (AVC) (10-15%) (RASSI; RASSI; RASSI, 2001).

Quanto ao comprometimento cardíaco, os sinais iniciais mais comuns são, interrupção do fascículo anterior esquerdo, bloqueio do ramo direito e segmental esquerdo, anormalidades do movimento da parede ventricular. Manifestações tardias incluem disfunção do nó sinusal levando a bradicardia graves, bloqueios atrioventriculares de alto grau, taquicardia ventricular, cardiomiopatia dilatada progressiva com insuficiência cardíaca, aneurismas e embolia no ventrículo esquerdo, devido a formação do trombo (RASSI; LITTLE, 2000). A DC também é uma das principais causas do AVC cardioembólico, que é até duas vezes mais comum na doença

cardíaca de Chagas como em outras formas de cardiomiopatia (CARDOSO et al., 2014; NUNES et al., 2009). A incidência de AVC isquêmico foi estimada em 2 a 7 eventos por cada 100 pacientes/ano (NUNES et al., 2009) e cerca de um terço dos pacientes com AVC isquêmico podem ter infecção assintomática (CAROD-ARTAL, 2013).

Com relação às manifestações clínicas no aparelho gastrointestinal incluem disfagia, odinofagia, refluxo esofágico, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação. Pacientes com megaoesôfago podem ter maior risco de desenvolverem câncer esofágico, nesses casos, a endoscopia gastrointestinal superior pode ser indicada, especialmente em pacientes com sintomas novos ou progressivos. Megacolon é caracterizado por constipação persistente (DE OLIVEIRA et al., 1998), o sigmoide e o reto estão dilatados em quase todos os casos de megacolon, enquanto a dilatação de segmentos colônicos mais proximais é raro. Evidências de câncer colorretal não foram encontrados em pacientes com megacolon. O envolvimento do intestino delgado e do ducto biliar é muito raro (DE OLIVEIRA et al., 1998).

Abordagens padrão para o diagnóstico da DC na fase crônica requerem pelo menos dois testes sorológicos diferentes, geralmente usando o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFA) (BERN et al., 2007). Além disso, a amplificação do DNA do parasita por reação em cadeia de polimerase (PCR) pode ser empregada em alguns casos incertos (SCHIJMAN et al., 2011).

1.7 Tratamento farmacológico

Apenas dois fármacos, benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX) são licenciados para o tratamento da DC. Ambas foram utilizadas como suporte principal para o tratamento por quase 50 anos, embora seu perfil de segurança e eficácia estejam longe do ideal. Além disso, uma vez que a eficácia do tratamento parece diminuir com o tempo de infecção, assim a detecção precoce e intervenção são cruciais (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

NFX (1,1-dióxido da tetraidro-3-metil-4[(5- nitrofurfurilideno)amino]-2H-1,4-triazina), lançado pelo Laboratório Bayer com o nome comercial de Lampit®, foi o primeiro medicamento utilizado, sua administração é por via oral em três a quatro doses durante 60-90 dias (WHO, 2002; BERN et al., 2007; ANDRADE et al., 2011). As taxas de cura no intervalo da fase indeterminada crônica é de 86% em crianças menores de 14

anos e de 7-8% em adultos (RODRIQUES; CASTRO, 2002; STREIGER et al., 2004). A frequência de efeitos adversos com NFX são de 43-97,5%; sendo os mais comuns, anorexia, perda de peso, distúrbios neurológicos (irritabilidade, insônia, desorientação, mudanças de humor, parestesia, e neuropatia periférica), manifestações digestivas como náuseas e vômitos e, ocasionalmente, febre e erupção cutânea. O tratamento é descontinuado em 14,5-75,0% dos casos (RODRIQUES; CASTRO, 2002; JACKSON et al., 2010).

No entanto, NFX deixou de ser utilizado como tratamento no Brasil, devido sua alta toxicidade (CANCADO, 2002). Dessa forma, o BZ (N-benzil-2nitro-1-imidazolacetaminda) é o fármaco indicado pelo Ministério da Saúde (CANCADO, 2002; PEREZ-MOLINA et al., 2009). O BZ é um composto nitroheterocíclico que foi desenvolvido pelo laboratório Roche® sob o nome comercial de Rochagan®. Em 2003, a patente desse fármaco foi transferida para o Brasil, que produz esse medicamento para distribuição pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (OLIVEIRA et al., 2008).

Deste modo, a indicação do BZ deve-se ao seu melhor perfil de tolerabilidade, penetração nos tecidos e, possivelmente a eficácia. É administrado por via oral em duas ou três doses geralmente por 60 dias. Recomenda-se doses mais elevadas de até 15 mg/kg para crianças em casos de meningoencefalite (WHO, 2002). De acordo com alguns relatórios, 30 dias de tratamento podem ser úteis para adultos com infecção crônica (VIOTTI et al., 2006). O BZ tem atividade considerável durante a fase aguda da infecção, a cura sorológica é alcançada em até 100% dos pacientes com doença congênita (RUSSOMANDO et al., 1998; SCHIJMAN et al., 2003) tratada durante o primeiro ano, e em 76% dos pacientes com doença aguda (CANÇADO, 1999).

Na fase crônica, as taxas de cura são muito menores: 60-93% em crianças com idade até 13 anos (SOSA-ESTANI et al., 1998; YUN et al., 2009) e 2-40% em adultos com doença crônica tardia, embora esses valores melhorem com um acompanhamento (VIOTTI et al., 2006; CANÇADO, 1999; FABBRO et al., 2007). Os efeitos adversos mais comuns envolvem hipersensibilidade, principalmente na forma de erupção cutânea (29-50%), intolerância digestiva (5-15%) e sintomas gerais como anorexia, astenia, dor de cabeça e distúrbios do sono (40%). Neuropatia e depressão da medula óssea são considerados raros.

O tratamento é descontinuado em 9-29% dos casos, mesmo que as reações

sejam reversíveis e graves em menos de 1% dos casos (PÉREZ-AYALA et al., 2011; MORILLO et al., 2015; PINAZO et al., 2010; MOLINA et al., 2015). Os níveis elevados de fármaco sérico e de doses diárias (> 300 mg) foram associadas a uma frequência aumentada de eventos adversos (PINAZO et al., 2012). Os sintomas de reação medicamentosa tóxica suave podem ser tratados com anti-histamínicos, corticosteróides ou ambos, embora o tratamento antitripanosomal seja interrompido quando a toxicidade for severa. NFX pode ser seguro para o tratamento secundário após a interrupção do BZ por causa dos efeitos adversos (PEREZ-MOLINA et al., 2013). A adição de corticosteróides para prevenir efeitos adversos não beneficia os pacientes que tomaram NFX (RASSI et al., 2002) e resultados desencorajadores foram encontrados em pacientes que tomaram BZ (GÓRGOLAS et al., 2013).

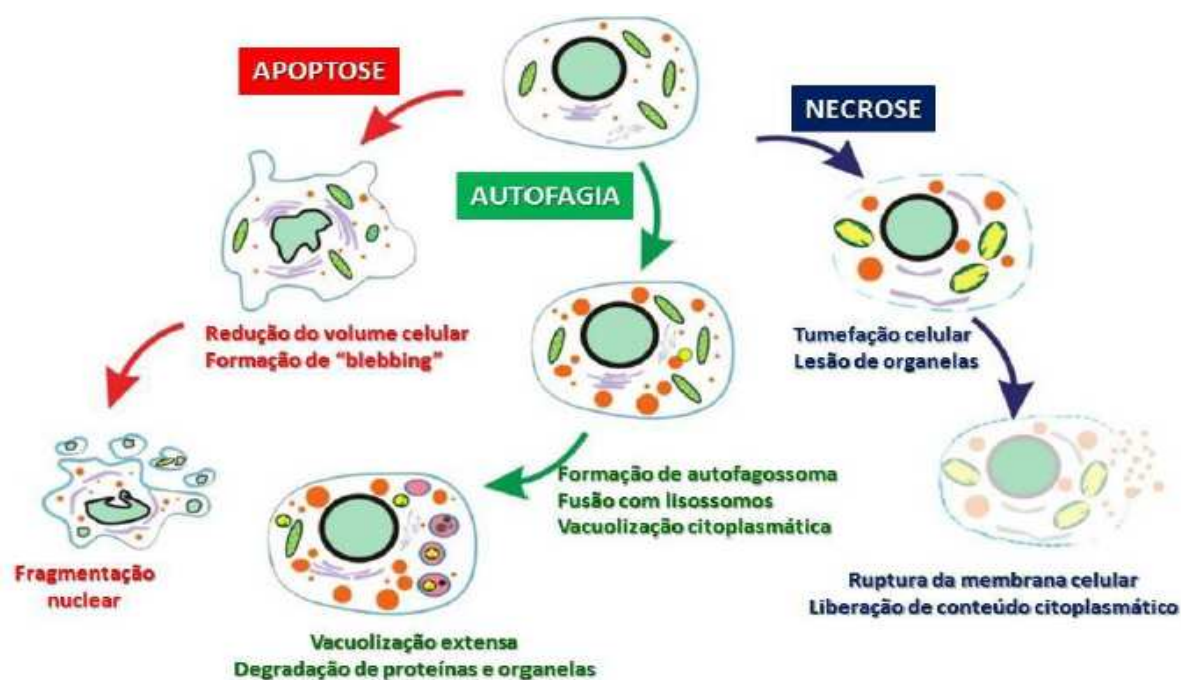
Além disso, o NFX apresenta efeito tripanocida contra as formas amastigotas do *T. cruzi*. Seu mecanismo de ação envolve a redução parcial ao ânion radical seguida por uma auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e formar o radical ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (SOBRINHO et al., 2007). Apesar de não ser totalmente elucidado, o mecanismo de ação do BZ parece estar relacionado com o grupo nitro, cujo metabolismo nas células hospedeiras inclui a redução de um grupo amino que está associado a geração de intermediários reativos (ex. radical nitro) que podem posteriormente reagir com oxigênio gerando superóxido (HALL; WILKINSON, 2012).

1.8 Mecanismos de morte celular

O termo morte celular programada (MCP) descreve eventos que de forma orquestrada e bem definida em etapas controladas, e não acidentalmente, levam a morte celular (DUSZENKO et al., 2006). Apesar de toda a complexidade dos fenômenos fisiológicos que envolvem os processos de morte celular, é reconhecido que acontece não somente em resposta a estímulos patológicos, mas também como parte da homeostase de um tecido ou população de células (DOONAN; COTTER, 2008). Segundo a sua morfologia a morte celular pode ser classificada em três tipos principais, morte celular programada por apoptose, autofagia e necrose, porém, a literatura tem demonstrado novos subtipos (TAN et al., 2014). A figura 7 demonstra a diferença das manifestações celulares observadas em células necróticas, apoptóticas e autofágicas.

A apoptose apresenta como características, redução do volume celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, arredondamento celular, com discreta ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas. Há manutenção da integridade da membrana citoplasmática até o processo final, sem liberação do conteúdo citoplasmático no meio extracelular. Entretanto, há perda de assimetria da membrana citoplasmática com externalização da fosfatidilserina. Além disso, também ocorre alteração mitocondrial, como despolarização do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), e formação de *blebbing* de membrana (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; BORGES et al., 2011).

Figura 7 – Vias de morte celular.



Fonte: Adaptado de TAN et al. (2014).

A autofagia é considerada um processo crucial para a célula, que tem como papel manter a homeostasia celular em condições de degradação e remodelação da célula. Todavia, se o estímulo destrutivo for contínuo, a autofagia é ativada, resultando em alterações que conduzem a morte da célula (BRENNAND et al., 2011). É definida como tipo de morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina,

acompanhada de vacuolização intensa no citoplasma, contrariamente a apoptose, onde as células estão associadas à fagocitose, neste caso, células em morte por autofagia tem pouca ou nenhuma relação com fagócitos. A autofagia é denominada um processo de reciclagem, neste processo formam-se os autofagossomos ou vacúolos autofágicos, estes apresentam membranas duplas. A membrana externa do autofagossomo funde-se com a membrana do lisossomo, formando o autolisossomo, as vesículas presentes no interior do lúmen do lisossomo são chamadas de corpos autofágicos, que são degradadas por hidrolases lisossomais. Os produtos da degradação são conduzidos de volta ao citosol, via membrana lisossomal (JAIN et al., 2013).

Por fim, a necrose conhecida por morte celular citoplasmática, é caracterizada pelo aumento do volume celular, edema nas organelas, como dilatação da mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A comprovação clássica de morte celular por necrose é a ruptura da membrana plasmática com perda do conteúdo intracelular, além disso, também acontece a vacuolização citoplasmática (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; JAIN, et al., 2013).

1.9 Produtos naturais com atividade antiparasitária

Produtos naturais são importantes fontes de agentes quimioterápicos, particularmente os utilizados para tratar doenças infecciosas. Das 162 novas entidades químicas aprovadas como medicamentos anti-infecciosos por agências reguladoras no período de 1981-2002, 99 (61%) eram de origem natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Nas últimas duas décadas, a indústria farmacêutica se afastou da pesquisa de produtos naturais. Em vez disso, o foco mudou para a química combinatória, no entanto, essa abordagem não resultou na expectativa de maior produtividade e aumento da quantidade de novas drogas. Além disso, há um crescente interesse entre os consumidores quanto ao uso de remédios herbais. No entanto, estima-se que apenas uma pequena fração das 500.000 espécies de plantas conhecidas tenham sido submetidas a pesquisas fitoquímicas ou farmacológicas (RATES, 2001).

Dada à utilidade dos produtos naturais na descoberta e desenvolvimento de moléculas biologicamente ativas, não é surpreendente que muitos compostos de plantas apresentem atividade antiparasitária. No entanto, nenhum deles foram avaliados em estudos clínicos ou projetados para alcançar aplicação clínica no futuro próximo. A maioria das pesquisas científicas se concentram na triagem de novos compostos

antiparasitários, em vez da otimização de produtos naturais existentes, uma vez que os parasitos que causam leishmaniose e tripanossomíase estão relacionados e compartilham certas características bioquímicas e celulares (DAVIS; KEDZIERSKI, 2005).

A literatura de produtos naturais fornece uma pesquisa crescente sobre agentes antileishmanicidas derivados de plantas. No entanto, dispõe de poucos estudos que avaliam produtos naturais antitripanosomais. Além disso, muitos dos compostos avaliados exibem alta atividade tripanocida, porém mostram uma citotoxicidade inaceitável em mamíferos, minimizando seu uso terapêutico. Sendo assim, muitos compostos potenciais vistos na literatura não foram investigados devido à toxicidade, biodisponibilidade ou eficácia inadequada *in vivo*, ou simplesmente por razões econômicas. O desenvolvimento de novos fármacos a partir de moléculas promissoras derivadas de plantas requer um esforço interdisciplinar para identificar fortes candidatos com bons perfis *in vivo* que são acessíveis à produção em escala (SALEM; WERBOVETZ, 2006).

Produtos derivados de plantas são uma imensa fonte de compostos que podem ser potencialmente ativos contra protozoários e, apesar de serem amplamente estudados, ainda há muitos compostos a serem descobertos (CROFT et al., 2005; SALEM; WERBOVETZ, 2006). Óleos essenciais de plantas aromáticas mostraram atividade contra vários microorganismos (BOYRAZ; ÖZCAN, 2006; TAGBOTO; TOWNSON, 2001; TEPE; SOKMEN, 2007) incluindo *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007) e *Leishmania* spp. (DE MEDEIROS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009). Extratos de plantas conhecidas como alecrim e chá-verde mostraram atividade tripanocida (ABE et al., 2002; PAVETO et al., 2004). Borges et al. (2012) investigaram a atividade tripanocida de óleos essenciais de plantas medicinais brasileiras que inibiram o crescimento de parasitos de forma dose dependente e foram bem tolerados por mamíferos. Similarmente, Bou et al. (2014) demonstraram as atividades antileishmanicida e tripanocidal de casearinas isoladas das folhas de *Casearia sylvestris*, uma planta geograficamente distribuída em toda a América Latina (LORENZI; DE ABREU MATOS, 2002).

Testes *in vivo* em camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com extrato de *Senna villosa* apresentaram uma melhora clínica, além de ninhos de amastigotas menores e menos frequentes, com redução de até 95% quando comparados

ao controle não tratado (JIMENEZ-COELLO et al., 2011). Extratos brutos de *Ageratum conyzoides* induz elevada mortalidade de formas tripomastigota de *T. cruzi* assim como quando tratados com *Handroantus impetiginosus* e *Ruta graveolens*. O extrato de *A. conyzoides* apresentou toxicidade para macrófagos murinos de linhagem J774G8 e peritoneais, *H. impetiginosus* mostrou baixa toxicidade enquanto *R. graveolens* não demonstrou toxicidade, revelando sua potencial utilização em ensaios clínicos (TEIXEIRA et al., 2014).

Resultados promissores *in vitro* foram obtidos após a exposição do parasito a extratos aquosos de *Polygala sabulosa* e de *Polygala cyparissias* com inibição de 50% de crescimento em epimastigotas após 72 h de tratamento (PIZZOLATI et al., 2002). O extrato metanólico de *Piptadenia africana* levou a morte de 50% dos tripomastigotas tratados após 96 h (MESIA et al., 2008). Em formas amastigotas foi observado inibição de 50% após 7 dias de tratamento com extratos de *Hypoestes forskolii*, *Kleinia odora*, *Psiadia punctulata*, *Capparis spinosa*, *Euphorbia schimperiana*, *Ricinus communis*, *Marrubium vulgare* e *Solanum villosum* (ABDEL-SATTAR et al., 2010).

Entre os últimos produtos promissores de extratos vegetais estão a desidroleucodina (DhL) e a helenalina, lactonas de sesquiterpeno encontradas em muitas famílias de plantas. Foi demonstrado que DhL e helenalina induzem morte celular programada em epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, onde ajudam a modular a resposta imune do hospedeiro ao diminuir a inflamação desencadeada por parasitos de células não programadas. Além disso, a combinação de DhL com BZ ou NFX aumentou sua atividade tripanocida (JIMENEZ et al., 2014). Assim, a busca por novas substâncias bioativas, como os polissacarídeos vegetais, com atividade tripanocida poderão ser uma fonte promissora de compostos antiparasitários.

1.10 Polissacarídeos vegetais: atividades biológicas

Os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados (AVIGAD; DEY, 1997). Depois da água, eles são os principais constituintes químicos da maioria dos tecidos e células das plantas, isto porque formam a parede celular, que é o suporte estrutural para as células vegetais (REID, 1997). Os polissacarídeos são estruturalmente um grupo heterogêneo de compostos, neutros ou ácidos, que consistem de dez ou mais unidades monossacarídicas

unidas por ligações glicosídicas, diferindo-se entre si na unidade, no grau de ramificação, no tipo de ligação e no comprimento de suas cadeias, que podem apresentar diferentes composições e funções (LEHNINGER, 2006).

Nas últimas décadas, vários polissacarídeos foram isolados de plantas superiores, e têm atraído atenção devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas e por apresentarem toxicidade relativamente baixa (PAULSEN, 2001; TZIANABOS, 2000). Abbas e Lichtman (2005) se referem aos polissacarídeos como modificadores exógenos de respostas biológicas (MRBs), uma vez que atuam como moduladores da inflamação, imunidade e hematopoiese, atuando ou suprimindo a resposta de células do sistema imune (macrófagos, monócitos, neutrófilos, células “Natural Killer”, eosinófilos e linfócitos), ligando-se aos mesmos receptores para MRBs endógenos como citocinas. Estudos demonstram que as propriedades biológicas de polissacarídeos dependem de uma variedade de parâmetros estruturais, tais como, composição monossacarídica, tipo e configuração da ligação glicosídica, tamanho dos pontos de ramificação, peso molecular e a presença de substituição por grupos polares e apolares (PEREIRA; MELO; MOURÃO, 2002; YANG et al., 2003).

Dentre as atividades biológicas, a literatura aponta um grande número de estudos envolvendo a ação imunomoduladora de polissacarídeos vegetais. Polissacarídeos isolados das plantas *Hymenaea courbaril*, *Copaifera lansdorfie*, *Mucuna sloanei* apresentam resposta imunomodulatória (CUNHA et al., 2009). Outros polissacarídeos de plantas como *Plantago major*, *Glycyrrhiza uralensis* e *Panax ginseng* demonstraram eficiência na ativação do sistema complemento (SAMUELSEN et al. 1995; GAO et al., 1988; SUN; MATSUMOTO; YAMADA, 1992).

Os macrófagos quando ativados por polissacarídeos podem desencadear diferentes respostas, como aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ e NO^{\bullet} , atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal e aumento da capacidade fagocítica (MORETÃO et al., 2003; 2004; MELLINGER et al., 2005).

Galactomananas e mananas também são descritas como ativadoras das funções de macrófagos, aumentando a atividade fagocítica e a produção de NO^{\bullet} (RAMESH; YAMAKI; TSUSHIDA, 2002). O polissacarídeo ácido presente na goma de angico branco (*Anadenanthera colubrina*), constituído por arabinose, manose, galactose, ramnose e ácido hexurônico, com a cadeia principal de (1→3)-β-galactopirranose altamente ramificada, mostrou atividade tanto *in vitro* quanto *in vivo*,

ativando macrófagos e aumentando tanto sua capacidade fagocítica como a produção de $O_2^{\bullet -}$ (MORETÃO et al., 2003).

Além destas ações, há registros de polissacarídeos considerados farmacologicamente ativos por apresentarem atividades antiviral (TALARICO et al., 2004; JUNG et al., 2004; SASAKI et al., 2001; NISHINO et al., 1994), antibacteriana (XIE et al., 2002; LI et al., 2004; RUIZ-BRAVO et al., 2001), antiparasitária (HRCKOVA;VELEBNY, 2001; YUN et al., 1997; NATHAN, 1985), leishmanicida (NOLETO et al., 2002; BARROSO et al., 2007), antitussígena (KARDOSOVÁ et al., 2004), reguladora intestinal (SANZ et al., 2005), antitumoral (YALIN et al., 2005; HAYASHI et al., 2000), antinociceptiva (WANG et al., 2011; SILVA-LEITE et al., 2017) antiinflamatória (PEREIRA et al., 2012) e anticoagulante (SOUZA et al., 2015; MARTINICHEN-HERRERO et al., 2005; YOON et al., 2002).

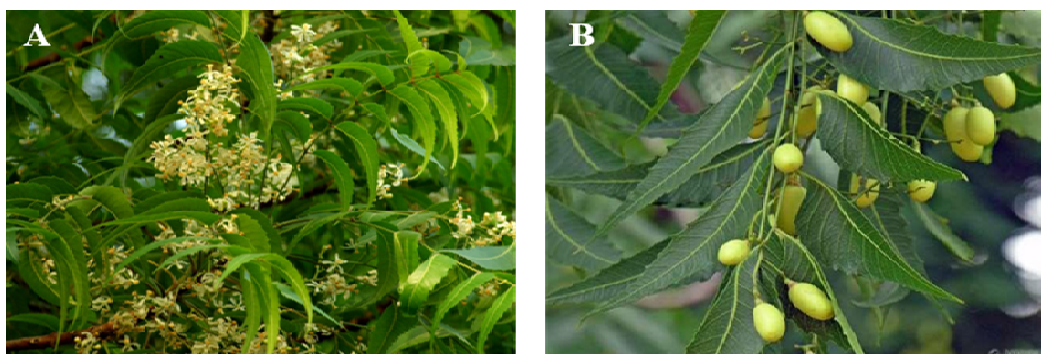
Dentre os estudos que avaliam a atividade de polissacarídeos, existem alguns relatos dos efeitos dessas moléculas quanto à atividade leishmanicida, entretanto, não há nenhum relato sobre *T. cruzi*. Estudos de complexação de diferentes polissacarídeos visando obter moléculas com maior efeito biológico tem sido desenvolvidos. Cantos et al. (1993) usando concentrações iguais de antimônio complexado e não complexado, demonstrou que o tratamento com o antimônio complexado com manana apresentou 90% de atividade, mas a manana não complexada não apresentou efeito leishmanicida. A galactomanana do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) e seu complexo com íon vanádio apresentaram efeito leishmanicida contra forma amastigota de *L. amazonensis in vitro*. A mesma atividade leishmanicida apresentada para 300 $\mu\text{g/mL}$ de Glucantime foi obtida com 100 $\mu\text{g/mL}$ de galactomanana e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do complexo galactomanana-ion vanádio (NOLETO et al., 2002).

1.11 Espécies vegetais

1.11.1 *Azadirachta indica*

A espécie *Azadirachta indica* pertence ao reino Plantae, divisão Angiosperma, classe Dicotiledônea, ordem Rutales, família Meliaceae, gênero *Azadirachta* (DE JUSSIEU, 1830). É cultivada como uma planta medicinal na Ásia e em vários países, inclusive no Brasil (BISWAS et al., 2002). É popularmente conhecida como neem indiano ou lilás indiano, apresentando frutos na forma de bagas ovaladas de cor verde-clara e sementes aladas (SCHULTZ, 1984; JOLY, 2002) (Figura 8).

Figura 8- *Azadirachta indica*. (A) Flor; (B) Fruto.



Fonte: <http://www.mfrural.com.br>

Na medicina popular, apresenta um grande número de propriedades, onde os extratos são utilizados contra endo e ectoparasitas ou simplesmente, como enxaguatório bucal (VANKA; TANDON; RAO, 2001). Outras partes da planta tem sido utilizadas para controle de parasitoses intestinais (KIRTIKAR; BASU, 1975).

Além do uso popular, também existem inúmeras propriedades biológicas, dentre elas estão a ação imunomodulatória *in vitro* (VAN DER NAT et al., 1991) e *in vivo* (RAY; BANERJEE; SEN, 1996), antibacteriana e antiviral (HARIKRISHNAN; BALASUNDARAM; BHUVANESWARI, 2003; ISMAN et al., 1990; BADAM; JOSHI; BEDEKAR, 1999).

1.11.2 *Caesalpinia ferrea*

A espécie *Caesalpinia ferrea* pertence ao reino Plantae da divisão Angiosperma, classe Dicotiledônea, ordem Fabales, família Caesalpinaceae, gênero

Caesalpinia (CRONQUIST, 1981). É largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Pernambuco e Ceará (ALZUGARAY, 1984), é conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi e muiré-itá (PIO CORREA, 1984) (Figura 9). Entre as suas propriedades terapêuticas estão à atividade antibacteriana (CARVALHO et al., 1996; SUDHAKAR et al., 2006).

Figura 9- *Caesalpinia ferrea*. (A) Casca do caule; (B) Flor; (C) Vagem.



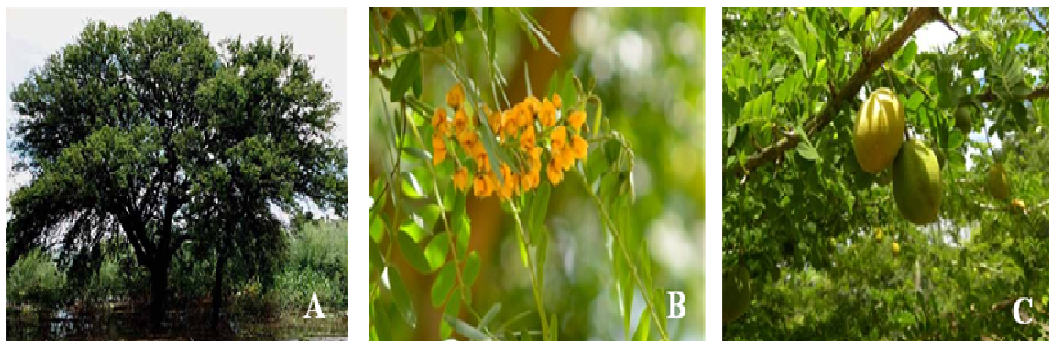
Fonte: LORENZI (1998); http://www.fotolog.com/t_m_m_/24100000000006749/

1.11.3 *Geoffroea spinosa*

Pertencente à família Leguminosea, subfamília Papilionoideae é encontrada em toda a América do Sul, principalmente nas várzeas e margens de rios do nordeste brasileiro (KILLEN; GARCIA; BECK, 1993). Conhecida popularmente como “umari”, “mari” ou “marizeira” (PIOCORRÊA, 1984; KILLEN; GARCIA; BECK, 1993). O táxon *Geoffroea* spp, também chamado de *Geoffraea* é relativamente pequeno, constituído por apenas cinco espécies: *G. estriata*, *G. inermis*, *G. superba*, *G. decorticans* e *G. spinosa*.

Geoffroea spinosa é uma árvore grande, frondosa, com caule e ramos cheios de pequenos espinhos; folhas alternas, imparinadas, com 5 a 9 folíolos oblongos; flores amarelas, cheirosas, em cachos axilares; fruto ovóide, verde amarelado, com mesocarpo carnoso e sementes fusiformes (PIO-CORRÊA, 1984) (Figura 10). Estudos experimentais demonstraram atividade antimicrobiana do extrato metanólico de seus ramos e folhas (SALVAT et al., 2004).

Figura 10 – *Geoffroea spinosa*. (A) Árvore; (B) Flor e Folhas; (C) Fruto.



Fonte: <http://www.colecionandofrutas.org/geoffroea.htm>
<http://www.naturezabela.com.br/2012/12/umari-geoffroea-spinosa.html>

1.11.4 *Ximenia americana*

A espécie *Ximenia americana* L., pertence a família Olacaceae, é uma das principais espécies do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga (FERNANDEZ; BEZERRA, 1990). Conhecida popularmente como ameixa-do-mato, ameixa-brava, ameixa-do-sertão e ameixeira-do-Brasil (SOUZA; LORENZI, 2005), Caracteriza-se como uma árvore pequena espinhosa de casca fina, avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa, com folhas pequenas, simples, inteiras e flores branco-amareladas e aromáticas. Seus frutos são aromáticos, do tipo drupa, de cor amarelo alaranjado (MATOS, 2007) (Figura 11).

Figura 11 – *Ximenia americana*. (A) Folhas e espinhos; (B) Caule; (C) Fruto.



Fonte: <https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=psk&p=Ximenia+americana+L.>
http://www.cnip.org.br/banco_img/Ameixa/ximeniaamericana6.html

Quanto ao uso popular, é relatada para o tratamento da malária (OGUNLEYE; IBITOYE, 2003). Estudos experimentais evidenciaram que extratos aquosos da casca de *X. americana* apresentam atividade antimalárica (OGUNLEYE; IBITOYE, 2003). Já os extratos etanólicos foram relacionados às atividades antimicrobiana (OGUNLEYE; IBITOYE, 2003), antiviral (ASRES et al., 2001), antiparasitária (MAIKAI, 2011).

1.11.5 *Genipa americana*

A espécie *Genipa americana*, pertencente a família Rubiaceae possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil, endêmica no semi-árido nordestino, sendo encontrada desde o Pará até Minas Gerais. Conhecida popularmente como jenipapeiro, sua árvore caracteriza-se por caule reto, copa grande e arredondada com ramos numerosos e fortes, de casca lisa e espessa (ESTRELLA, 1995; CORRÊA, 1984). As folhas são simples, opostas, pecioladas, e glabras em ambas as faces. Os frutos são do tipo baga, com polpa adocicada e contendo numerosas sementes cinzento-escuras e compridas (PRANCE, 1975). A casca e os frutos verdes contêm substância corante violeta ou azul-escuro, denominada genipina (PRANCE, 1975; ESTRELLA, 1995) (Figura 12).

Figura 12 – *Genipa americana*. (A) Folhas; (B) Flor e Fruto.



Fonte: <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br>

Na medicina popular é utilizada para o tratamento da malária (KFFURI et al., 2016). Estudos experimentais demonstraram atividade antimalárica (*in vitro* e *in vivo*), antiparasitária (OLIVEIRA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014) e antimicrobiana (TALLENT, 1964).

2 JUSTIFICATIVA

A DC é considerada pela OMS uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente 8 milhões de pessoas no mundo e aproximadamente 10.000 pessoas morrem por ano de complicações relacionadas a esta doença.

Apesar dos avanços substanciais, a doença continua a ser um relevante problema social e econômico em muitos países latino-americanos, afetando principalmente populações com pouca visibilidade e pouca voz política, causando estigma e discriminação, impedindo a pronta detecção e controle da doença, é relativamente negligenciada pelo governo e tem um impacto considerável na morbimortalidade (MONCAYO; SILVEIRA, 2009; VENTURA-GARCIA et al., 2013).

Apenas dois fármacos, BZ e NFX, são licenciados para o tratamento da DC, tendo sido utilizados por quase cinquenta anos. No entanto, apesar da boa eficácia, apenas na fase aguda da doença, apresenta vários efeitos adversos (ANDRADE et al., 2011; BERN et al., 2007; JACKSON et al., 2010; PINAZO et al., 2010; MOLINA et al., 2015). Assim, a descoberta de novas substâncias oriundas de fontes naturais (plantas) com atividade tripanocida poderá fornecer um potencial biotecnológico para serem utilizadas como drogas contra a DC.

Mesquita et al. (2005) identificou as atividades antileishmanicida e antitripanosomal do extrato etanólico das folhas de *Caesaria sylvestris*. Estudos prévios demonstraram que extratos metanólicos de plantas utilizados na medicina popular do México exibiram alta atividade tripanocida (MOLINA-GARZA et al., 2014).

Existem relatos experimentais sobre a atividade de polissacarídeos quanto à atividade leishmanicida, porém, não há nenhum estudo do efeito destas moléculas sobre *T. cruzi*. Desta forma, este estudo teve como propósito avaliar a atividade antitripanosomal de polissacarídeos (extratos e frações isoladas) obtidos de espécies vegetais sobre as três formas de desenvolvimento do *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito tripanocida dos polissacarídeos de *A. indica*, *C. ferrea*, *G. americana*, *G. spinosa* e *X. americana* em cultura de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito antiparasitário dos polissacarídeos sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de cepa Y de *T. cruzi*;
- ✓ Analisar a citotoxicidade dos polissacarídeos sobre células hospedeiras (LLC-MK₂);
- ✓ Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelos polissacarídeos de *G. americana* sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*;
- ✓ Investigar o efeito dos polissacarídeos de *G. americana* sobre o potencial transmembrânico mitocondrial dos parasitos;
- ✓ Avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio citoplasmática no efeito tripanocida dos polissacarídeos de *G. americana*;
- ✓ Avaliar a participação de peróxido de hidrogênio sobre o efeito antiparasitário dos polissacarídeos de *G. americana*;
- ✓ Investigar as alterações morfológicas induzidas pelos polissacarídeos de *G. americana* sobre formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Plantas

As espécies vegetais foram coletadas no Distrito de Custódio/Quixadá-CE, transportadas ao Laboratório de Polissacarídeos Bioativos (LAPOBIO) da Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central (FECLESC), lavadas com água destilada e secas em estufa a 40 °C. A identificação das espécies foi realizada pela Profa. Ms. Vaneicia Gomes dos Santos e a exsicata de cada planta (*A. indica* – tegumento da semente: 46084; *Caesalpinia ferrea* - casca: 46085; *Genipa americana* - folha: 46083; *Geoffroea spinosa* - casca: 46796; *Ximenia americana* - casca: 46794) encontra-se depositada no Herbário da FECLESC e uma duplicata no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1.2 Preparo das soluções

As substâncias em estudo foram diluídas na concentração de 3000 µg/mL em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; ph 7,4). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em PBS estéril para produzir as concentrações de trabalho.

O BZ (2 mg/mL), fármaco de referência foi cedido pelo LAFEPE e utilizado como controle positivo.

4.1.3 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de mamífero LLC-MK₂ (células epiteliais renais obtidas de rim de macaco - *Macaca mulatta*) e formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

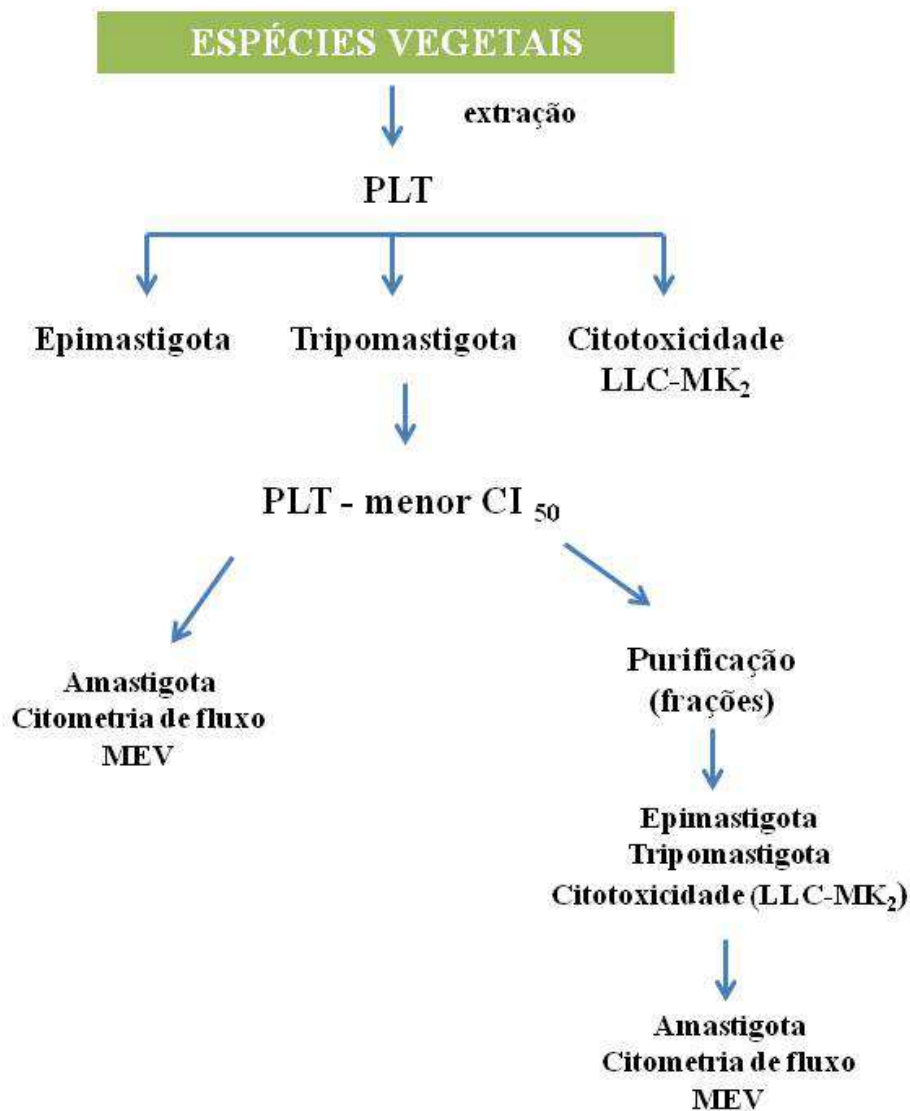
4.1.4 Reagentes

DEAE-celulose, D-glucose, acrilamida-bis, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFH-DA), ácido D-glucurônico, albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis-EUA); Soro Bovino Fetal (SBF) foi obtido da Ivitrogen (Grand Island, NY - USA). Meio LIT (Liver Infusion Tryptose - HiMedia Laboratories, Mumbai, IND), meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium* - VITROCELL, São Paulo - BR), Catalase (CAT, Sigma-Aldrich, BR). Benzonidazol (BZ, Lafepe - BR), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, Vetec, São Paulo - BR), 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT, Amresco, Ohio - USA), 7-*aminoactinomicyn D* (7-AAD), Anexina V marcada com a ficoeritrina (Ax/PE) foram obtidos da BD Pharmingen (California – USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho experimental

Figura 13 - Esquema do delineamento experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

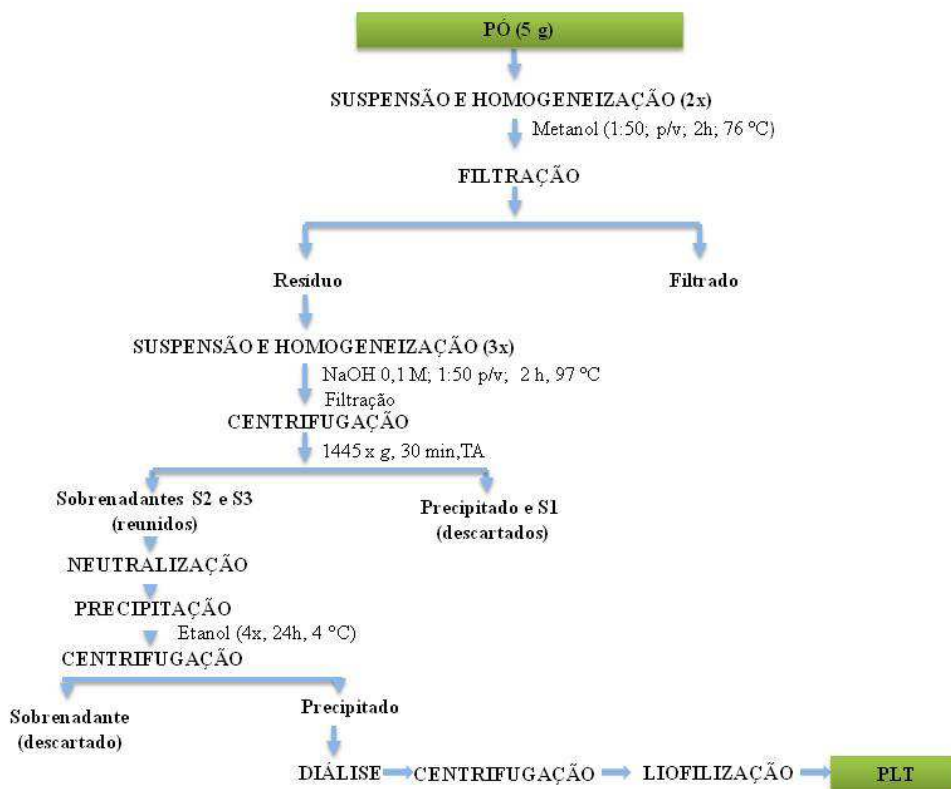
4.2.2 Obtenção dos polissacarídeos vegetais

As partes vegetais foram secas (40 °C) em estufa e moídas em um triturador de alimentos até a obtenção de pó (5 g) e o mesmo foi suspenso em metanol absoluto (1:50, p/v), homogeneizado (2 h, 76 °C) e filtrado em tecido de nylon (procedimento repetido 2x) para remoção do material solúvel em metanol. O resíduo obtido foi suspenso na proporção de 1:50 (p/v) em NaOH 0,1 M, homogeneizado (2 h, 97 °C) e centrifugado (1445 x g, 30 min, temperatura ambiente – TA) – procedimento repetido 3x. O sobrenadante (S1) foi descartado e os sobrenadantes (S2 e S3) foram reunidos, neutralizados com HCl 1 M e precipitados com quatro volumes de etanol absoluto e centrifugado. O precipitado foi dialisado continuamente contra água destilada por 48 h e re-centrifugado e o sobrenadante liofilizado, sendo denominado de polissacarídeos totais (PLT) (MADEIRA, 2014) (Figura 14). A extração dos PLT da folha de *G. americana* demonstrou um rendimento de 6,5%, revelando um alto teor de carboidratos totais de 54,6%, sendo 21,1% destes de ácido urônico, e 12% de proteínas (SOUZA et al., 2015).

Os PLT foram fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, dissolvidos em água destilada (2:1, p/v) e aplicados em coluna cromatográfica (9,8 x 1,0 cm) contendo resina de troca iônica (DEAE-celulose) previamente equilibrada com água destilada. A coluna foi eluída com água destilada (60 mL/h) para retirada dos polissacarídeos neutros, e para a eluição dos polissacarídeos acídicos foi utilizado concentrações crescentes de NaCl (0,1-1 M). Os polissacarídeos foram monitorados através das dosagens de carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956) e de ácido hexurônico (DISHE, 1947). As frações polissacarídicas (f-PL) foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e denominadas de FI (0,1M) e FII (0,25M de NaCl) (MADEIRA, 2014).

O fracionamento dos PLT por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) resultou em duas frações polissacarídicas majoritárias denominadas FI e FII, eluídas com solução de NaCl 0,1 e 0,25 M, respectivamente, das quais FII demonstrou maior rendimento (56%) em relação à FI (35%). Os teores de carboidratos para FI foram de 36% (incluindo 9% de ácido urônico) e 4% de contaminantes proteicos. Já FII apresentou 23% de carboidratos (incluindo 30% de ácido urônico) e 5% de proteínas (MADEIRA, 2014).

Figura 14 - Esquema da extração dos PLT.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Ensaios com formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

4.2.3.1 Cultivo e manutenção das formas epimastigotas

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (constituído por cloreto de sódio - 4 g/L; cloreto de potássio - 0,4 g/L; fosfato de sódio anidro - 8 g/L; triptose - 5 g/L; infusão de fígado - 5 g/L; glicose - 4 g/L; hemina - 25 mg/L) suplementado com 10% SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), pH 7.4 em garrafas plásticas estéreis e mantidas em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (CAMARGO, 1964).

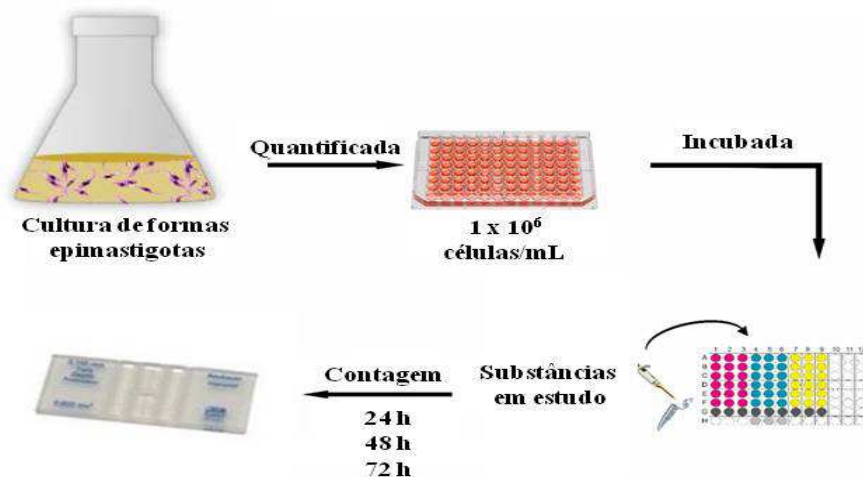
Inicialmente os parasitos foram cultivados na densidade de 5×10^4 células/mL e monitorados diariamente para a determinação da curva de crescimento. Quando atingiram a fase exponencial de crescimento (6° ao 8° dia de cultivo), os parasitos foram repicados, procedimento em que 0,1 mL da suspensão é transferida para uma nova garrafa estéril contendo 10 mL de meio LIT. Para estoque da cultura, as células foram centrifugadas (4000 rpm, 5 min) e ressuspensas em 1 mL de meio LIT contendo dimetilsulfóxido estéril (DMSO) 10%. Em seguida, foram estocadas em nitrogênio líquido.

4.2.3.2 Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas epimastigotas

A citotoxicidade das substâncias em estudo nas formas epimastigotas foram realizadas por meio do método de contagem em câmara de Neubauer (LIMA et al., 2016).

A cultura de epimastigotas foi quantificada no sétimo dia após repique, período em que atinge a fase log de crescimento, e uma suspensão foi subcultivada em placa de 96 poços na concentração final de 10^6 parasitos/mL. Em seguida, a cultura foi tratada com os PLT (93,75-1500 $\mu\text{g/mL}$) e /ou f-PL (5,85-1500 $\mu\text{g/mL}$), PBS (controle negativo) ou BZ (controle positivo; 1,56-200 $\mu\text{g/mL}$) e mantidas por 24, 48 e 72 h em incubadora a 28 °C. A viabilidade celular, o crescimento e as alterações morfológicas da cultura, foram quantificados em câmara de Neubauer por microscopia óptica (Figura 15). Os parasitos foram considerados viáveis por observação de motilidade e manutenção de forma característica.

Figura 15 – Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos resultados obtidos, o percentual de viabilidade celular foi determinado pela fórmula mostrada abaixo e a CI_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos) foi determinada por regressão não-linear.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = T / CT \times 100$$

Onde:

T = Contagem de parasitos viáveis no grupo experimental

CT = Média da contagem de parasitos viáveis do grupo controle negativo.

4.2.4 Ensaios com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

4.2.4.1 Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas

A cultura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi mantida por meio de infecções consecutivas de células LLC-MK₂ (ANDREWS; COLLI, 1982). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² na densidade 2×10^5 células/mL utilizando meio DMEM - SBF a 10% em atmosfera de CO₂ 5% a 37 °C. Após 24 h as células

foram infectadas com suspensão de tripomastigotas na concentração de 10^7 parasitos/mL e mantidas no meio DMEM - SBF a 2%, trocado diariamente.

No 6° e 7° dia pós-infecção, o meio de cultura foi colhido e centrifugado (2500 rpm - 7 min) para obtenção dos tripomastigotas. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, da mesma forma como descrito para formas epimastigotas. Os tripomastigotas que eclodiram no 6° dia da infecção foram utilizados nos ensaios, enquanto os coletados no 7° dia foram utilizados para a infecção de novas garrafas.

4.2.4.2 Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais sobre as formas tripomastigotas

No sexto dia de infecção, o meio das garrafas infectadas foi removido e centrifugado a 2500 rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* contendo os tripomastigotas foi ressuspensionado em DMEM a 10% de SBF. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e subcultivados em placa de 96 poços na densidade de 10^6 parasitos/mL (LIMA et al., 2016). Em seguida, a cultura foi tratada com os PLT (93,75-1500 $\mu\text{g/mL}$) e /ou f-PL (2,9-1500 $\mu\text{g/mL}$), PBS (controle negativo), BZ (controle positivo; 1,56-200 $\mu\text{g/mL}$) e mantidos por 24 h em estufa a $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 .

Após 24 h de incubação, alíquotas dos grupos experimentais foram colhidas para contagem em câmara de Neubauer (Figura 16). O percentual de viabilidade celular foi calculado utilizando a mesma fórmula usada para as formas epimastigotas. A LC_{50} (concentração letal para 50% dos parasitos) foi estimada por regressão não-linear. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (SeI) das substâncias sobre tripomastigotas em relação às células hospedeiras, usando a fórmula:

$$\text{SeI} = \text{CC}_{50}/\text{LC}_{50}$$

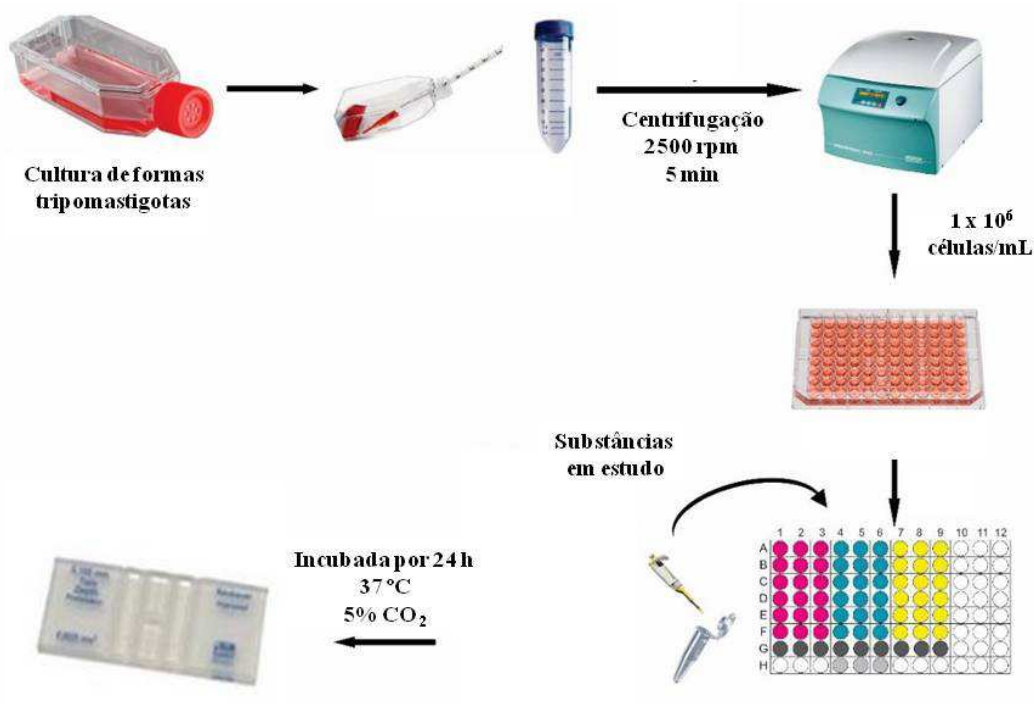
Onde:

SeI = Índice de seletividade

CC_{50} = concentração que causa 50% de toxicidade em células LLC-MK₂

LC_{50} = concentração que causa 50% de morte em tripomastigotas.

Figura 16 – Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais em formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.5 Ensaios de citotoxicidade em células hospedeiras (LLC-MK₂)

A citotoxicidade dos polissacarídeos vegetais foi investigada com o objetivo de selecionar a espécie que apresentasse baixa toxicidade sobre as células hospedeiras, além de determinar qual espécie seria selecionada para a realização dos ensaios tripanocidas sobre as formas intracelulares. Além disso, o efeito citotóxico foi determinado para avaliar as concentrações de trabalho ideais para os ensaios de atividade antiparasitária, como também para comparar a seletividade das substâncias testadas em relação ao parasito e às células hospedeiras.

4.2.5.1 Cultivo e manutenção das células LLC-MK₂

As células LLC-MK₂ foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis de 25 cm² em meio DMEM composto de glutamina (0,58 g/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L),

glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (0,11 g/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, acrescentado de penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e suplementado com SBF 10%. A linhagem celular foi mantida em estufa a $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$ e CO_2 5%, sendo observada diariamente em microscópio óptico invertido, até atingirem confluência.

Após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com 1-2 mL de PBS estéril e removidas com 500 - 1000 µL de tripsina/EDTA (0,25 %) por 5 minutos a 37°C . Alíquotas das células deslocadas foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM.

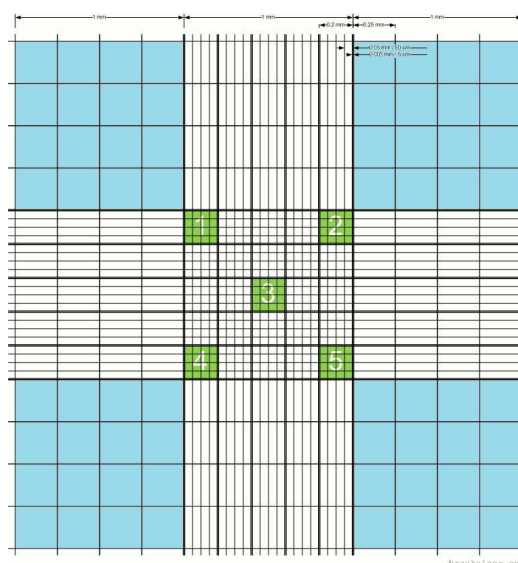
4.2.5.2 *Determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos vegetais em células LLC-MK₂*

A citotoxicidade em células LLC-MK₂ foi determinada através do teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ensaio utilizado na quantificação da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

O teste baseia-se na reação colorimétrica de conversão do MTT em sal de formazan. O MTT, sal de cor amarelada, é internalizado nas células viáveis e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Esses cristais são solubilizados por um agente surfactante adicionado em seguida, e os produtos finais são analisados por espectrofotometria a 570 nm. A intensidade da cor violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Para a realização desses ensaios, as células LLC-MK₂ foram lavadas e tripsinizadas conforme descrito no item 4.2.5.1. A mistura foi transferida para tubos cônicos e centrifugada a 4000 rpm por 5 min. O *pellet* foi ressuscitado em DMEM e uma alíquota foi diluída de forma seriada em azul de trypan (4%; p/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100. A amostra mais diluída (1:100) foi transferida para câmara de Neubauer, e a densidade celular foi determinada por contagem. Foram contadas as células presentes nos campos laterais, conforme demonstrado na figura 17.

Figura 17 – Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer.



Fonte: Adaptado de BRAUKAISER, 2015.

Nota: As regiões marcadas em azul foram utilizadas para contagem de células LLC-MK₂, enquanto que as regiões marcadas em verde foram usadas para contar as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

A densidade celular foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

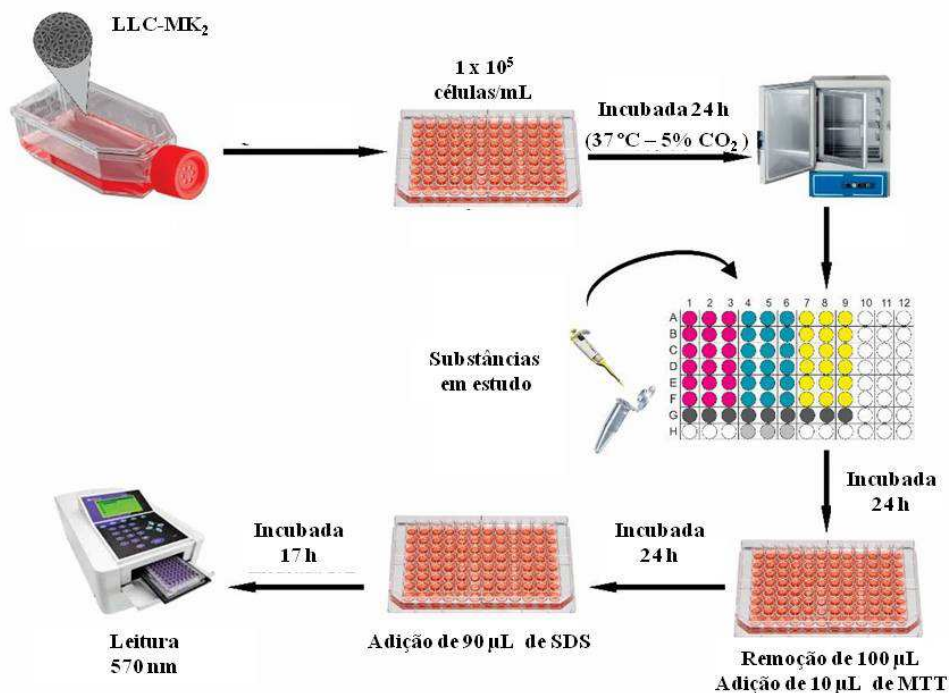
$$\text{Densidade celular (cél/mL)} = \text{Contagem}/4 \times 10^4 \times fd$$

Onde:

fd = fator de diluição usado para contagem.

Em seguida, a densidade celular foi ajustada para a concentração 1×10^5 células/mL e subcultivadas em placas estéreis de 96 poços (200 μ L/poço) incubadas *overnight* em estufa de CO₂ para a adesão e proliferação celular na superfície da placa. Posteriormente, as células foram tratadas com os PLT (93,75-3000 μ g/mL) e /ou f-PL (2,9-1500 μ g/mL), PBS (controle negativo), BZ (controle positivo; 1,56-200 μ g/mL) e incubadas, sob as mesmas condições, por 24 h. Em seguida, 100 μ L do meio da cultura foram retirados, 10 μ L de solução de MTT (2,5 mg/mL em PBS) foi acrescentado e, 4 h depois, foram adicionados 90 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS - 10% p/v em HCl 0,1 N). Após 17 h de incubação foi realizada a leitura em leitor de placa (Asys Expert Plus®) a 570 nm (Figura 18).

Figura 18 - Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade dos polissacarídeos vegetais sobre células LLC-MK₂.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o cálculo da viabilidade celular, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{AbsT - AbsB}{AbsCT - AbsB} \times 100$$

Onde:

AbsT = leitura de absorbância do grupo tratado;

AbsB = média das leituras da absorbância do branco; e

AbsCT = média das leituras de absorbância do grupo controle.

Os resultados obtidos foram avaliados por regressão não-linear (curva fit) para estimativa da concentração capaz de causar 50% da citotoxicidade máxima (CC₅₀).

4.2.6 Ensaio com formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*

4.2.6.1 Cultivo das formas amastigotas

Para o cultivo da forma intracelular de *T. cruzi*, células LLC-MK₂ (10⁵ células/mL) foram subcultivadas em meio DMEM a 10% de SBF em placas estéreis de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. A placa foi incubada em estufa a 37 ± 0,3 °C e CO₂ 5% por 24 h para que a cultura atingisse o estágio de semiconfluência. Após esse período, a cultura foi infectada com suspensão de tripomastigotas (5 x 10⁶ parasitos/mL) em meio DMEM – SBF 2% e incubada por 48 h sob as mesmas condições.

4.2.6.2 Avaliação do efeito dos polissacarídeos vegetais sobre formas amastigotas cepa Y de *T. cruzi*

Após o período de infecção, as células LLC-MK₂ foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não interiorizados e, em seguida, os poços foram tratados com os PLT ou f-PL (CI₅₀ e CI_{50/2}) obtidas no experimento com as formas tripomastigotas tratados por 24 h. Como controle negativo, as células foram tratadas com PBS e como controle positivo tratadas com BZ. Após 24 e 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas da placa e lavadas com PBS. Para a fixação das células, as lamínulas foram embebidas em solução de Bouin. Após lavagem com água destilada e etanol (70%), foram mergulhadas em metanol por 2 min. Em seguida, foram coradas com Giemsa (5% v/v em água destilada) durante 20 min. Finalmente, as lamínulas foram lavadas mais uma vez e, após secagem, montadas em lâmina utilizando entelan.

O efeito anti-amastigota dos polissacarídeos foram determinados pela contagem de 300 células em cada lamínula, realizada em microscópio óptico. Em cada célula infectada, foi realizada a contagem de amastigotas internalizados. Dessa forma, foi calculado o percentual de células infectadas, a quantidade de amastigotas por células e o índice de sobrevivência (SuI), usando as fórmulas (LIMA et al., 2016; MARÍN et al., 2015):

$$\text{Células infectadas (\%)} = n^{\circ} \text{ de células infectadas} / 300 \times 100$$

$$\text{Amastigotas/células infectadas} = n^\circ \text{ de amastigotas totais} / n^\circ \text{ de células infectada}$$

$$\text{SuI} = n^\circ \text{ de células infectadas} \times \text{amastigotas/células infectadas}$$

4.2.7 Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo

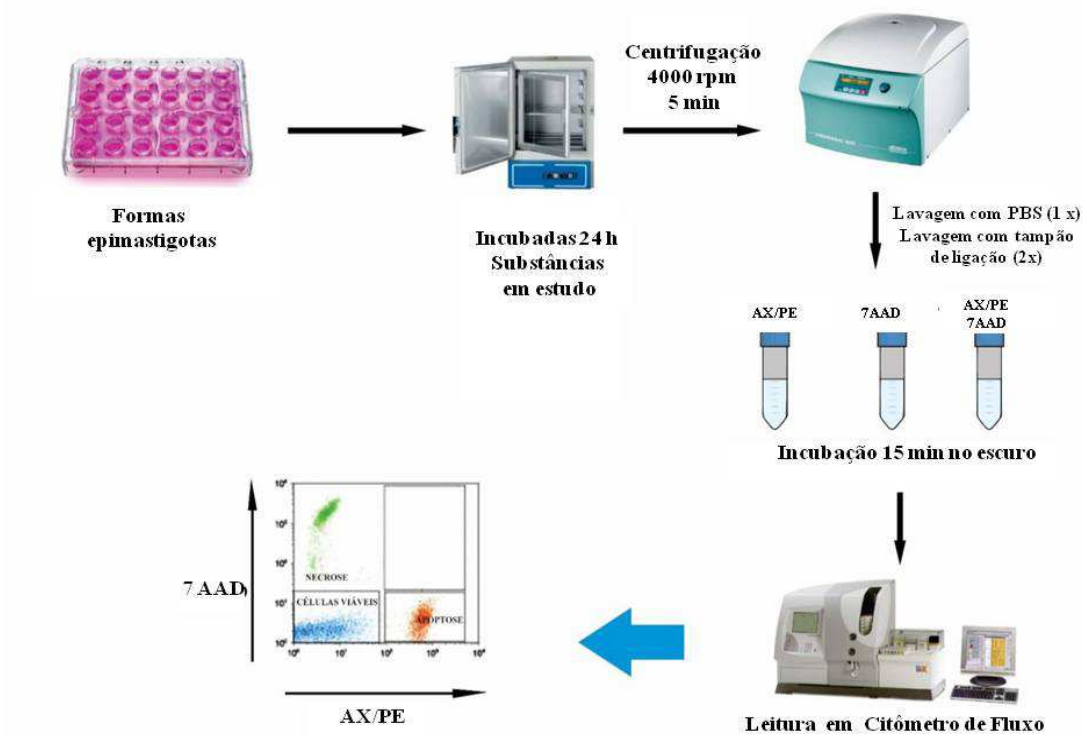
4.2.7.1 Avaliação de apoptose e/ou necrose

A avaliação do mecanismo de morte celular induzido pelos polissacarídeos foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o 7-AAD (7-aminoactinomicyn D) e a Anexina V marcada com a ficoeritrina (Ax/PE) como marcadores fluorescentes.

O 7-AAD liga-se a cadeias de DNA celular, no qual é impermeável à membrana celular íntegra, dessa forma é um sinalizador importante da perda de integridade da membrana caracterizando morte celular por necrose. A Ax/PE liga-se fortemente a fosfatidilserina, um fosfolipídio interno da membrana plasmática, que é externalizado no estágio inicial da apoptose, sendo utilizado como marcador desse tipo de morte celular (ATALE et al., 2014; WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2011).

Formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com os PLT (CI₅₀), f-PL (CI₅₀) ou PBS (controle) por 24 h em placas de 24 poços em estufa BOD. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubos de citometria e centrifugadas a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com PBS e duas vezes com tampão de ligação (0,01 M HEPES/NaOH, pH 7,4, NaCl 0,14 M, CaCl₂ 2,5 mM). Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL do tampão de ligação, 5 µL 7-AAD e Anexina V-PE (BD Pharmingen™, usando um kit comercial – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I) e incubados por 15 min no escuro. Após esse período, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação e as células foram analisadas no citômetro (FACSCalibur®, BD Pharmigen) (Figura 19).

Figura 19 - Protocolo de processamento das amostras para análise do perfil de morte celular.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para cada tubo, um mínimo de 10^4 células foram analisadas para a quantificação de células não-marcadas e individualmente ou duplamente marcadas com 7-AAD e Ax/PE. Para isso, foi usado laser de argônio (488 nm) para excitar os fluorocromos. As células marcadas com Ax/PE foram lidas pelo detector FL2 (563 a 606 nm, fluorescência amarela), enquanto que as células marcadas com 7-AAD foram lidas em comprimento de onda de 615 a 645 nm (fluorescência vermelha, detector FL3) (KESSLER et al., 2013).

4.2.7.2 Avaliação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial

O potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123). A Rho123 é um corante catiônico que se acumula no espaço intermembranar de mitocôndrias viáveis, emitindo fluorescência vermelha. Lesão mitocondrial provoca a redução do acúmulo desse corante, que passa para o citoplasma, onde emite fluorescência verde (BARACCA et al., 2003).

Formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com os PLT (CI₅₀), f-PL (CI₅₀) e PBS (controle) por 24 h em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram transferidas para tubos, centrifugadas e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e foi adicionado 5 μ L de Rho 123 (10 μ g/mL) e incubadas no escuro por 30 min. Por fim, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em PBS (500 μ L/tubo), analisadas por citometria de fluxo utilizando detector FL2 (Figura 20) (SAMPAIO et al., 2016).

Os resultados foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, utilizando a fórmula:

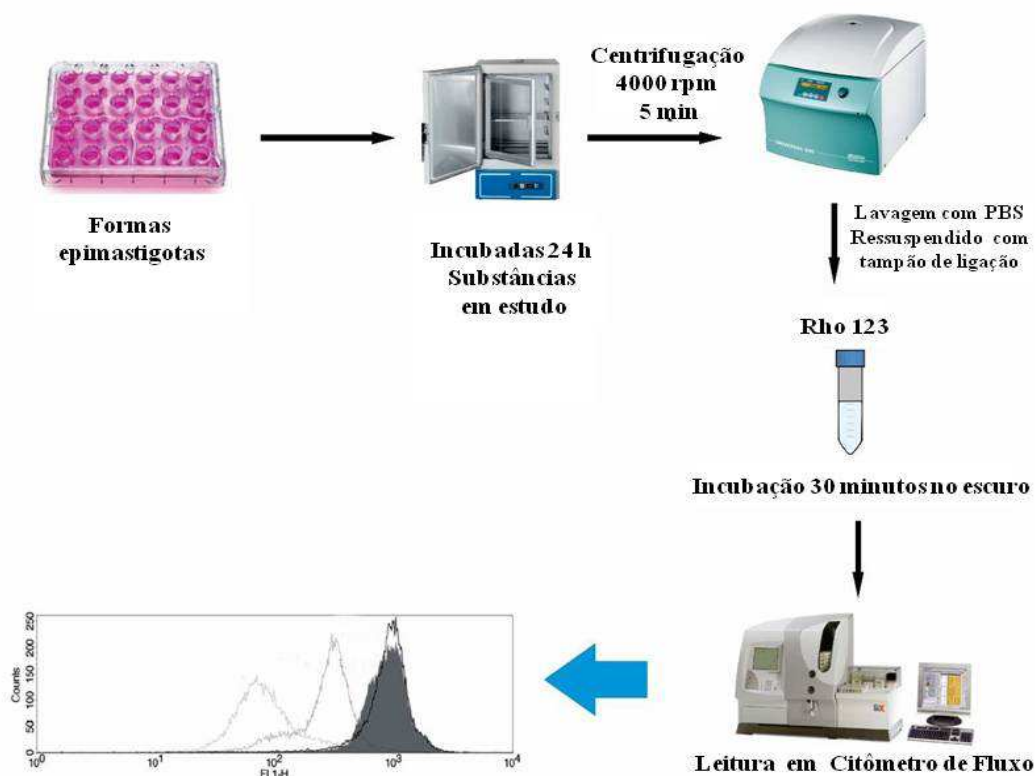
$$\text{Fluorescência relativa} = m\text{TESTE}/m\text{CONTROLE}$$

Onde:

mTESTE = média geométrica do grupo a ser analisado;

mCONTROLE = valor médio da média geométrica do grupo controle.

Figura 20 - Protocolo de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.



Fonte: Elaborada pelo autor.

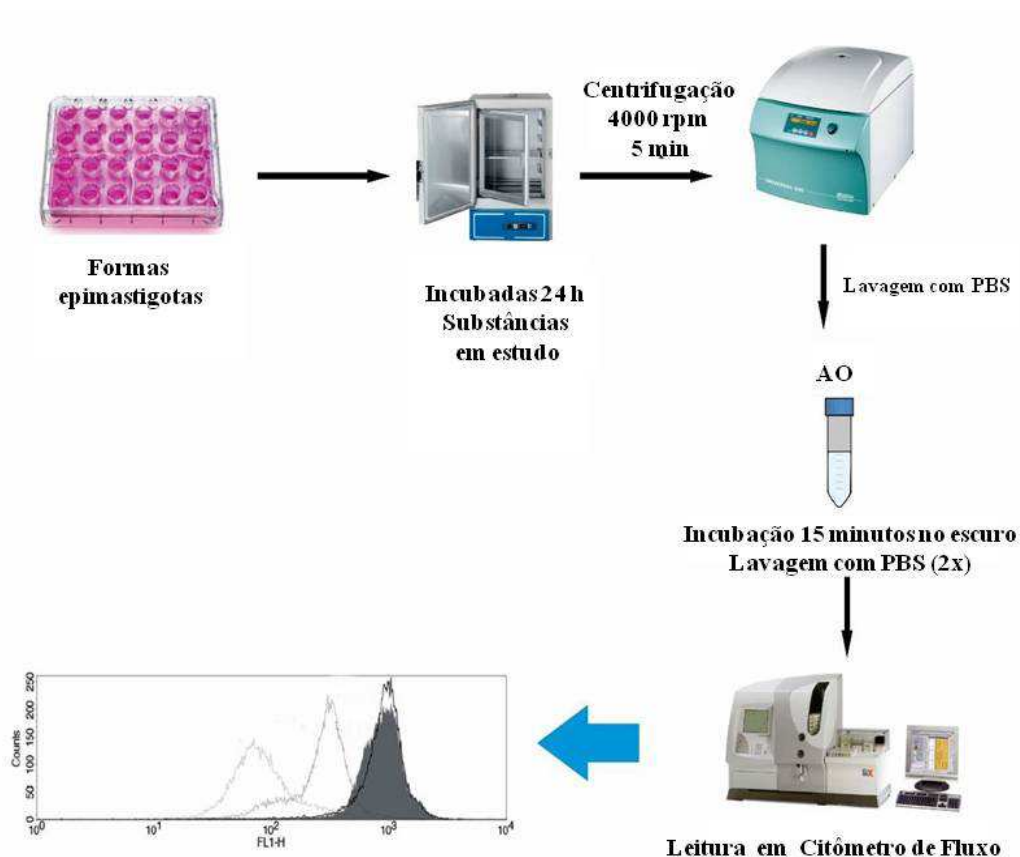
4.2.7.3 Avaliação da tumefação de reservossomos

O volume dos reservossomos de epimastigotas tratados com os polissacarídeos foi avaliado utilizando laranja de acridina (AO, *acridine orange*). Esse corante tem tropismo por compartimentos ácidos intracelulares, de forma que se acumula nos reservossomos de *T. cruzi*, emitindo fluorescência alaranjada. A tumefação dos lisossomos é uma das alterações indicativas de morte celular por autofagia, que causa aumento do acúmulo de AO, podendo ser analisadas por citometria de fluxo (ATALE et al., 2014; KESSLER et al., 2013).

Formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com os PLT (CI₅₀), f-PL (CI₅₀) e PBS (controle) por 24 h em placas de 24 poços. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado duas vezes com PBS, ressuspensão em 500 μ L de PBS incubados com 2,5 μ L de

AO (10 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas por 15 min no escuro. Por fim, as células foram lavadas duas vezes, resuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo, utilizando detector FL3 (KESSLER et al., 2013) (Figura 21). Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência relativa.

Figura 21 - Protocolo de avaliação da tumefação de reservossomos.



Fonte: Elaborada pelo autor

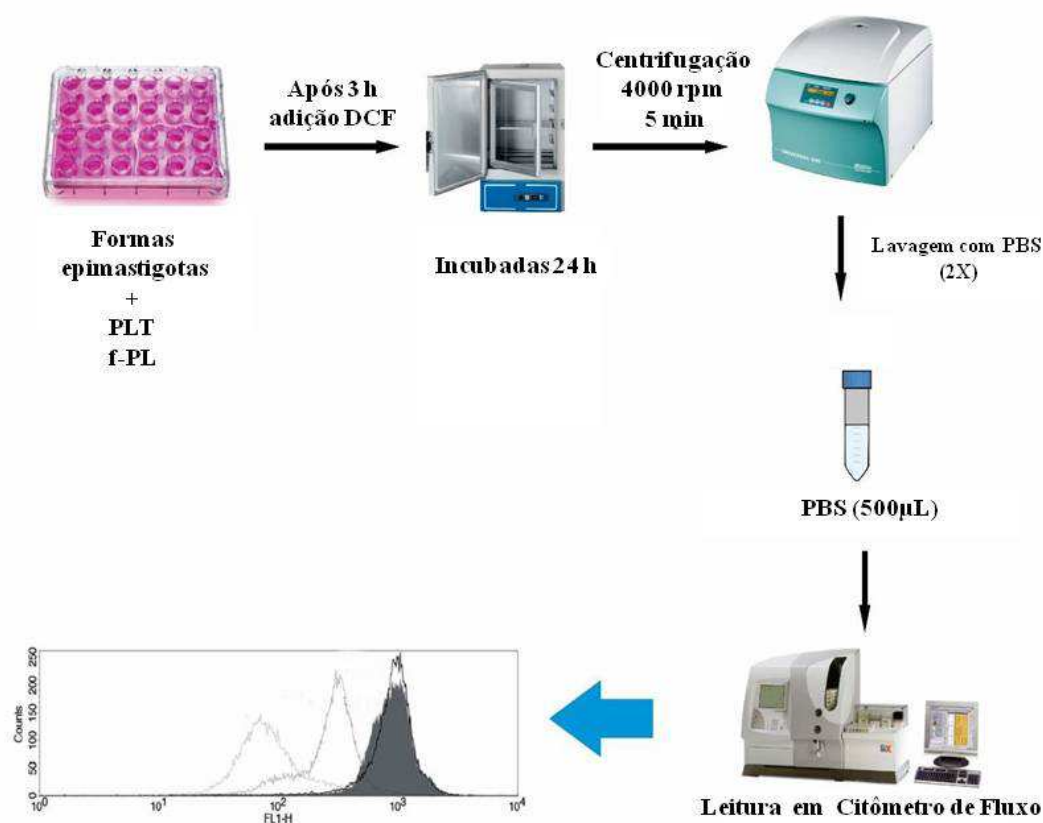
4.2.7.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

O aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma de células epimastigotas tratadas com os polissacarídeos foi avaliada utilizando o reagente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCFH-DA}$). O $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ avalia a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de outros peróxidos, tais como, peróxidos lipídicos, o qual é oxidado ao composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) sendo utilizado como marcador para o estresse oxidativo da célula. A intensidade de

fluorescência emitida pela célula é diretamente proporcional à concentração intracitoplasmática de EROs (CHEN et al., 2010).

Formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram incubadas com os PLT (CI₅₀), f-PL (CI₅₀) e PBS (controle) em placa de 24 poços. Após 3 h de incubação, adicionou-se 10 μ L de uma solução de H₂DCFH-DA (2 mM). Após 24 h, as células foram centrifugadas (4000 rpm por 5 min), lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 500 μ L de PBS. Por fim, as células foram analisadas em citômetro de fluxo pelo detector FL1 (fluorescência verde, de 515 a 545 nm) (Figura 22). Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência relativa.

Figura 22 - Protocolo de avaliação para a marcação com diacetato de 2'-7'-dichlorofluoresceína (H₂DCFH-DA).

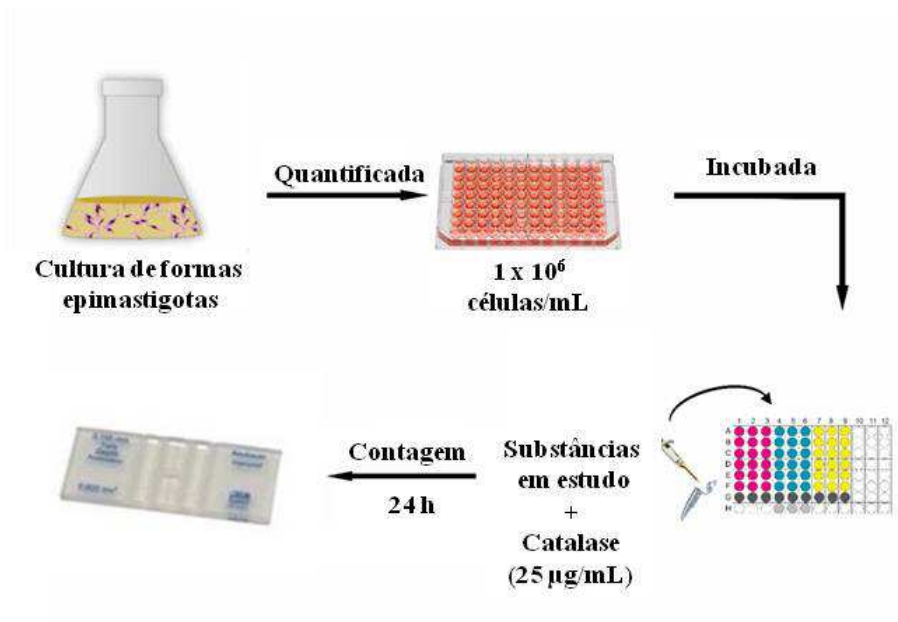


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.8 Bloqueio da atividade antiparasitária dos polissacarídeos com catalase

Com a finalidade de investigar o papel do H₂O₂ extracelular sobre o efeito dos polissacarídeos em *T. cruzi*, as formas epimastigotas (1 x 10⁶ células/mL) foram cultivadas, conforme descrito nos itens anteriores, tratadas com os PLT (CI₅₀), f-PL (CI₅₀) ou PBS (controle) na presença ou ausência de catalase (CAT - 25µg/mL) por 24 h (Figura 23). Posteriormente, a inibição do crescimento parasitário foi quantificada em câmara de Neubauer (GUO et al., 2015 com modificações).

Figura 23 - Ensaio de bloqueio da atividade dos polissacarídeos com catalase.



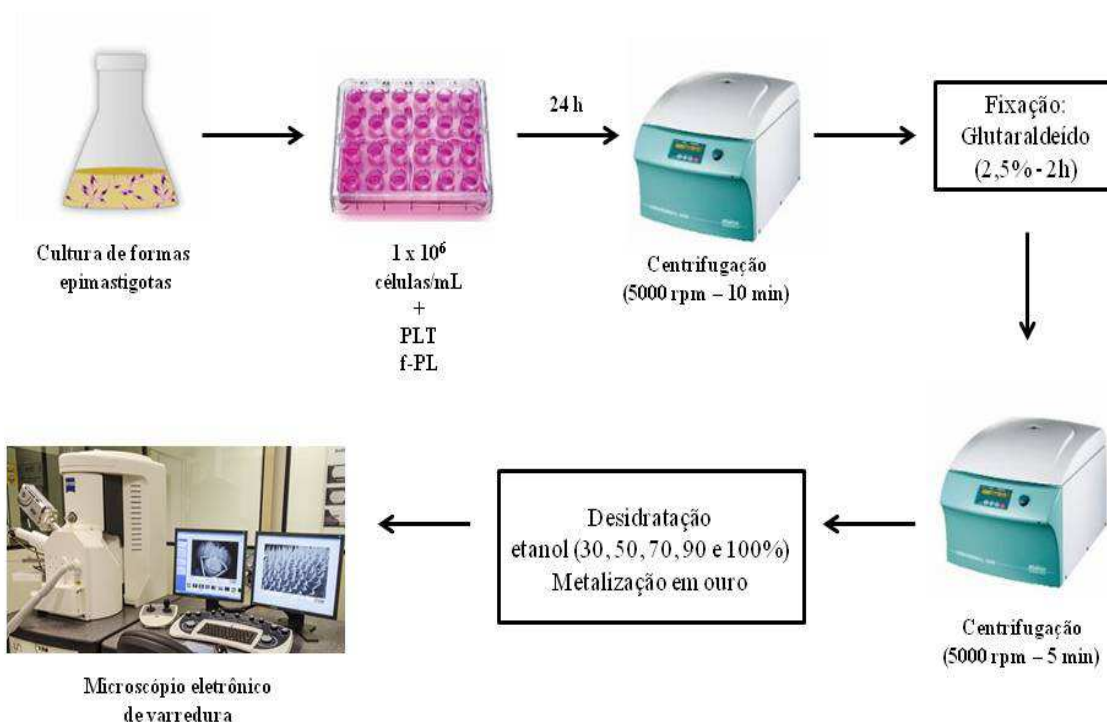
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.9 Avaliação das alterações morfológicas induzidas pelos polissacarídeos em *T. cruzi*

Para avaliação das alterações induzidas pelos PLT (CI₅₀) e f-PL (CI₅₀) na ultraestrutura de *T. cruzi*, as formas epimastigotas foram incubadas com estas por 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm; 10 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em solução de glutaraldeído (2,5%) e incubado por 2 h.

As amostras fixadas foram novamente centrifugadas e expostas a concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) para desidratação, seguida de centrifugação (5000 rpm; 5 min). Por fim, as células foram transferidas para a superfície de lamínulas circulares (15 mm) e secas em estufa de CO₂. As lamínulas foram cobertas com camada de ouro (espessura de 20 nm) utilizando a Metalizadora QT150 ES-Quorum e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG-FEI, para observação das alterações na estrutura tridimensional das formas epimastigotas de *T. cruzi* (VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009) (Figura 24).

Figura 24 - Processamento e análise de amostras de *T. cruzi* por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ou teste t Student, considerando-se $p < 0,05$ como critério de significância. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism versão 5.0 e Microsoft Office® Excel 2010.

PARTE 1:

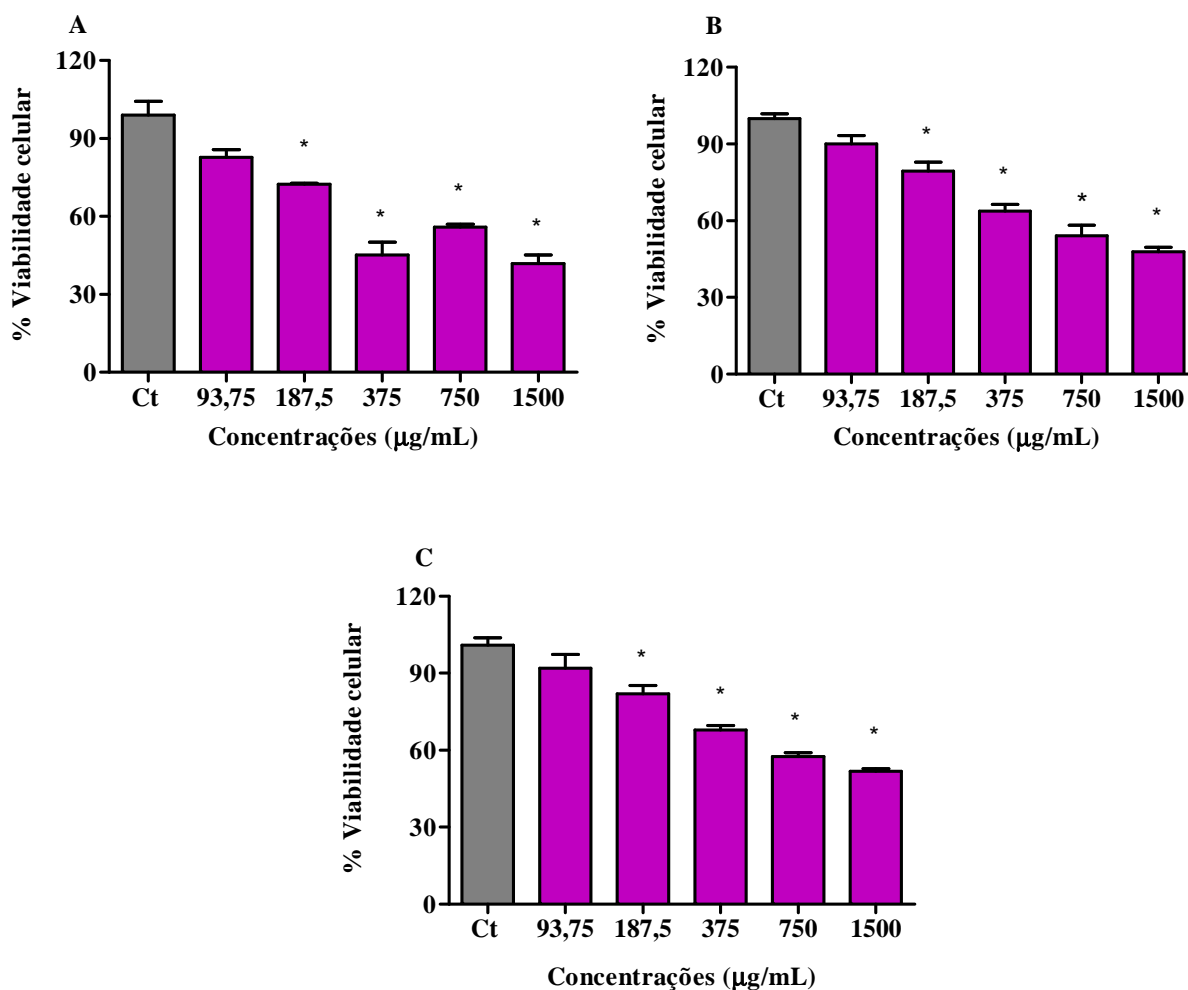
Estudo *in vitro* da atividade tripanocida dos extratos polissacarídicos em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos dos extratos polissacarídicos vegetais nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios de citotoxicidade dos extratos vegetais sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram realizados após 24, 48 e 72 h de incubação com os PLT. Os parasitos, após incubado com os PLT, apresentaram diversas alterações morfológicas, tais como, ausência de flagelo, perda de motilidade e alteração de formato típico. Os resultados demonstraram que todos os extratos vegetais apresentaram efeito inibitório sobre as formas epimastigotas nos três tempos testados (Figuras 25-29). As concentrações inibitórias obtidas por regressão não-linear foram: *A. indica* ($CI_{50/24h} = 870 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48h} = 1080 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72h} = 1350 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$), *C. ferrea* ($CI_{50/24h} = 460 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48h} = 2070 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72h} = 660 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$), *G. americana* ($CI_{50/24h} = 740 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48h} = 710 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72h} = 870 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$), *G. spinosa* ($CI_{50/24h} = 770 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48h} = 1420 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72h} = 1460 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$), *X. americana* ($CI_{50/24h} = 1560 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48h} = 4560 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72h} = 1180 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$).

Figura 25 – Efeito dos PLT de *A. indica* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

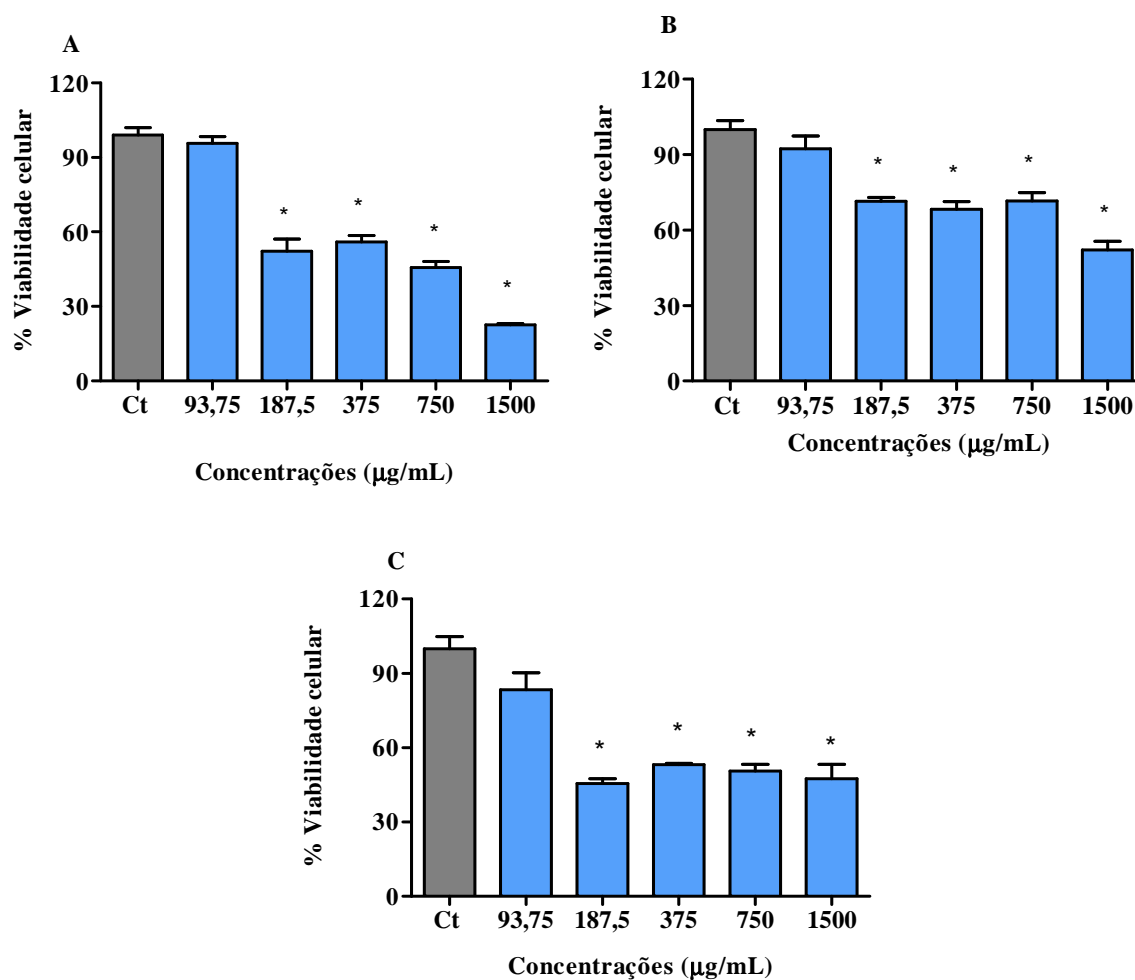


Legenda:

Os PLT de *A. indica* reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Efeito dos PLT de *C. ferrea* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

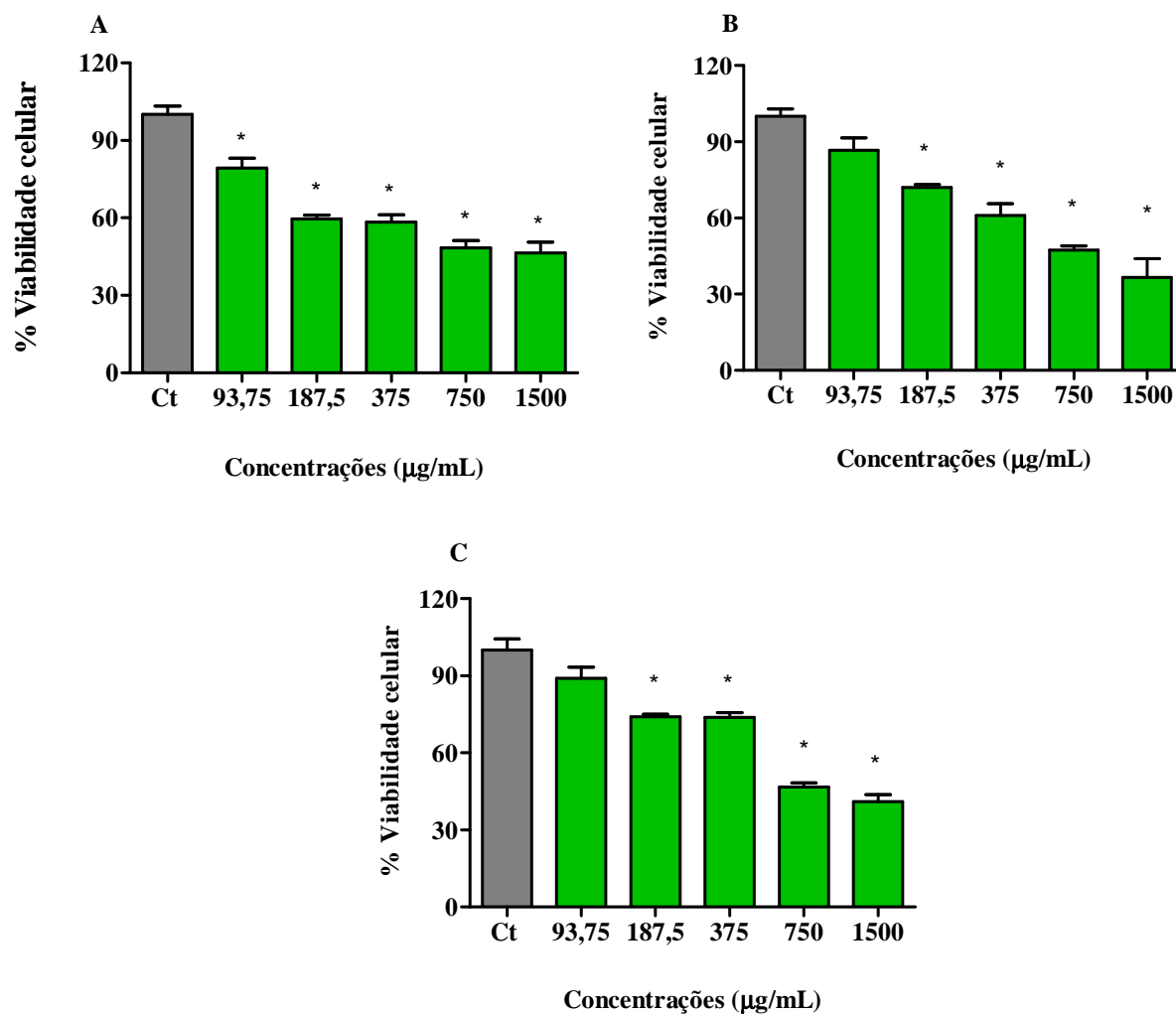


Legenda:

Os PLT de *C. ferrea* reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 27 - Efeito dos PLT de *G. americana* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

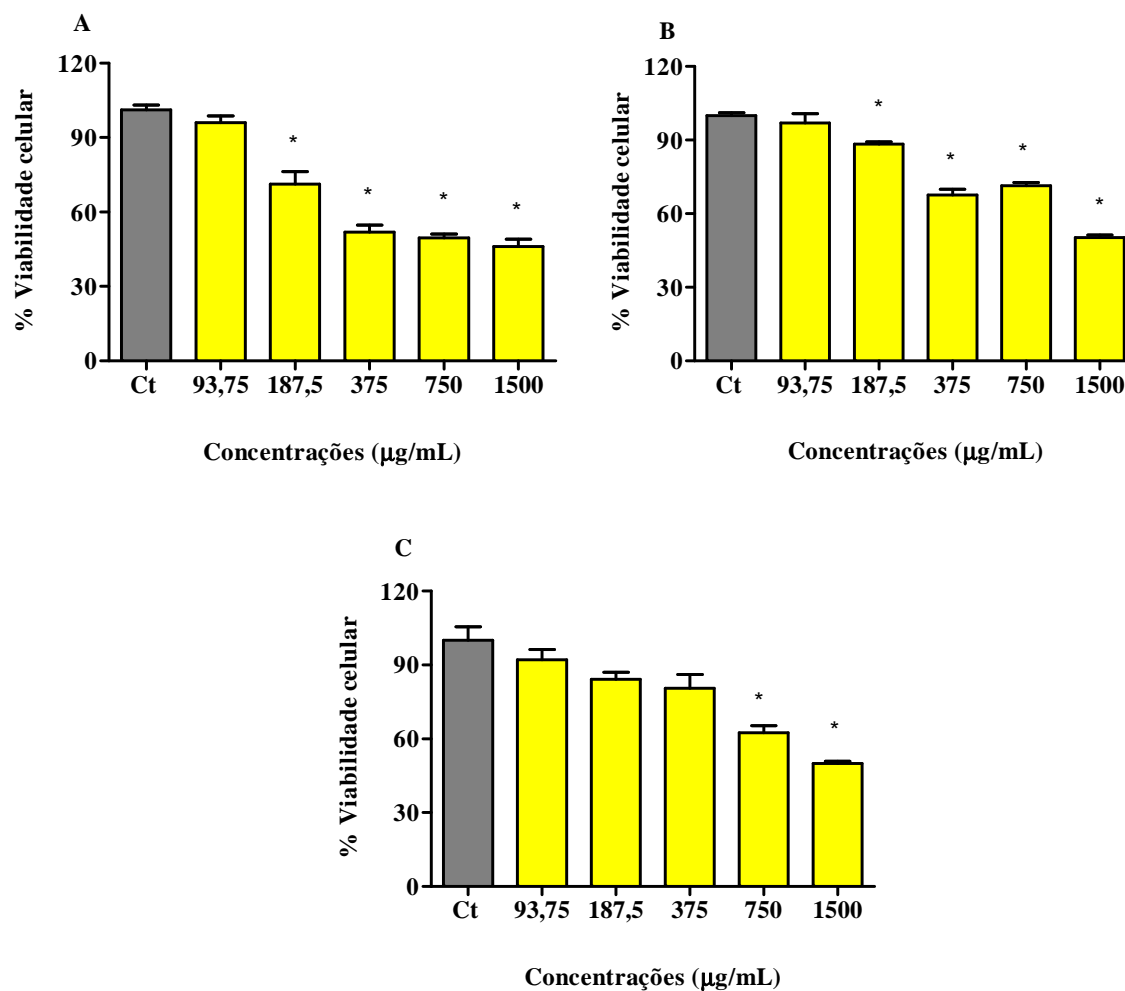


Legenda:

Os PLT de *G. americana* reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 - Efeito dos PLT de *G. spinosa* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

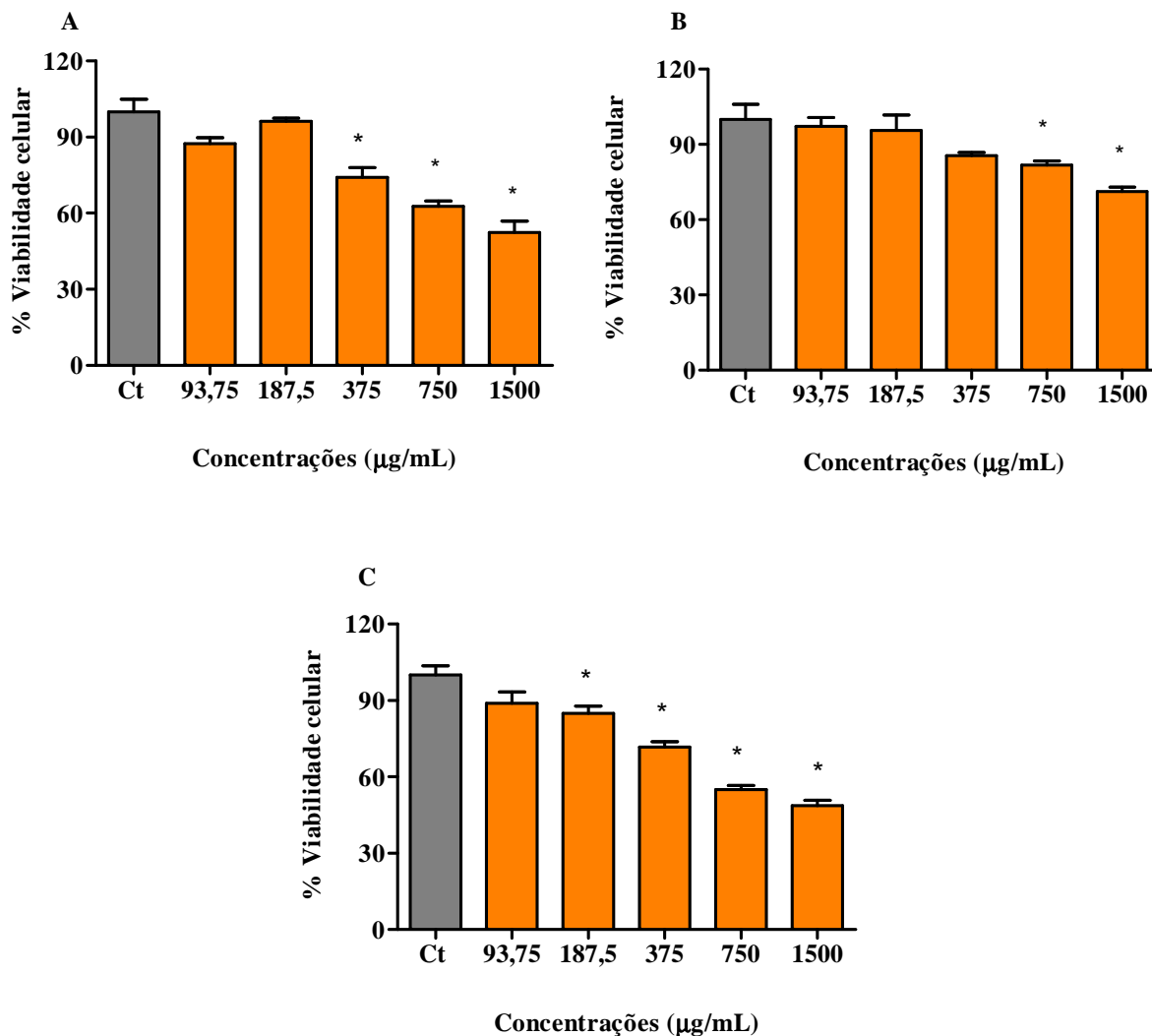


Legenda:

Os PLT de *G. spinosa* reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 - Efeito dos PLT de *X. americana* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

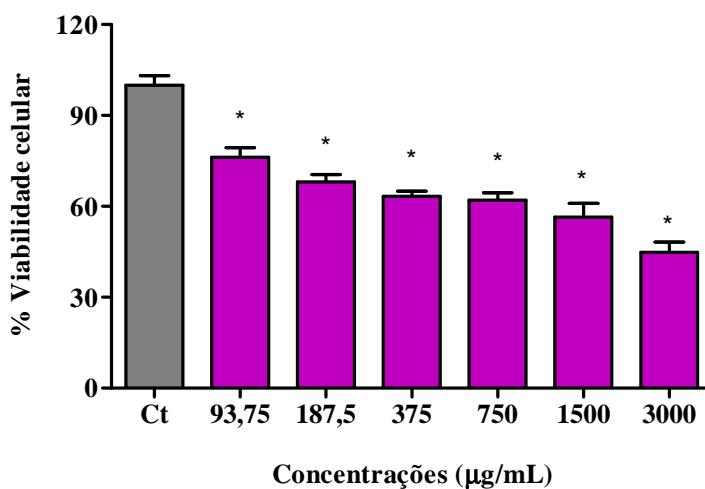
Os PLT de *X. americana* reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Efeitos dos extratos polissacarídicos vegetais nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante de células LLC-MK₂ infectadas foram incubadas com os PLT das espécies vegetais em diferentes concentrações por 24 h. Após incubação, foi observado que os PLT de todas as espécies foram capazes de causar morte nas formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas (93,75 – 3000 µg/mL) (Figuras 30-34). Após análise de regressão não-linear, foram obtidos os seguintes valores de LC₅₀: *A. indica* (LC₅₀ = 2400 ± 0,24 µg/mL), *C. ferrea* (LC₅₀ = 840 ± 0,08 µg/mL), *G. americana* (LC₅₀ = 470 ± 0,08 µg/mL), *G. spinosa* (LC₅₀ = 670 ± 0,05 µg/mL) e *X. americana* (LC₅₀ = 1450 ± 0,06 µg/mL).

Figura 30 - Efeito dos PLT de *A. indica* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

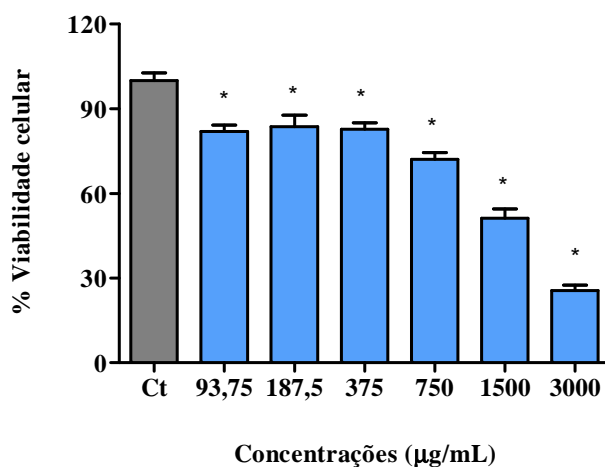


Legenda:

Os PLT de *A. indica* reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05 vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

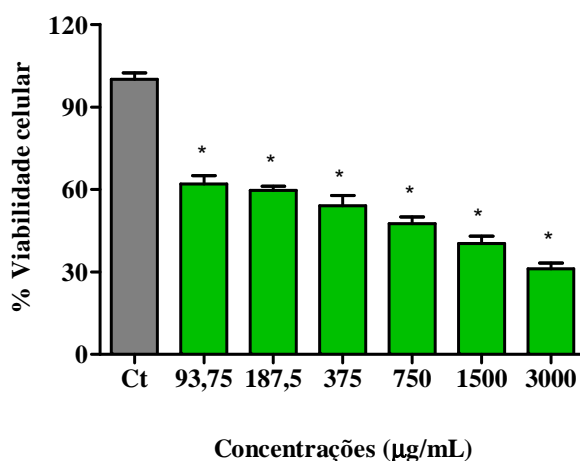
Figura 31 - Efeito dos PLT de *C. ferrea* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

Os PLT de *C. ferrea* reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

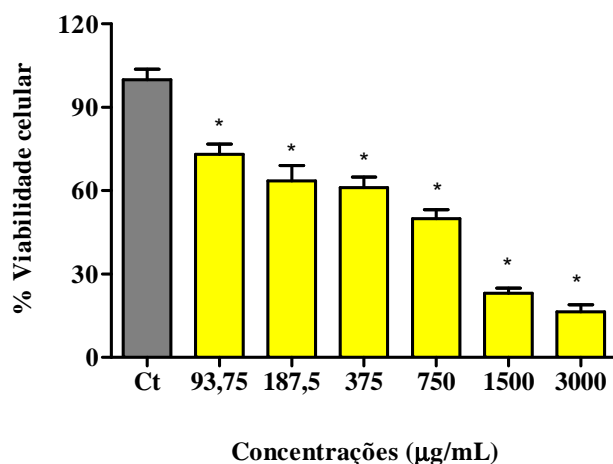
Figura 32 - Efeito dos PLT de *G. americana* sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

Os PLT de *G. americana* reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

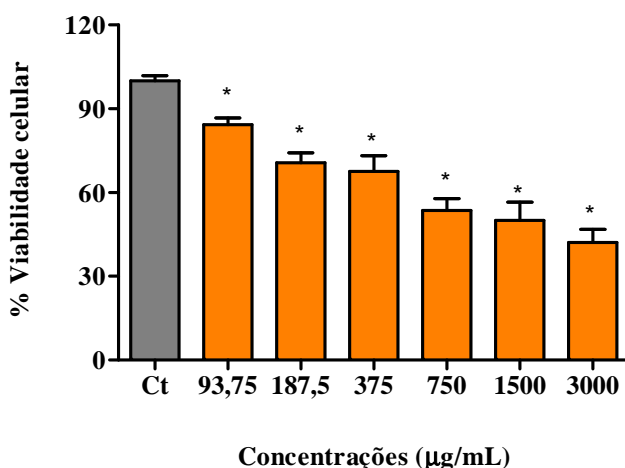
Figura 33 - Efeito dos PLT de *G. spinosa* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

Os PLT de *G. spinosa* reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 - Efeito dos PLT de *X. americana* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*.



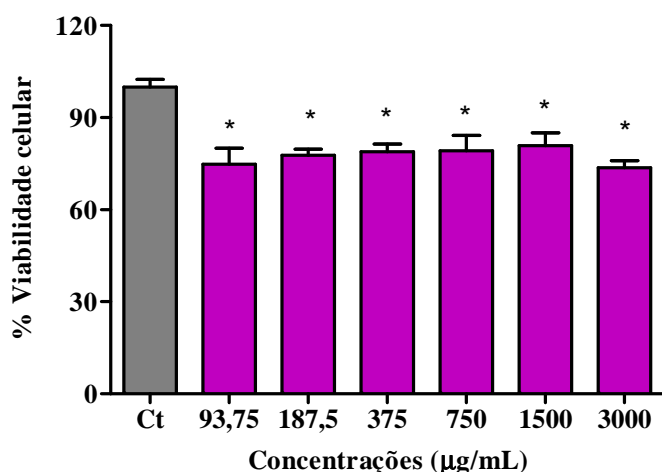
Legenda:

Os PLT de *X. americana* reduziu a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Efeito citotóxico dos extratos polissacarídicos vegetais sobre a viabilidade de células LLC-MK₂

Para avaliar o efeito citotóxico dos PLT sobre células hospedeiras de *T. cruzi*, as células LLC-MK₂ foram selecionadas para este estudo sendo submetidas ao ensaio do MTT. Foi observada redução da viabilidade celular nos grupos tratados com os PLT de *A. indica*, *C. ferrea*, *G. americana*, *G. spinosa* e *X. americana* após 24 h (Figuras 35-39). No entanto, os PLT de *G. americana* reduziram a viabilidade celular apenas nas duas maiores concentrações testadas, apresentando uma CC₅₀ de 2250 ± 0,07 µg/mL.

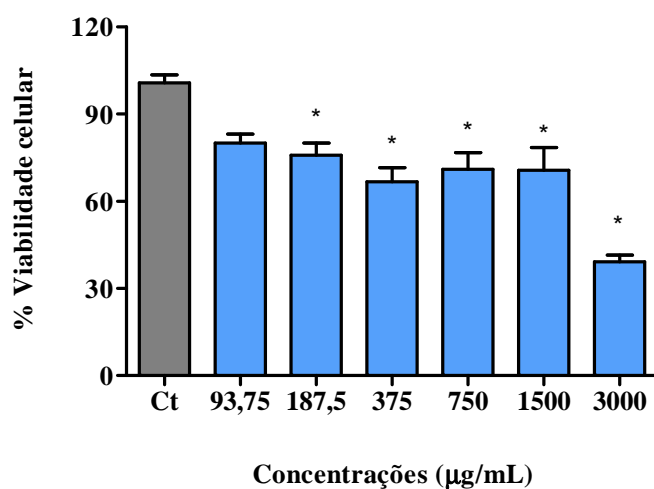
Figura 35 - Efeito dos PLT de *A. indica* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda:

Os PLT de *A. indica* reduziu a viabilidade das células LLC-MK₂ em todas as concentrações testadas. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05 vs. controle). (Ct = grupo controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

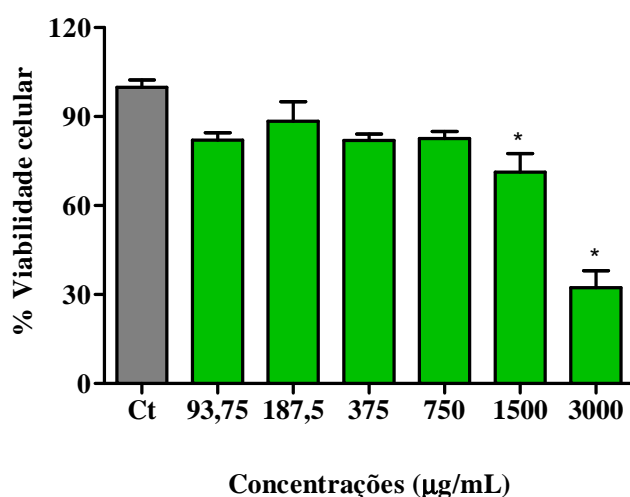
Figura 36 - Efeito dos PLT de *C. ferrea* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda:

Os PLT de *C. ferrea* reduziu a viabilidade das células LLC-MK₂ nas concentrações de 187,5 – 3000 µg/mL. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p< 0,05 vs. controle). (Ct = grupo controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

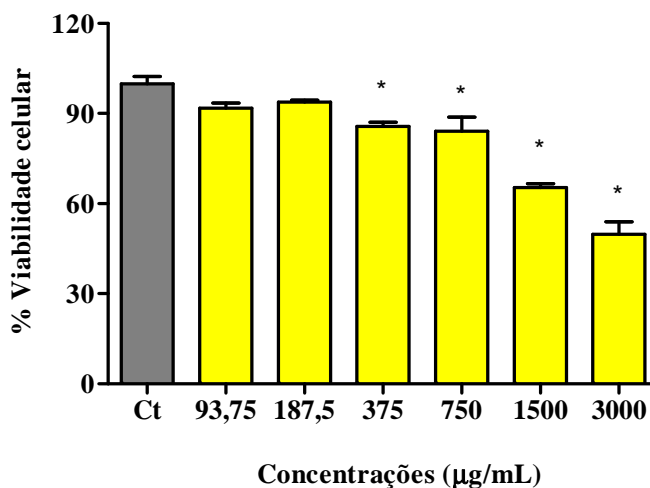
Figura 37 - Efeito dos PLT de *G. americana* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda:

Os PLT de *G. americana* reduziu a viabilidade das células LLC-MK₂ nas concentrações de 1500 e 3000 µg/mL. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p< 0,05 vs. controle). (Ct = grupo controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

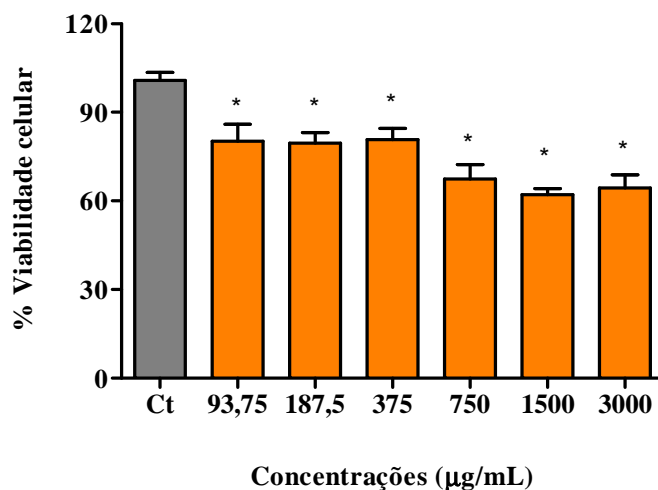
Figura 38 - Efeito dos PLT de *G. spinosa* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda:

Os PLT de *G. spinosa* reduziu a viabilidade das células LLC-MK₂ nas concentrações de 375 - 3000 µg/mL. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05 vs. controle). (Ct = grupo controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 39 - Efeito dos PLT de *X. americana* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda:

Os PLT de *X. americana* reduziu a viabilidade das células LLC-MK₂ em todas as concentrações testadas. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (*p < 0,05 vs. controle). (Ct = grupo controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

Desta forma, ao término da triagem com os PLT das espécies vegetais sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e avaliação do efeito citotóxico sobre as células hospedeiras LLC-MK₂, os PLT de *G. americana* apresentaram as menores CI₅₀ (< 1000 µg/mL) frente aos ensaios tripanocidas, além de baixa toxicidade (Tabela 1).

Com a finalidade de identificar se os PLT de *G. americana* apresentam efeito tripanocida e toxicidade adequados, foi determinado o SeI, através da divisão entre a CC₅₀ e a LC₅₀. Sendo assim, o SeI dos PLT de *G. americana* foi de 4,8, enquanto que o do BZ foi 2,3, indicando desta forma que os PLT de *G. americana* são 4,8 vezes mais seletivo para *T. cruzi* em relação às células hospedeiras.

Tabela 1 - Atividade antiparasitária *in vitro* dos PLT e do BZ sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e células LLC-MK₂.

	BZ (µg/mL)	<i>A. indica</i> (µg/mL)	<i>C. ferrea</i> (µg/mL)	<i>G. americana</i> (µg/mL)	<i>G. spinosa</i> (µg/mL)	<i>X. americana</i> (µg/mL)
Epimastigota						
(CI₅₀)						
24 h	56,76 ± 15	870 ± 0,08	460 ± 0,06	740 ± 0,07	770 ± 0,06	1560 ± 0,04
48 h	15,91 ± 3	1080 ± 0,05	2070 ± 0,13	710 ± 0,05	1420 ± 0,06	4560 ± 0,05
72 h	16,5 ± 1	1350 ± 0,04	660 ± 0,19	870 ± 0,05	1460 ± 0,05	1180 ± 0,06
Tripomastigota						
(LC₅₀)						
24 h	67 ± 20	2400 ± 0,24	840 ± 0,08	470 ± 0,08	670 ± 0,05	1450 ± 0,06
LLC-MK₂						
(CC₅₀)						
24 h	160 ± 75,09	-	4890 ± 0,01	2250 ± 0,07	3044 ± 0,05	-

Legenda:

CC₅₀ = concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade em células hospedeiras; CI₅₀ = concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das formas epimastigotas; LC₅₀ = concentração capaz de causar morte de 50% das formas tripomastigotas. Média ± EPM (n=3), ANOVA e teste de Bonferroni. Fonte: Elaborada pelo autor.

Estes resultados incentivaram a continuidade do estudo e possibilitaram a escolha da espécie *G. americana* para dar prosseguimento aos ensaios sobre as formas intracelulares, investigação do mecanismo de morte celular e alterações morfológicas.

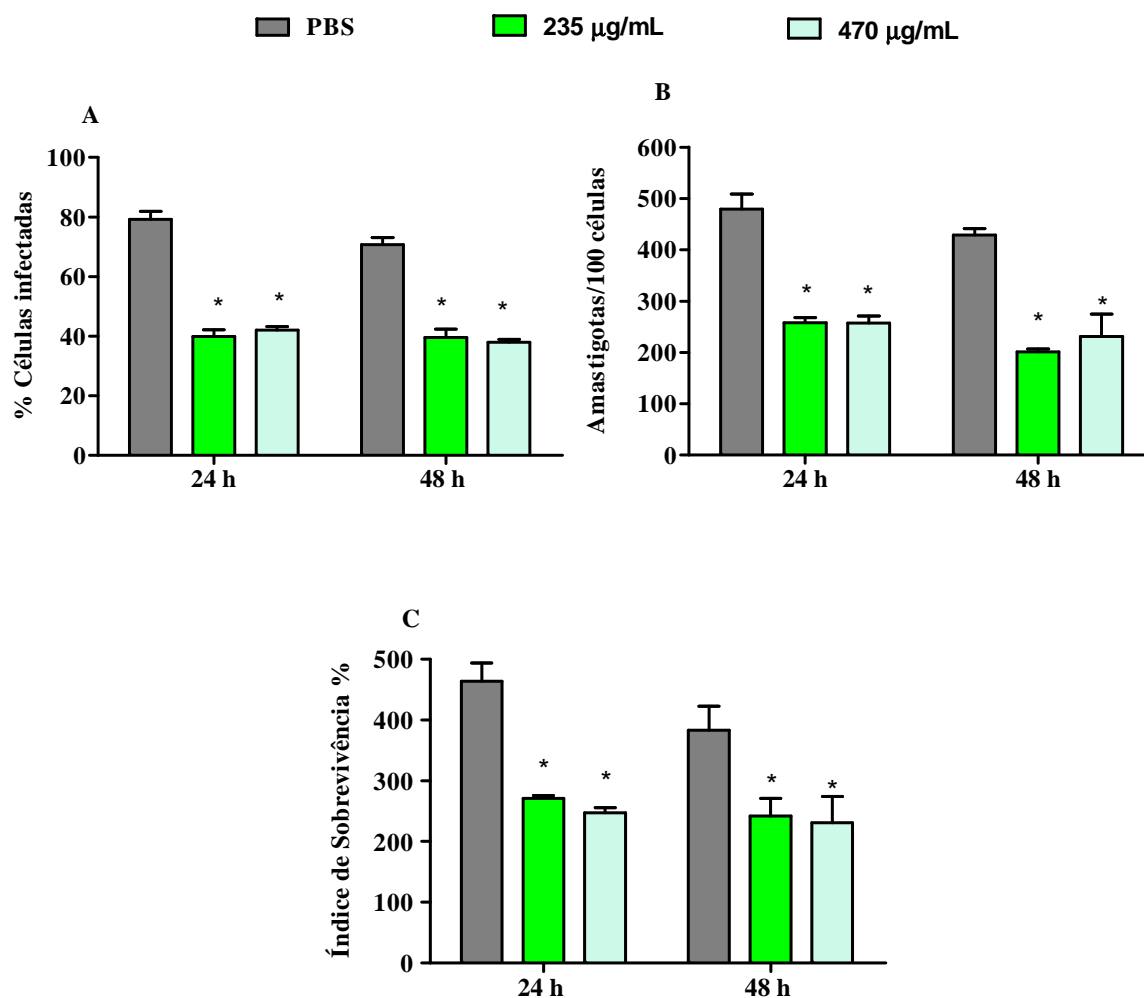
5.4 PLT de *G. americana* reduz o número de amastigotas

Para investigar o efeito dos PLT de *G. americana* sobre a forma intracelular do *T. cruzi*, foi realizado ensaio utilizando concentrações não tóxicas para as células hospedeiras LLC-MK₂. A análise dos dados foi realizada em lâminas contendo células LLC-MK₂ infectadas por *T. cruzi*. Após 24 e 48 h de incubação com os PLT de *G. americana* nas concentrações de 235 µg/mL (CI_{50/2}) e 470 µg/mL (CI₅₀), as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para a contagem do número de células infectadas e a contagem de amastigotas.

Os resultados demonstraram que células tratadas com os PLT (235 e 470 µg/mL) reduziram o percentual de células infectadas em 49% e 46% (24 h), e 44% e 53% (48 h), respectivamente (Figura 40-A). Além disso, os PLT de *G. americana* também reduziram o número de amastigotas/100 células em 46% (24 h) e em 53% (48 h), respectivamente (Figura 40-B). O efeito anti-amastigota também foi comprovado pela redução do índice de sobrevivência das formas amastigotas (Figura 40-C). Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados.

Análises de microscopia óptica confirmaram que os PLT de *G. americana* reduziram significativamente a infecção celular em ambas as concentrações e períodos observados (Figura 41).

Figura 40 - Efeito dos PLT de *G. americana* em formas amastigotas de *T. cruzi*.

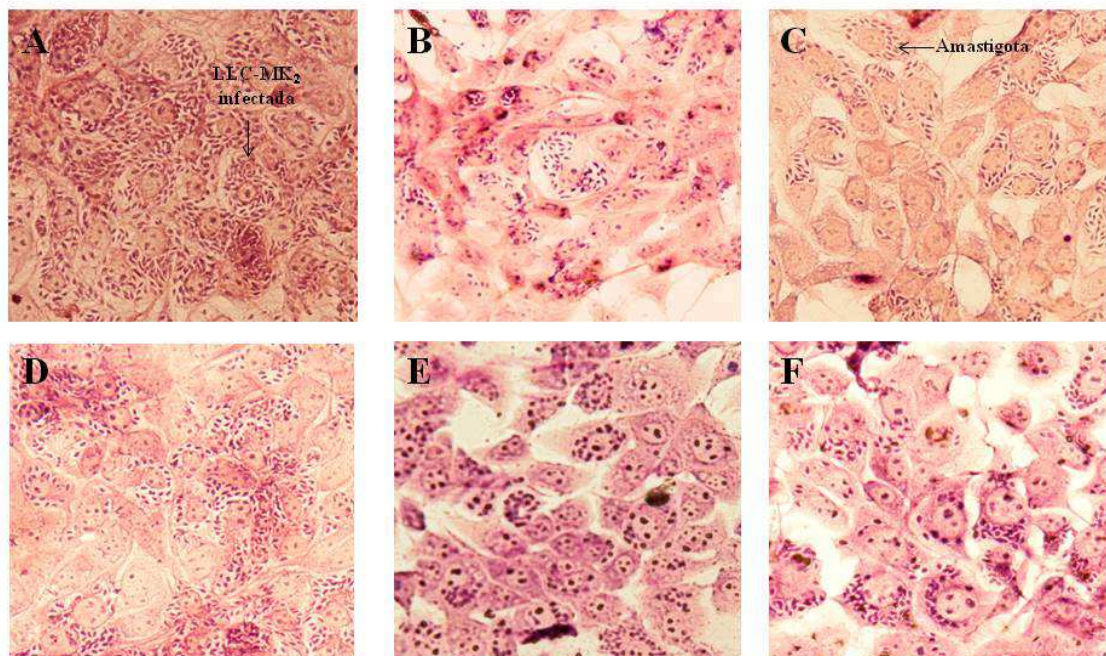


Legenda:

PLT de *G. americana* reduziu o percentual de células infectadas (A); o número de amastigotas por células (B) e o percentual do índice de sobrevivência (C). Os dados foram expressos como percentual \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle). (PBS = controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 – Fotomicrografia de células LLC-MK₂ infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi* após tratamento com os PLT de *G. americana*.



Legenda:

Microscopia óptica das células LLC-MK₂ infectadas por *T. cruzi* tratadas com os PLT de *G. americana*. 24 h (A, B, C): A – grupo controle; B – Células tratadas com 235 µg/mL; C – Células tratadas com 470 µg/mL; 48 h (D, E, F): D – grupo controle; E - Células tratadas com 235 µg/mL; F - Células tratadas com 470 µg/mL. Aumento de 200 ×, usando Microscópio óptico.

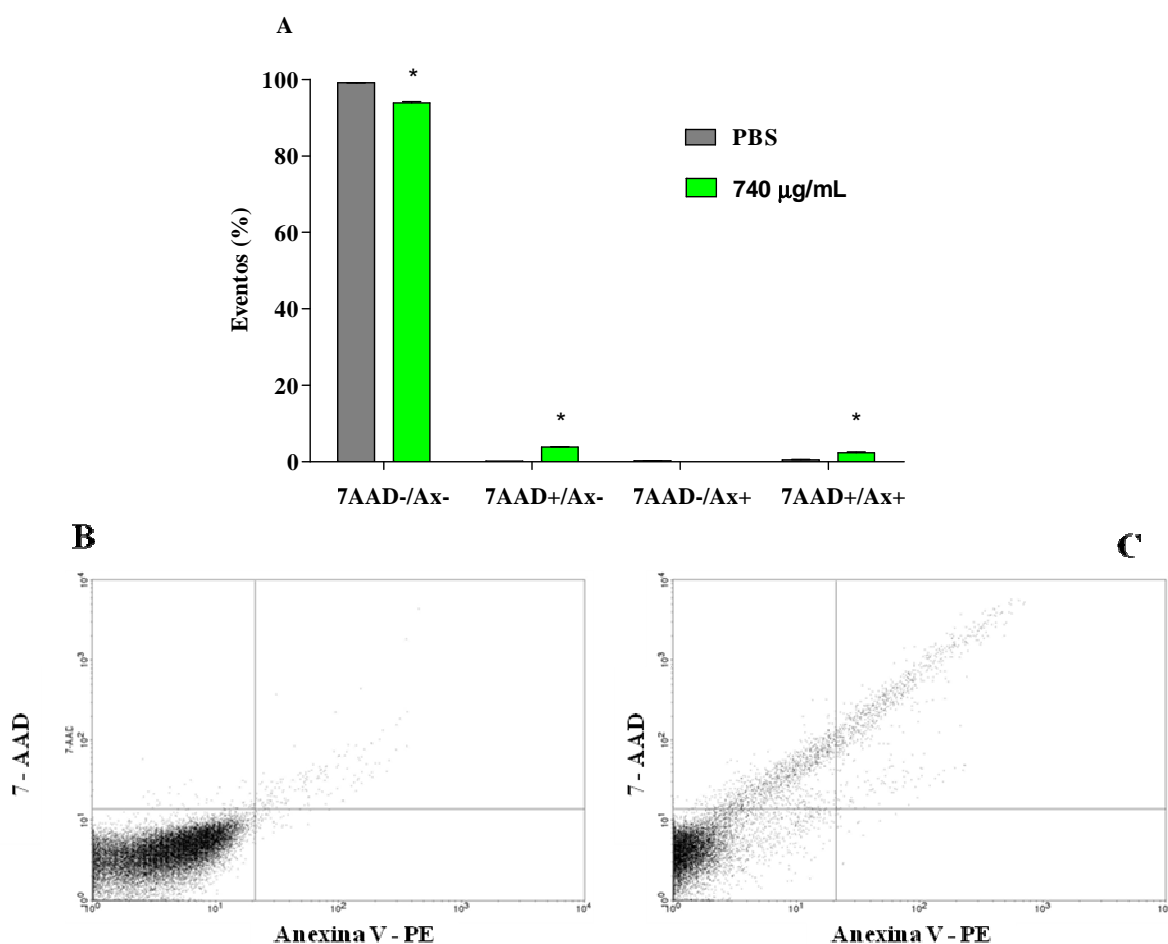
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 PLT de *G. americana* induz morte celular por necrose

Formas epimastigotas foram utilizadas para avaliação do perfil de morte celular, através da marcação com anexina V-PE e 7-AAD e analisadas em citometria de fluxo. As células foram divididas em quatro populações celulares: células viáveis, com baixo nível de marcação para os fluorocromos (7-AAD-/AX-); células necróticas, marcadas apenas com 7-AAD (7-AAD+/ AX-); células apoptóticas, marcadas apenas com anexina V-PE (7-AAD-/Ax+); e células em apoptose tardia, marcadas duplamente (7-AAD+/Ax+).

As células foram incubadas por 24 h na concentração de 740 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50}) e foi observado a redução do percentual de células viáveis e aumento predominantemente significativo do percentual de células marcadas com 7-AAD, indicando morte celular por necrose (Figura 42-A). Esse aumento também pode ser observado pelo deslocamento das populações celulares, apresentado no gráfico *density plot* de dispersão das células (Figura 42-C).

Figura 42 - Perfil de morte celular induzido pelos PLT de *G. americana* avaliado por citometria de fluxo.



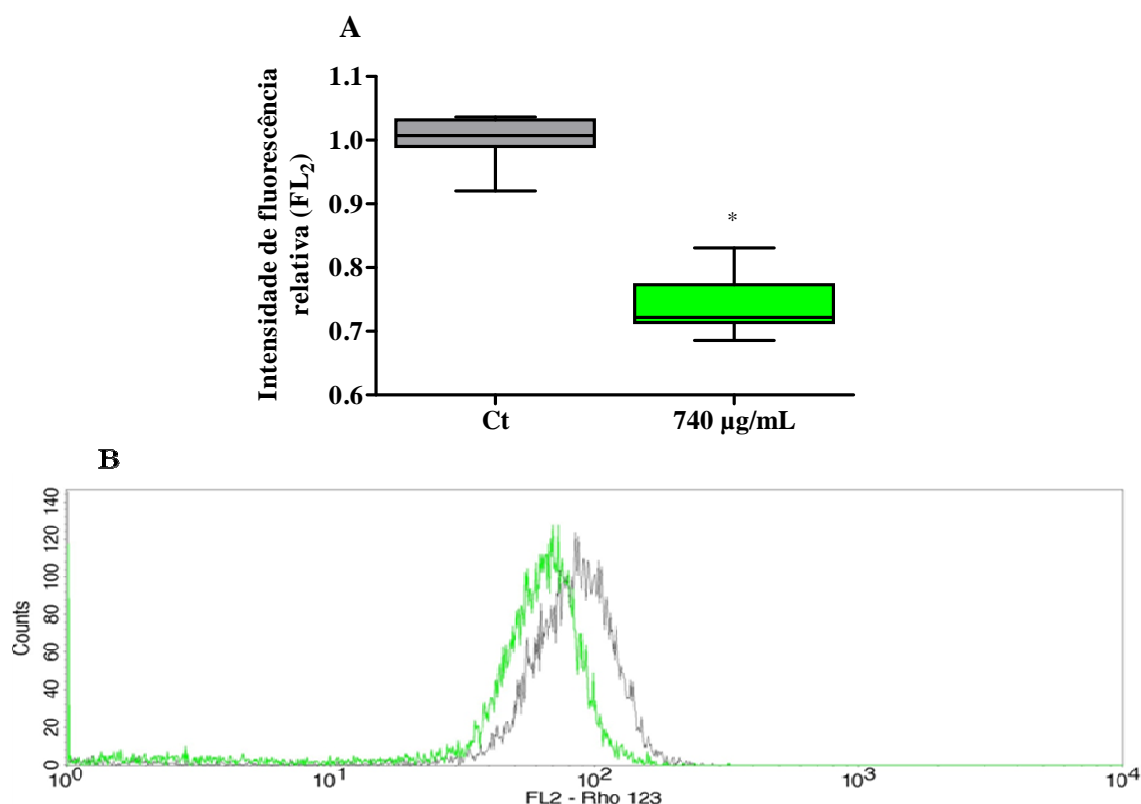
Legenda:

(A) Avaliação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$). 7-AAD-/Ax- = células viáveis; 7-AAD+/Ax- = células necróticas; 7-AAD-/Ax+ = células apoptóticas; 7-AAD+/Ax+ = apoptose tardia. (B-C) Histograma de dispersão de células por intensidade de marcação por anexina V-PE e 7-AAD. (B - PBS). (C – grupo tratado). Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle). Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 PLT de *G. americana* induz alteração no potencial transmembrânico mitocondrial

A Rho 123 foi utilizada para investigar se os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$ - CI_{50}) induz alteração no potencial mitocondrial em *T. cruzi*. As formas epimastigotas foram tratadas por 24 h e foi observado uma redução na intensidade de fluorescência (Figura 43-A). Esse resultado pode ser visualizado pelo desvio à esquerda do histograma de intensidade de marcação com Rho 123 (Figura 43-B) e pela redução da intensidade relativa de fluorescência.

Figura 43 – Efeito dos PLT de *G. americana* sobre $\Delta\Psi\text{m}$ nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.



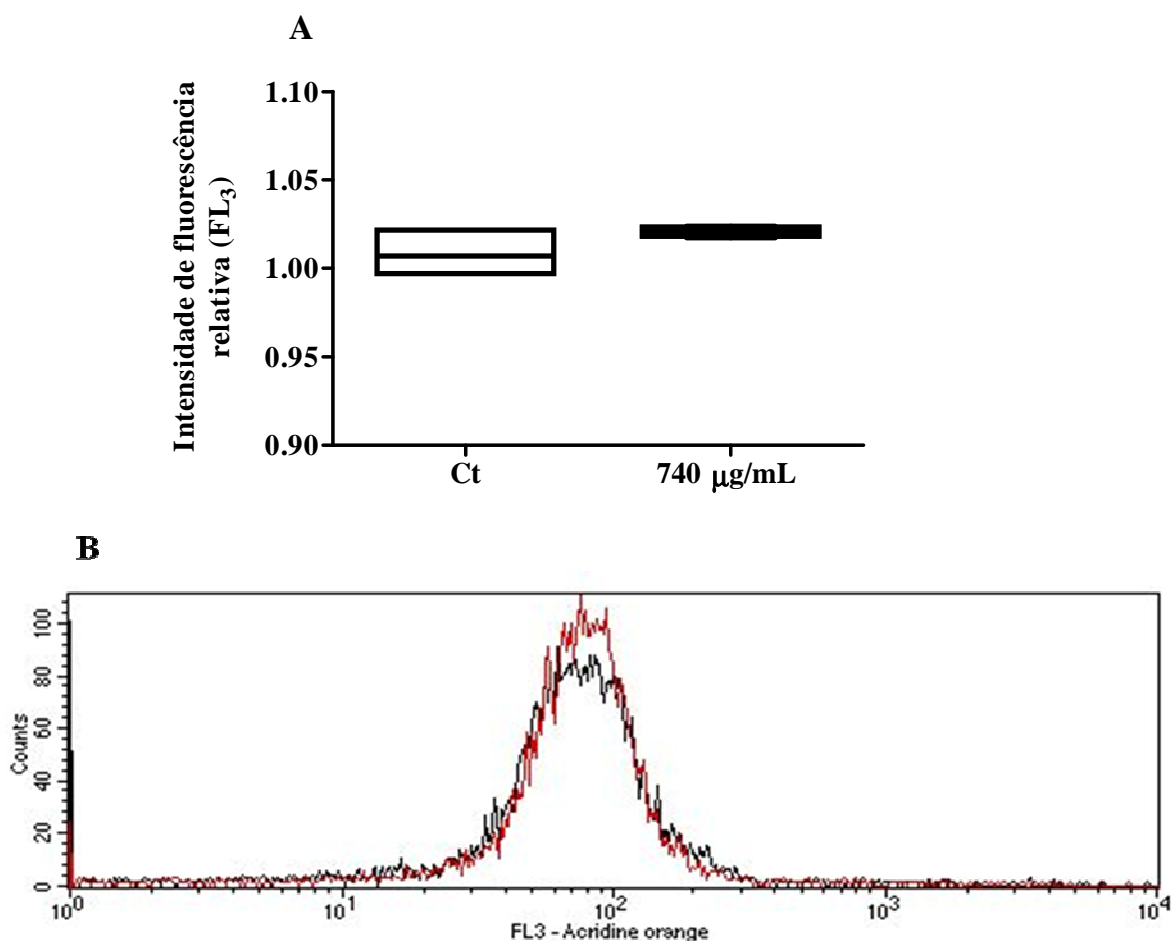
Legenda:

Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial marcado por Rho 123 na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$) (A) Gráfico de intensidade de fluorescência; (B) Histograma. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle). (PLT *G. americana* - curva de cor verde); (Ct = controle negativo - curva de cor cinza). Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 PLT de *G. americana* não induz morte celular por autofagia

A indução de autofagia pelos PLT de *G. americana* foi avaliada utilizando o marcador laranja de acridina, que tem a propriedade de se acumular em regiões acídicas como os reservossomos, emitindo fluorescência vermelha alaranjada. Neste estudo, células tratadas com os PLT (740 $\mu\text{g/mL}$ - CI_{50}) por 24 h não apresentaram alteração significativa de intensidade de marcação (Figura 44 A e B).

Figura 44 – Efeito dos PLT de *G. americana* sobre os reservossomos de *T. cruzi*.



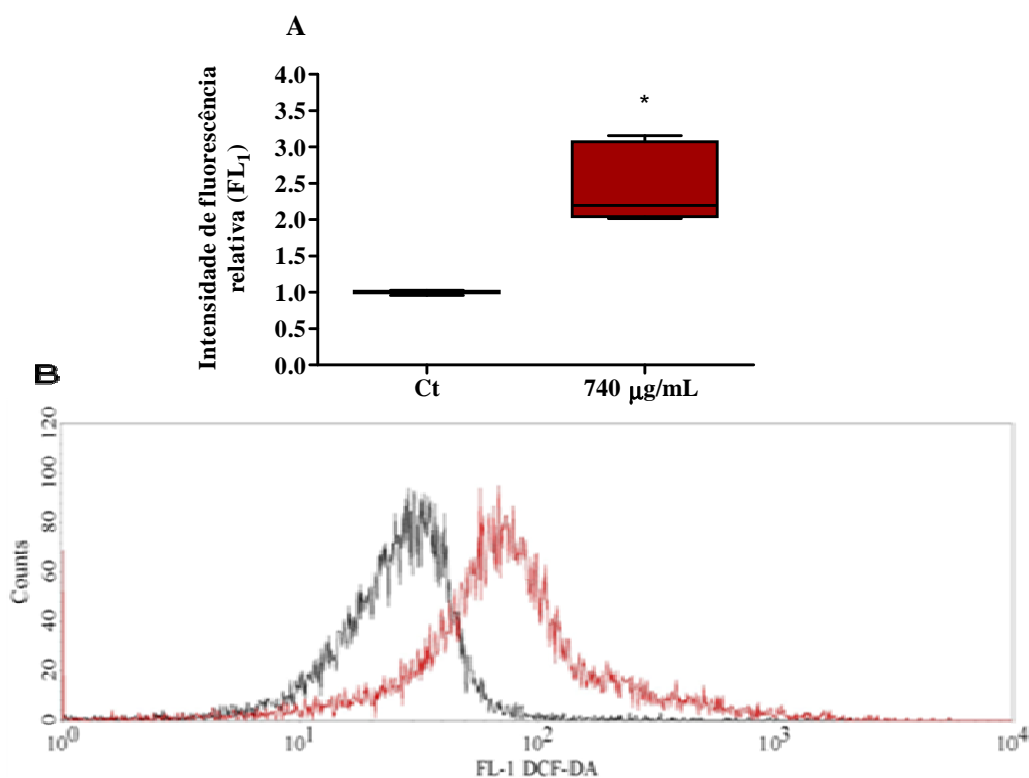
Legenda:

Avaliação do mecanismo de morte celular por autofagia marcado por laranja de acridina na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$). (A) Gráfico de intensidade de fluorescência; (B) Histograma. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle). (Ct = controle negativo – curva preta; PLT de *G. americana* – curva vermelha). Fonte: Elaborada pelo autor.

5.8 PLT de *G. americana* induz a produção de EROs

Formas epimastigotas após 24 h de incubação com os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$ - CI_{50}) marcadas com $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação da intensidade de fluorescência. Os dados apresentados por meio de um histograma demonstram o desvio das populações celulares à direita (Figura 45-B). A figura 45-A mostra um aumento da intensidade de fluorescência, indicando aumento na concentração intracitoplasmática de espécies reativas de oxigênio em relação ao grupo controle.

Figura 45 – Efeito dos PLT de *G. americana* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas em formas epimastigotas.



Legenda:

Avaliação do aumento de espécies reativas de oxigênio marcado por $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com os PLT de *G. americana* (740 $\mu\text{g/mL}$). (A) Gráfico de intensidade de fluorescência; (B) Histograma. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle). (PLT *G. americana* - curva de cor vermelha); (Ct = controle negativo – curva de cor preta). Fonte: Elaborada pelo autor.

5.9 H₂O₂ não influência o efeito antiparasitário dos PLT de *G. americana*

A catalase (CAT) foi utilizada neste estudo com o objetivo de avaliar se as moléculas de H₂O₂ presentes no meio de cultura interferem na atividade dos PLT. O grupo tratado apenas com CAT não apresentou efeito significativo. Além disso, não foi observada diferença entre o grupo tratado com os PLT na presença ou ausência da CAT. Esse dado demonstra que não há participação de H₂O₂ extracelular no efeito dos PLT sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 2 - Avaliação da influência de H₂O₂ sobre o efeito antiparasitário dos PLT de *G. americana*.

	Viabilidade celular (%)
Controle	100 ± 5,2
CAT	90 ± 5,1
PLT	44,4 ± 4,4*
PLT + CAT	34,2 ± 2,9*

Legenda:

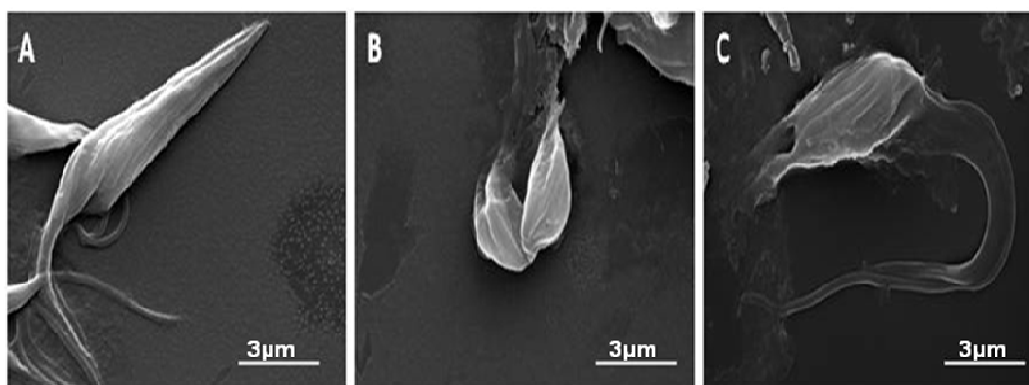
CAT = Catalase (25 µg/mL); PLT = polissacarídeo total de *Genipa americana* (740 µg/mL). Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa do grupo PLT + CAT em relação ao grupo PLT.

Fonte: Elaborada pelo autor

5.10 PLT de *G. americana* promove alterações morfológicas em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Alterações morfológicas nas formas epimastigotas induzidas pelos PLT de *G. americana* após 24 h de tratamento foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações ultraestruturais nos grupos tratados com os PLT, como alterações no formato típico, arredondamento e encurtamento do parasito, aparente fuga do conteúdo citoplasmático e degradação da membrana celular com poros (Figura 46).

Figura 46 – Alterações ultraestruturais induzidas pelos PLT de *G. americana* em formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

(A) grupo controle; (B) epimastigotas tratados com o PLT de *G. americana* (370 µg/mL) e (C) (740 µg/mL). Fonte: Elaborada pelo autor.

Como apresentado, o PLT de *G. americana* apresentou efeito citotóxico sobre as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, cepa Y (resistente ao benzonidazol), sugerindo morte celular por necrose, com envolvimento de alteração do potencial transmembrânico mitocondrial e espécies reativas de oxigênio.

Diante dos resultados obtidos, buscamos também avaliar o efeito dos polissacarídeos isolados (f-PL: FI e FII) da folha de *G. americana* sobre as formas epimastigota, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, bem como a citotoxicidade sobre as células hospedeiras (LLC-MK₂), mecanismo de morte celular e as possíveis alterações morfológicas induzidas pelas f-PL.

PARTE 2:

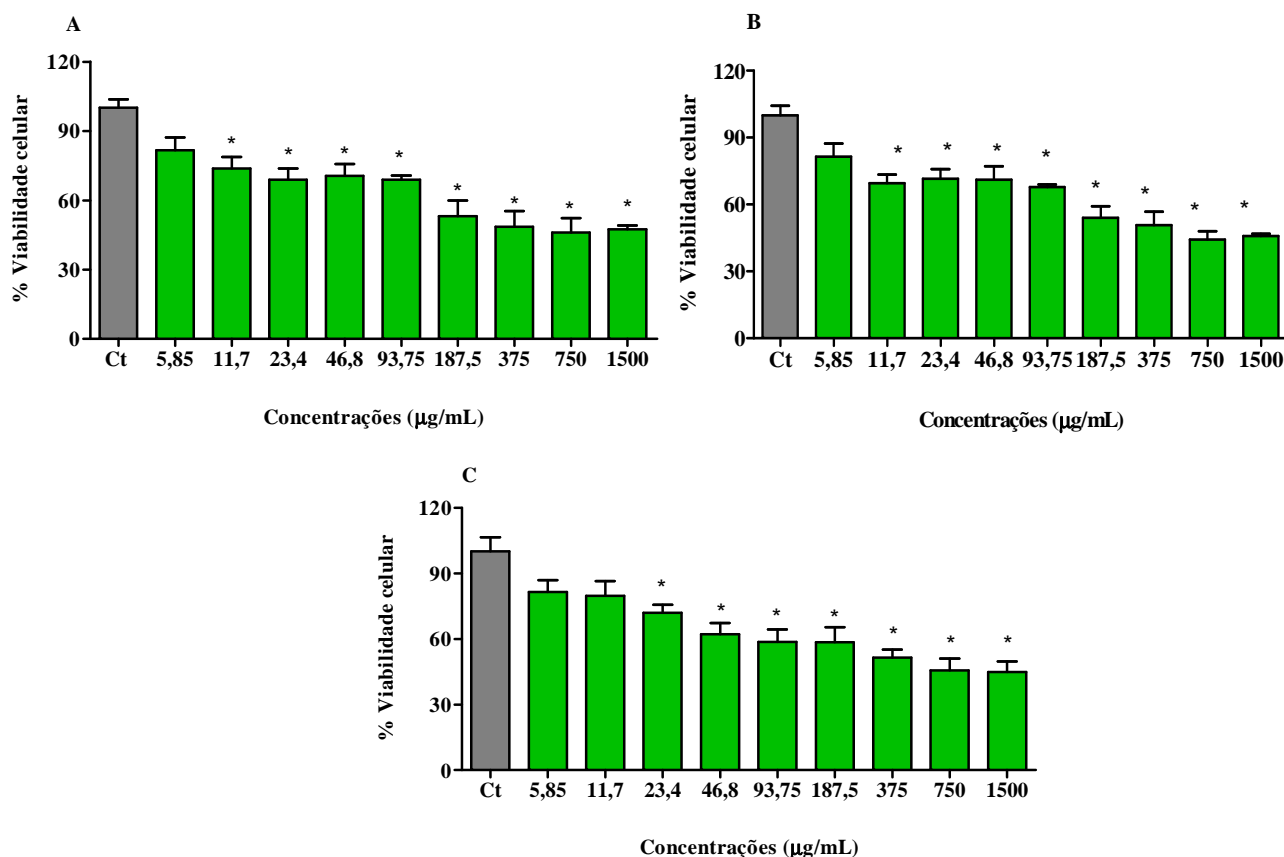
Estudo *in vitro* da atividade tripanocida das frações polissacarídicas isoladas das folhas de *Genipa americana* em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

6 RESULTADOS

6.1 FI e FII reduzem a viabilidade celular de formas epimastigota de *T. cruzi*

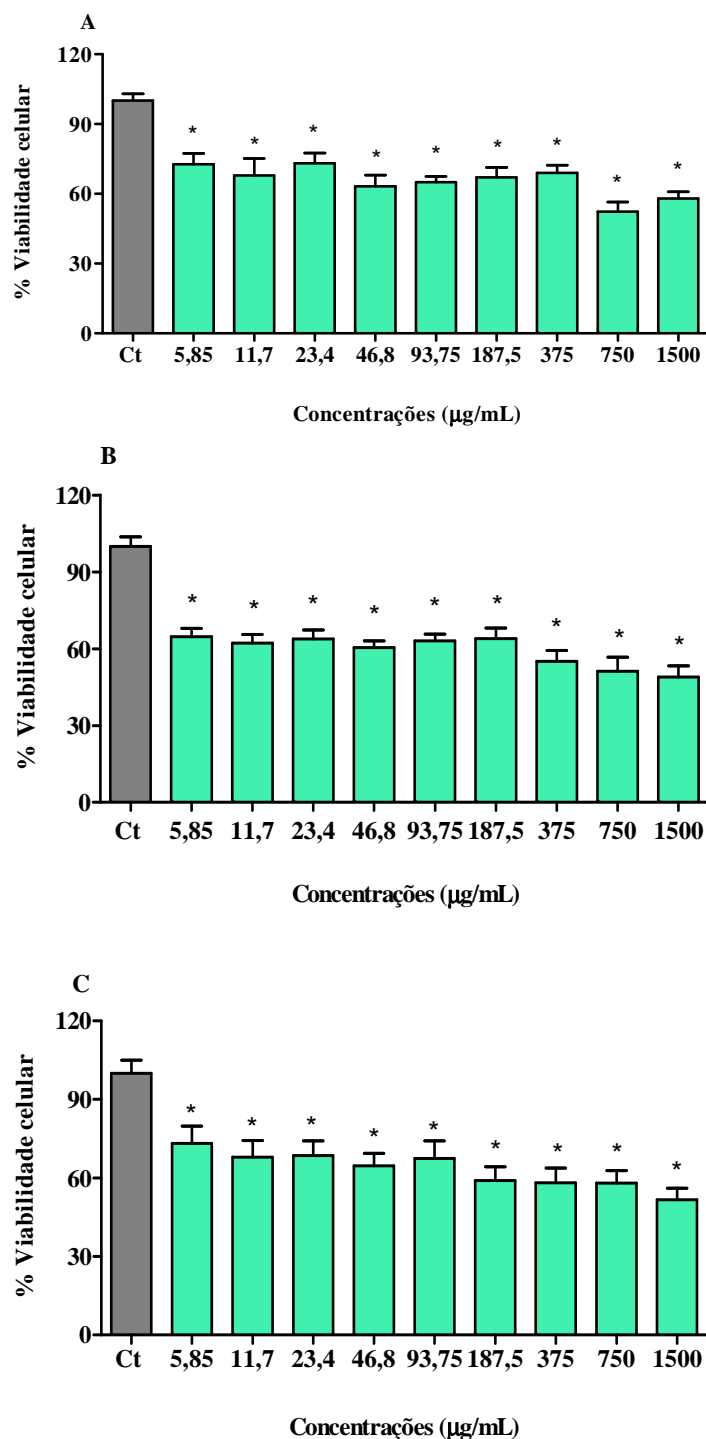
Ensaio sobre as formas epimastigotas tratadas com FI após 24, 48 e 72 h demonstraram efeito tripanocida (Figura 47). As concentrações inibitórias obtidas por regressão não linear para FI foram: $CI_{50/24\text{ h}} = 580 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/48\text{ h}} = 530 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50/72\text{ h}} = 500 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$. Com relação às concentrações inibitórias para FII, as mesmas não foram obtidas, pois não foi possível observar uma curva concentração-efeito, impossibilitando desta forma o cálculo da CI_{50} (Figura 48).

Figura 47 – Efeito da fração FI de *G. americana* sobre formas epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda:

FI reduziu a viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 – Efeito da fração FII de *G. americana* sobre formas epimastigota de *T. cruzi*.

Legenda:

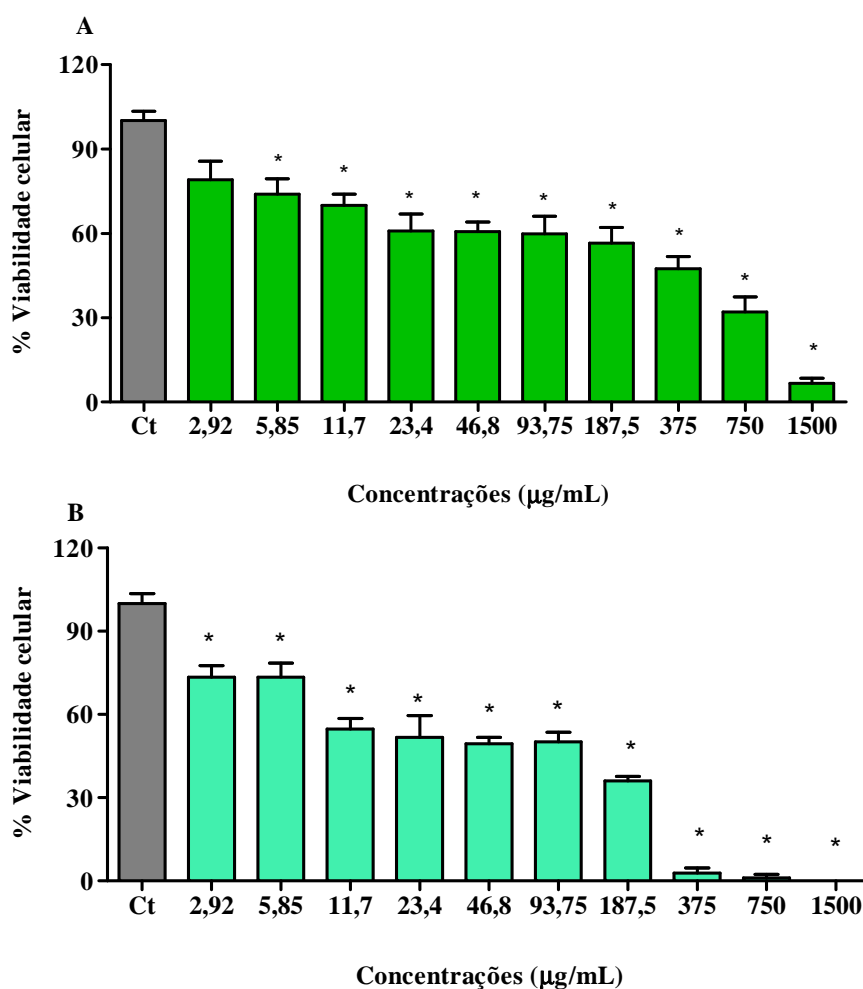
FII não reduziu a viabilidade celular em 50% das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 FI e FII reduzem a viabilidade celular de formas tripomastigota de *T. cruzi*

Ensaio sobre as formas tripomastigotas após incubação com FI e FII em diversas concentrações, demonstraram que as f-PL foram capazes de causar morte em todas as concentrações testadas (Figura 49). Os grupos tratados com FII na concentração de 1500 µg/mL apresentaram 100% de morte em todos os experimentos, conforme observado na figura 48-B. Após análise de regressão não-linear foram obtidos as seguintes LC_{50} : FI ($LC_{50} = 100 \pm 0,09$ µg/mL) e FII ($LC_{50} = 23 \pm 0,06$ µg/mL).

Figura 49 – Efeito das f-PL de *G. americana* sobre formas tripomastigota de *T. cruzi*.



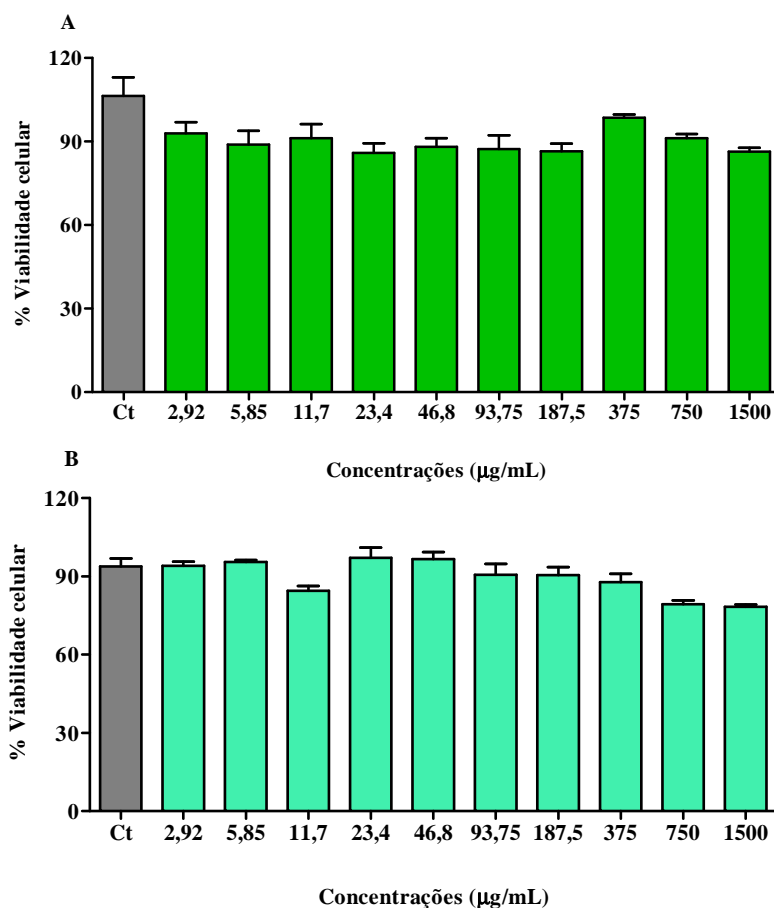
Legenda:

FI (A) e FII (B) reduziram a viabilidade celular das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3 FI e FII não reduzem a viabilidade de células LLC-MK₂

As células LLC-MK₂ foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade, foi observado que FI e FII não reduziram a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (Figura 50). Desta forma, os dados demonstram que mesmo em altas concentrações, FI e FII não causam toxicidade as células hospedeiras. A concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade (CC₅₀) não foi obtida para nenhuma das frações, pois não foi possível observar uma curva concentração-efeito. No entanto, devido as f-PL não terem apresentado citotoxicidade sobre as células hospedeiras, estimamos o SeI. Para FI o SeI mostra ser superior a 15 e o de FII superior a 65.

Figura 50 – Efeito das frações de *G. americana* sobre a viabilidade de células LLC-MK₂.



Legenda: FI (A) e FII (B) não reduziram a viabilidade das células LLC-MK₂ após 24 horas de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle). Ct = grupo controle. Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4 FI e FII reduzem o número de amastigotas

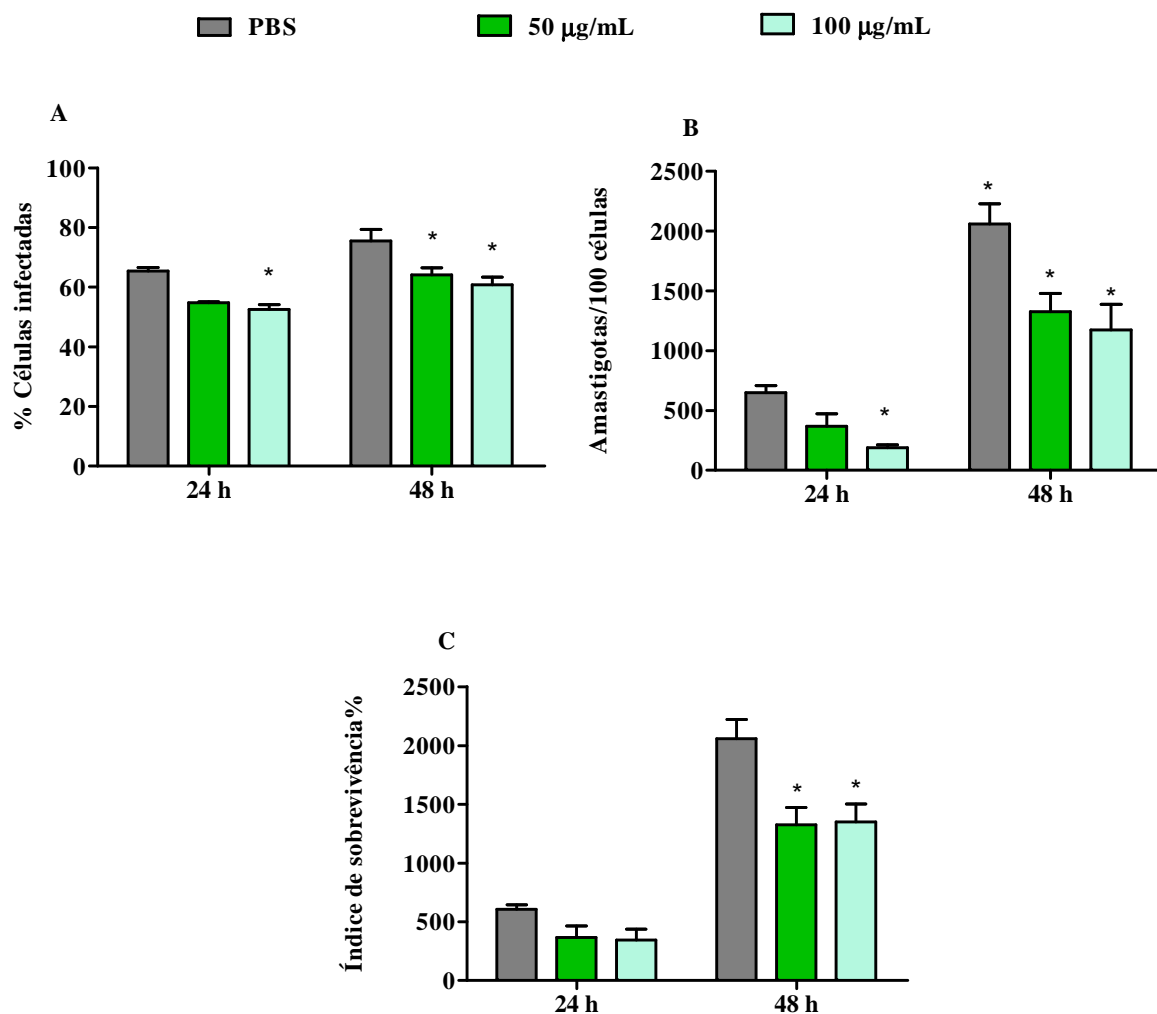
Após 24 e 48 h de incubação com as frações de *G. americana* nas concentrações de 50 µg/mL (CI_{50/2}) e 100 µg/mL (CI₅₀) para FI; e 11,5 µg/mL (CI_{50/2}) e 23 µg/mL (CI₅₀) para FII; as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para a contagem do número de células infectadas e a contagem de amastigotas.

Os resultados demonstraram que células tratadas com 50 e 100 µg/mL da FI, reduziram o percentual de células infectadas em 19,7% em 24 h apenas na concentração de 100 µg/mL, e 15% e 19% em 48 h, respectivamente (Figura 51-A). Além disso, FI de *G. americana* também reduziu o número de amastigotas/100 células em 70% (100 µg/mL) em 24 h, e 35% (50 µg/mL) e 43% (100 µg/mL) em 48 h (Figura 51-B). O efeito anti-amastigota também foi comprovado pela redução do índice de sobrevivência das formas amastigotas apenas em 48 h (Figura 51-C).

Células tratadas com 11,5 e 23 µg/mL da FII, reduziram o percentual de células infectadas em 34% e 22% em 24 h, e 14% e 13% em 48 h, respectivamente (Figura 52-A). FII também reduziu o número de amastigotas/100 células em 48% e 34% em 24 h, e 36% e 56% em 48 h, respectivamente (Figura 52-B). Além disso, FII reduziu o índice de sobrevivência das formas amastigotas em 24 e 48 h (Figura 52-C).

Análises de microscopia óptica confirmaram que as f-PL de *G. americana* reduziram significativamente a infecção celular em ambas as concentrações e períodos observados (Figura 53-54).

Figura 51 – Efeito da fração FI de *G. americana* em formas amastigotas de *T. cruzi*.

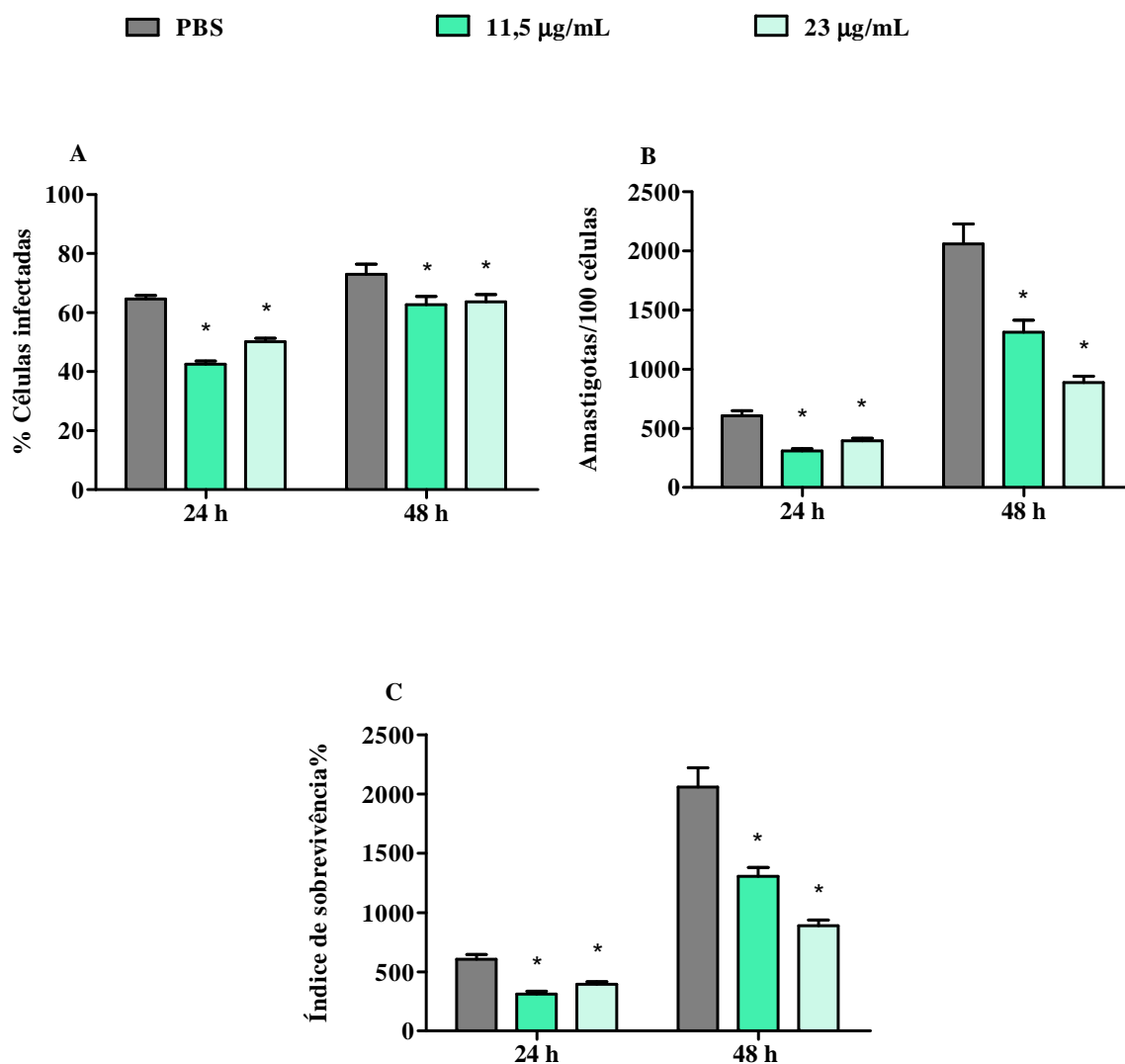


Legenda:

FI de *G. americana* reduziu o percentual de células infectadas (A); o número de amastigotas por células (B) e o percentual do índice de sobrevivência (C). Os dados foram expressos como percentual \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle). (PBS = controle negativo).

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 52 – Efeito da fração FII de *G. americana* em formas amastigotas de *T. cruzi*.

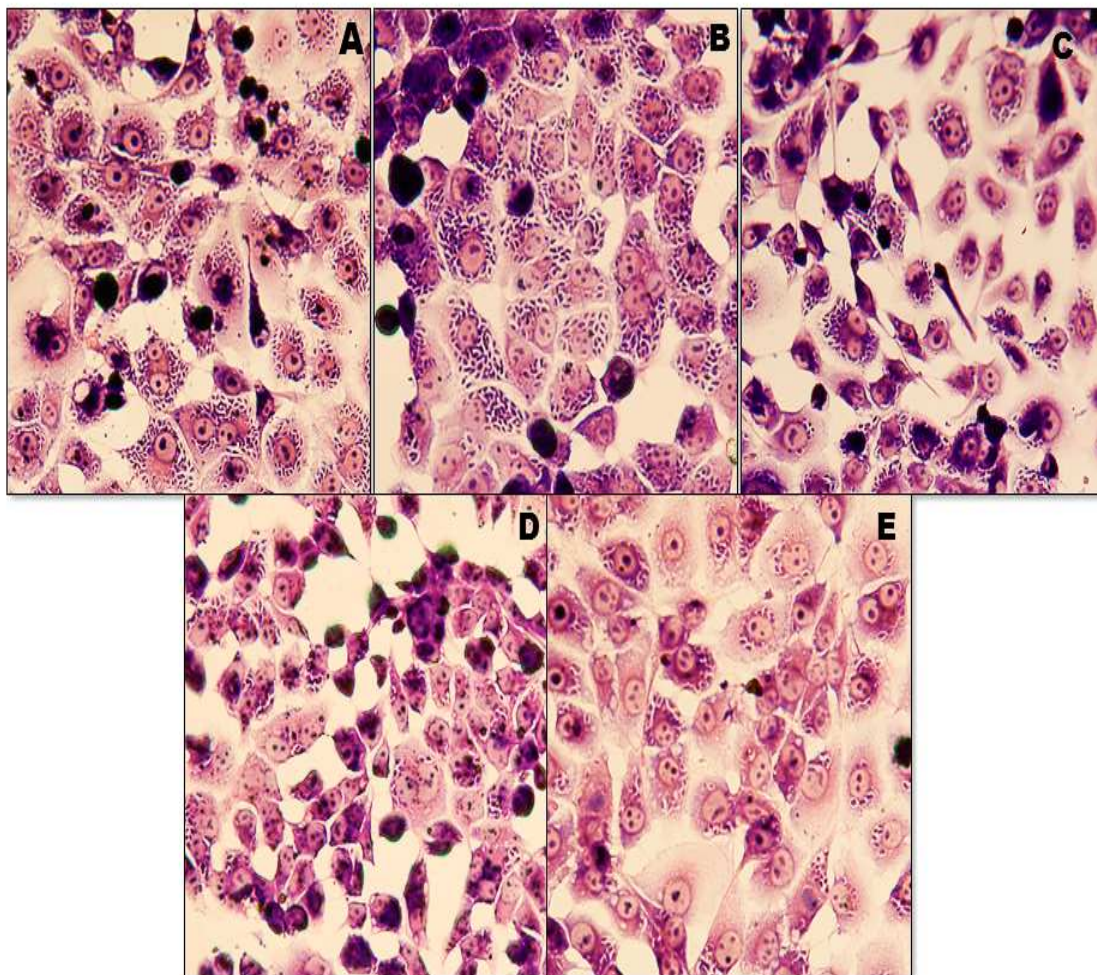


Legenda:

FII de *G. americana* reduziu o percentual de células infectadas (A); o número de amastigotas por células (B) e o percentual do índice de sobrevivência (C). Os dados foram expressos como percentual \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle). (PBS = controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 53 – Fotomicrografia de células LLC-MK₂ infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento com as f-PL de *G. americana*.

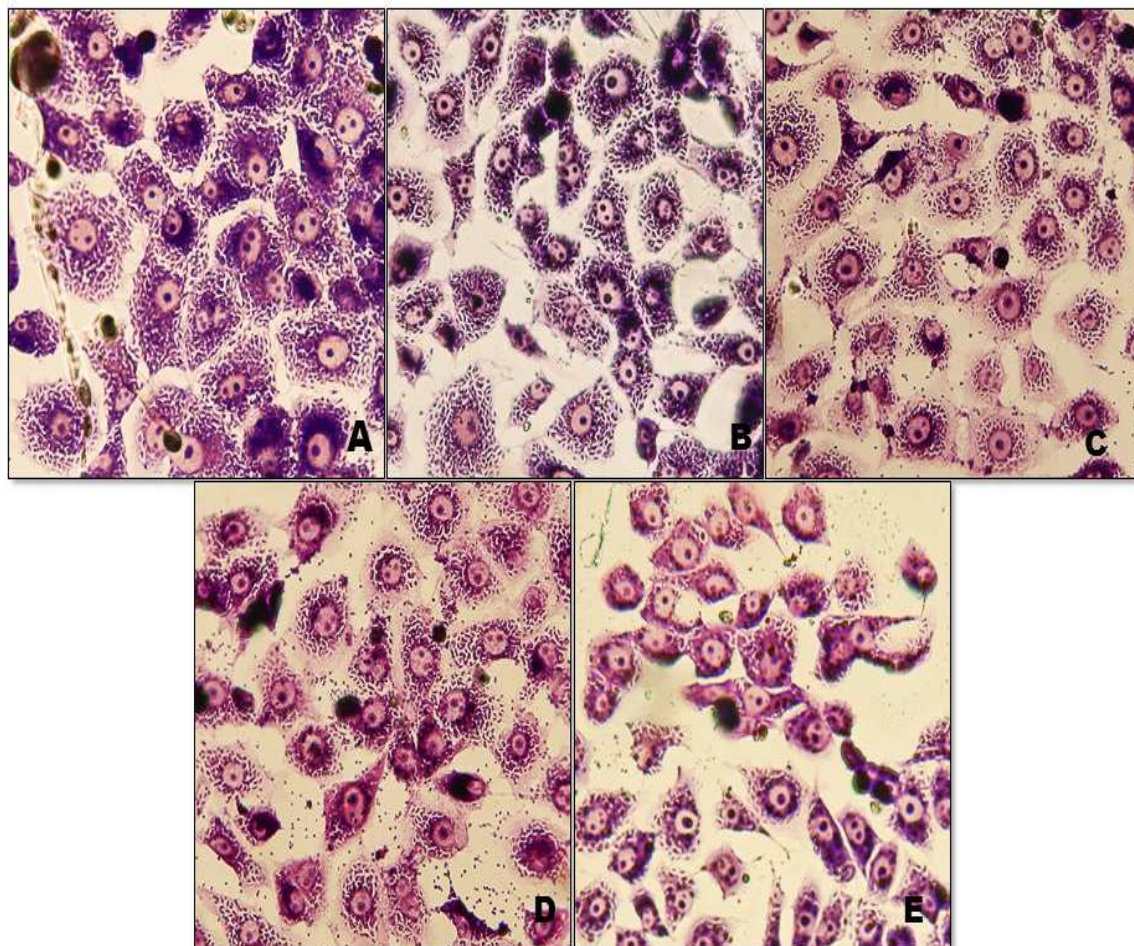


Legenda:

Microscopia óptica das células LLC-MK₂ infectadas por *T. cruzi* após 24 h de tratamento com FI e FII de *G. americana*. A – grupo controle; B – Células tratadas com FI (CI_{50/2}); C – Células tratadas com FI (CI₅₀); D - Células tratadas com FII (CI_{50/2}); E - Células tratadas com FII (CI₅₀). Aumento de 400 ×, usando Microscópio óptico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 54 – Fotomicrografia de células LLC-MK₂ infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi* após 48 h de tratamento com as f-PL de *G. americana*.



Legenda:

Microscopia óptica das células LLC-MK₂ infectadas por *T. cruzi* após 48 h de tratamento com FI e FII de *G. americana*. A – grupo controle; B – Células tratadas com FI (CI_{50/2}); C – Células tratadas com FI (CI₅₀); D - Células tratadas com FII (CI_{50/2}); E - Células tratadas com FII (CI₅₀). Aumento de 400 ×, usando Microscópio óptico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.5 Fração de *G. americana* induz morte celular por necrose

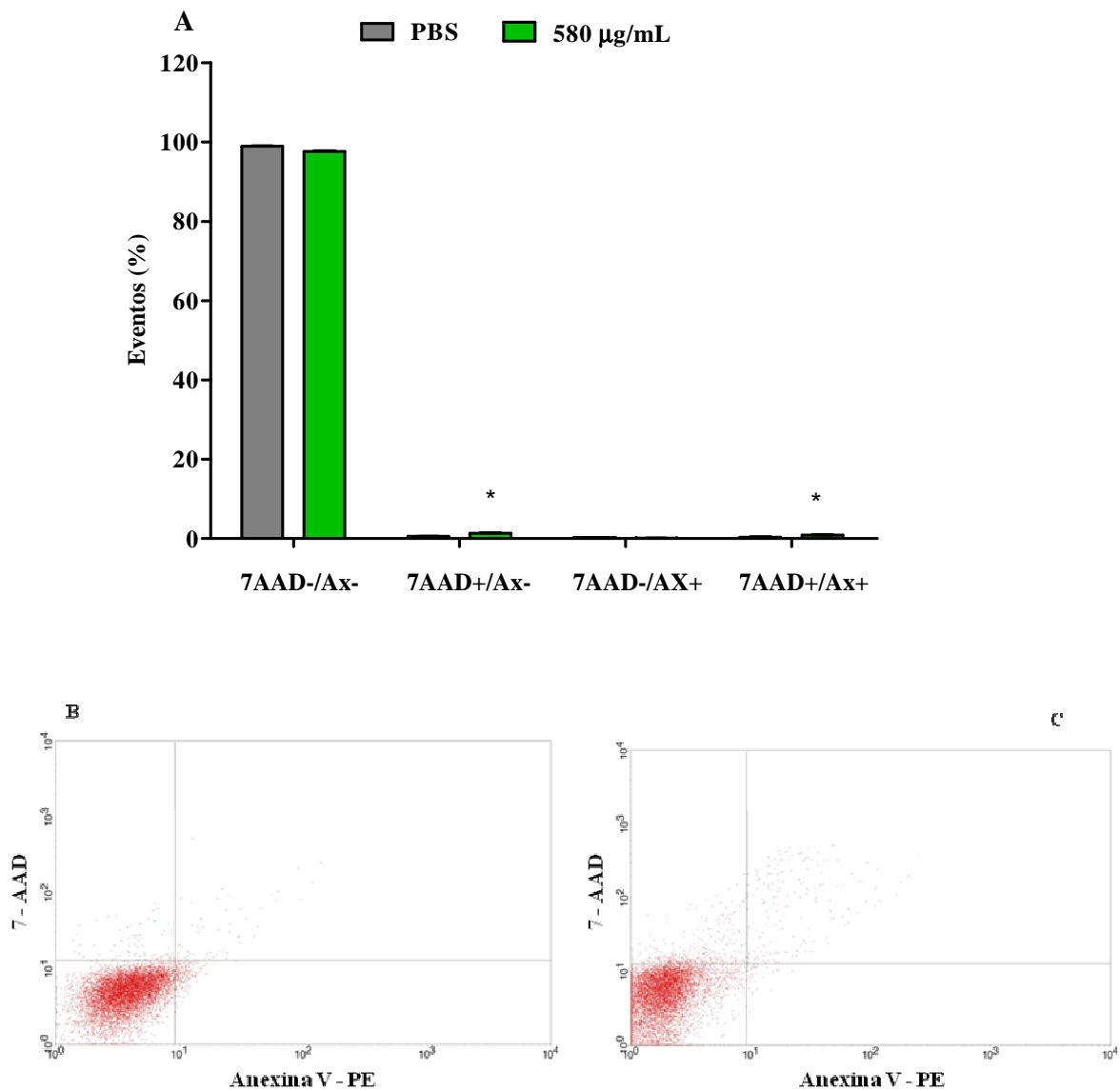
Ensaios de citometria de fluxo para investigar as possíveis alterações celulares indicativas de necrose, apoptose e/ou produção de EROs foram realizados apenas com FI, visto que somente a mesma apresentou CI_{50} para as formas epimastigotas.

As células após 24 h de tratamento com FI (CI_{50} - 580 $\mu\text{g/mL}$) foram marcadas com 7-AAD/Anexina V-PE e analisadas por citometria de fluxo. A análise revelou a redução do percentual de células viáveis e aumento predominante do percentual de células marcadas com 7-AAD, marcador de necrose (Figura 55-A). Esse aumento também pode ser observado pelo deslocamento das populações celulares, apresentado no gráfico *density plot* de dispersão das células (Figura 55-C).

6.6 Fração de *G. americana* induz a produção de EROs

Formas epimastigotas após 24 h de incubação com a fração FI (CI_{50} - 580 $\mu\text{g/mL}$) marcadas com $\text{H}_2\text{DCFH-DA}$ foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação da intensidade de fluorescência. Os resultados demonstram por meio de um histograma o desvio das populações celulares à direita (Figura 56-B) e um aumento da intensidade de fluorescência, indicando aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio em relação ao grupo controle (Figura 56-A).

Figura 55 - Perfil de morte celular induzido pela FI de *G. americana* avaliado por citometria de fluxo.

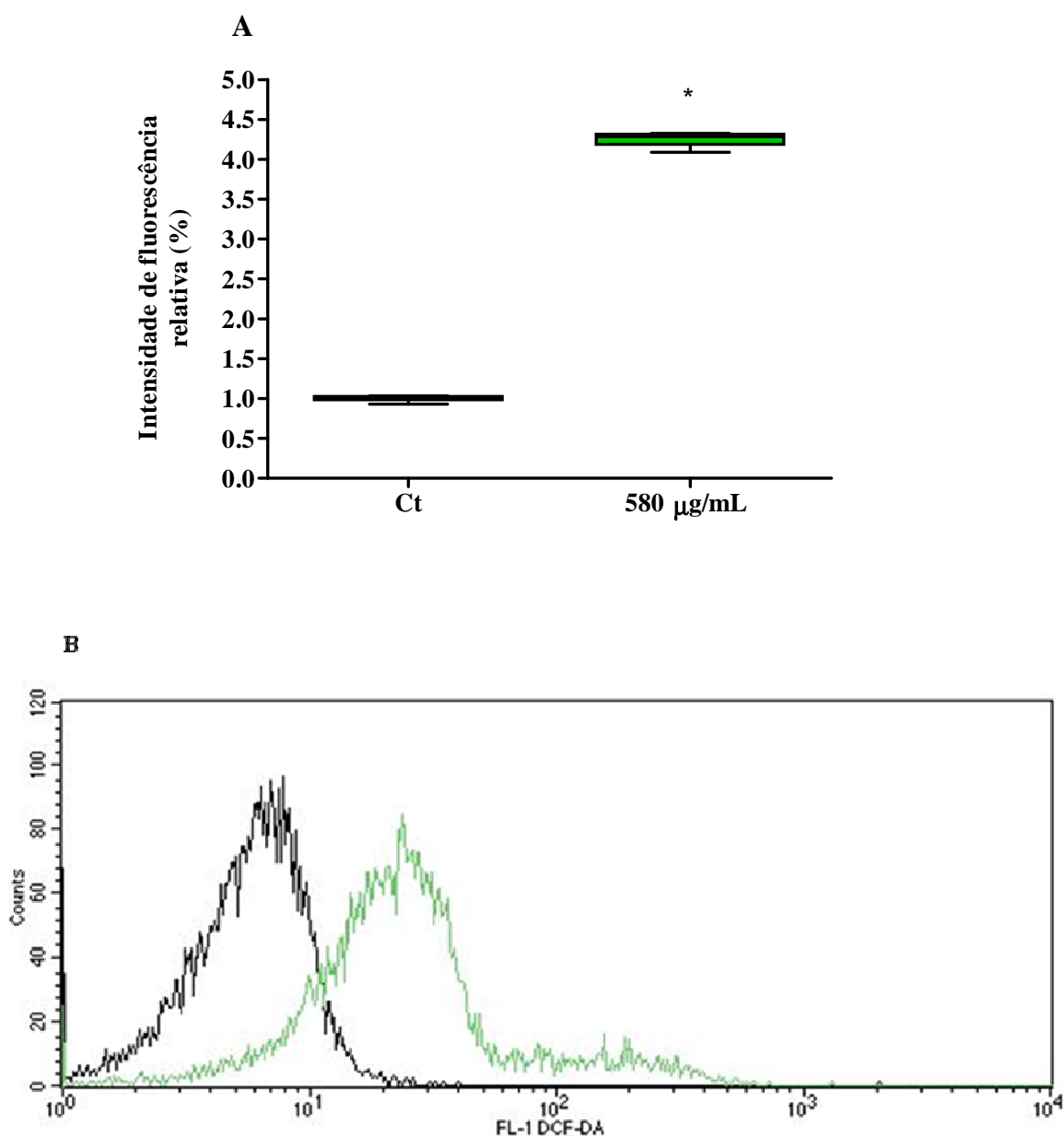


Legenda:

(A) Avaliação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com FI de *G. americana* (740 µg/mL). 7-AAD-/Ax- = células viáveis; 7-AAD+/Ax- = células necróticas; 7-AAD-/Ax+ = células apoptóticas; 7-AAD+/Ax+ = apoptose tardia. (B) Histograma de dispersão de células por intensidade de marcação por anexina V-PE e 7-AAD. (B - PBS); (C - grupo tratado). Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelos testes One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 56 – Efeito da FI de *G. americana* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.



Legenda:

Aumento de espécies reativas de oxigênio marcado por H₂DCFH-DA na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento. FI (580 µg/mL) (Ct = controle negativo). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência ± E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.7 H₂O₂ não influência o efeito antiparasitário de FI de *G. americana*

A avaliação da interferência do H₂O₂ na atividade antiparasitária de FI demonstrou que o grupo tratado com a fração na presença ou ausência da catalase não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 3). Além disso, não houve diferença significativa do grupo FI + CAT em relação ao grupo FI. Esse dado demonstra que não há participação de H₂O₂ extracelular no efeito da fração sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Tabela 3 - Avaliação da influência de H₂O₂ sobre o efeito antiparasitário da FI de *G. americana*.

	Viabilidade celular (%)
Controle	107 ± 3,4
CAT	104 ± 8,0
FI	66,09 ± 3,4*
FI+ CAT	59,13 ± 3,4*

Legenda:

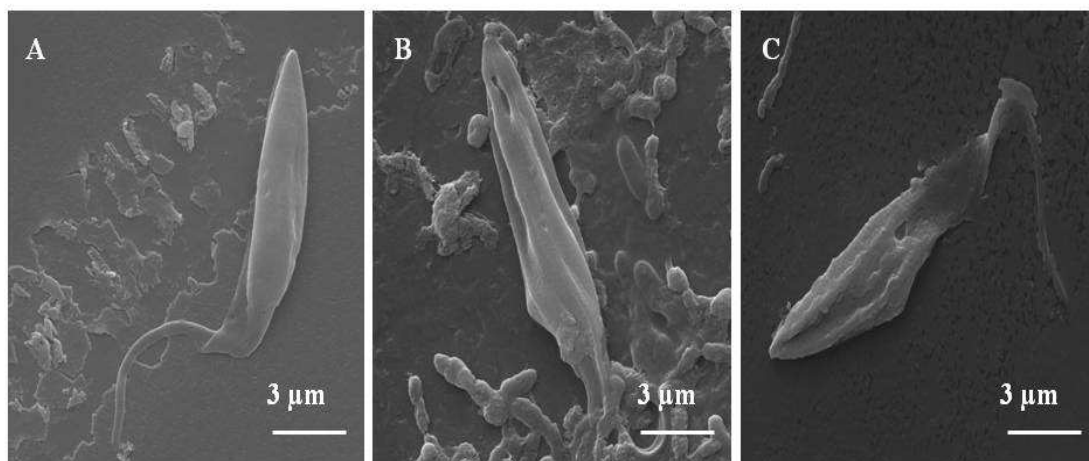
CAT = Catalase (25 µg/mL); FI = fração 0,1 M de *G. americana* (580 µg/mL). Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.8 Fração (FI) de *G. americana* promove alterações morfológicas em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Após 24 h de tratamento com FI, as formas epimastigotas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações ultraestruturais nos grupos tratados com FI, como alterações no formato típico e degradação da membrana celular com poros (Figura 57 B e C).

Figura 57 – Alterações ultraestruturais induzidas por FI de *G. americana* em formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Legenda:

(A) controle negativo; (B) epimastigotas tratados com FI de *G. americana* ($CI_{50/2}$ - 290 $\mu\text{g/mL}$); (C) (CI_{50} - 580 $\mu\text{g/mL}$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito tripanocida *in vitro* de cinco extratos polissacarídicos obtidos de plantas do Semiárido-Nordestino.

Após mais de um século da descoberta da DC ainda não existe uma alternativa terapêutica totalmente eficiente para este problema. Os tratamentos atualmente disponíveis só conferem cura apenas na fase aguda da doença. No Brasil, o fármaco utilizado é o BZ (LAFEPE, Brasil) recomendado para todos os casos agudos e crônicos da doença (DA SILVA et al., 2011). Sua eficácia limitada, aliado a muitos efeitos adversos levam à interrupção do tratamento (BAHIA et al., 2012; URBINA, 2009). Levando-se em consideração o número de pessoas infectadas, o número de pessoas com risco de contaminação e a terapêutica atual limitada, é imprescindível a busca por novos compostos e/ou estratégias terapêuticas para um melhor tratamento da DC.

Os vegetais são fontes de compostos que podem ser potencialmente ativos contra protozoários (CROFT et al., 2005; SALEM; WERBOVETZ, 2006). Mesquita et al. (2005) demonstraram atividade antileishmanicida e antitripanosomal de extratos etanólicos das folhas de plantas medicinais do Cerrado brasileiro. Estudos prévios demonstraram que extratos metanólicos de plantas utilizadas na medicina popular do México exibiram elevada atividade tripanocida (MOLINA-GARZA et al., 2014).

Os polissacarídeos possuem comprovada atividade biológica, podendo ser obtidos de diferentes fontes como bactérias, fungos e plantas (KWOK et al., 2001; KITAJMA, 2000; SAIMA et al., 2000). Polissacarídeos isolados de plantas superiores são largamente explorados quanto ao seu efeito imunoestimulante (STIMPEL et al., 1984; YAMADA et al., 1985). Além desta propriedade, há estudos demonstrando atividades antiviral (TALARICO et al., 2004), antibacteriana (XIE et al., 2002), antiparasitária (NATHAN, 1985), leishmanicida (NOLETO et al., 2002; BARROSO et al., 2007), entre outras.

No presente estudo, inicialmente realizamos uma triagem de cinco extratos polissacarídicos de vegetais do Semiárido Nordeste sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e seus possíveis efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos (LLC-MK₂). A escolha das espécies vegetais foi baseada no uso popular e na literatura relatando seus efeitos antimicrobiano e antiparasitário. Das cinco espécies avaliadas, todas foram capazes de reduzir a viabilidade celular das formas epimastigotas

e tripomastigotas em todos os tempos testados, no entanto, os polissacarídeos das folhas de *G. americana* foram selecionados por apresentarem resultados promissores frente aos ensaios tripanocidas, além de citotoxicidade relativamente baixa.

Adicionalmente, estudos experimentais realizados com os extratos das folhas demonstraram atividade antimalárica *in vitro* frente à *Plasmodium falciparum* e *in vivo* em relação à *Plasmodium berghei* (DEHARO et al., 2001), além de outros efeitos antiparasitário e antimicrobiano (OLIVEIRA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014; TALLENT, 1964).

Nesse sentido, a determinação dos principais compostos nos PLT e frações polissacarídicas podem ajudar a responder algumas perguntas sobre a atividade biológica da espécie. A presença de polissacarídeos e/ou iridoídes e sua correlação com a atividade tripanocida, o tipo de família a qual *G. americana* pertence, somados aos dados da literatura quanto ao uso popular das folhas; todas estas evidências podem estar relacionadas à atividade antiparasitária obtida neste estudo.

Para a avaliação inicial dos extratos polissacarídicos, foram realizados ensaios *in vitro* sobre as formas epimastigotas. Nossos dados evidenciaram que todos os extratos foram capazes de inibir a proliferação de formas epimastigotas nos três tempos de tratamento, no entanto, os polissacarídeos da folha de *G. americana* foram mais efetivos, pois reduziram a viabilidade celular em concentrações inferiores a 1000 µg/mL.

Outros extratos vegetais também demonstraram atividade tripanocida frente às formas epimastigotas. O extrato aquoso das folhas de *Neurolaena lobata* demonstrou efeito em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 48 h de incubação na concentração de 550 µg/mL (BERGER et al., 1998). Quarenta e três extratos brutos metanólicos demonstraram atividade tripanocida em relação às formas epimastigotas, destes, dezoito foram capazes de reduzir a viabilidade apenas na concentração de 2000 µg/mL após 2 h de incubação, enquanto que treze mostraram atividade tripanocida até a concentração de 1000 µg/mL após 48 h de incubação (ABE et al., 2002). O extrato etanólico das folhas de *Guazuma ulmifolia* inibiu em 63,86% o crescimento de formas epimastigotas na concentração de 1000 µg/mL após 72 h de incubação (CALIXTO JÚNIOR et al., 2016).

Após o fracionamento dos PLT de *G. americana* por cromatografia de troca iônica, a f-PL (FI) aumentou a atividade sobre as formas epimastigotas em relação ao extrato bruto. FI reduziu a viabilidade nos três tempos testados em concentrações inferiores ao extrato. Após 72 h de tratamento, FI na concentração de 500 µg/mL foi

capaz de reduzir em até 50 % a viabilidade celular. Com relação a FII, não foi possível observar uma curva concentração-efeito, impossibilitando desta forma a obtenção da CI_{50} .

Diferentemente outros extratos de plantas quando fracionados não apresentaram efeito sobre formas epimastigotas, como no caso das oito frações obtidas do extrato etanólico das folhas de *Byrsonima crassifolia* e oito frações das cascas de *Gliricidia sepium* (BERGER, et al., 1998). O fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Lygodium venustum* resultou em três frações (diclorometano, acetato de etila e metanol). A fração diclorometano na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ não demonstrou atividade antiparasitária em epimastigotas de *T. cruzi* e em promastigotas de *Leishmania braziliensis*. Do mesmo modo a fração acetato de etila nas concentrações de 500 e 100 $\mu\text{g/mL}$ também não foram capazes de inibir as formas promastigotas (MORAIS-BRAGA et al., 2013).

Neste estudo, demonstramos que os polissacarídeos das folhas de *G. americana* inibiram significativamente o crescimento de epimastigotas (24, 48 e 72 h) em concentrações inferiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato, enquanto que a fração polissacarídica (FI) melhorou a atividade tripanocida sobre as formas epimastigotas causando inibição em uma concentração menor que a do extrato.

Alguns trabalhos vêm estabelecendo uma correlação entre a presença de iridoides e atividade biológica, tais como antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária (SALEM; WERBOVETZ, 2006; TALLENT, 1964). Amarogentina é um secoiridoide glicósido isolado da planta medicinal indiana *Swertia chirata* (Gentianaceae), seu efeito antileishmanicida foi observado *in vivo* em um modelo de Leishmaniose visceral, sendo capaz de reduzir a carga parasitária em até 90%, não exibindo toxicidade para os animais (MEDDA; MUKHOPADHYAY; BASU, 1999). Outro iridoide glicósido, brunneogaleatoside, isolado de *Phlomis brunneogaleata* (Lamiaceae), apresentou atividade contra amastigotas axênicos de *Leishmania donovani* (CI_{50} 4,7 $\mu\text{g/mL}$) enquanto que não apresentou toxicidade para as células na concentração de até 90 $\mu\text{g/mL}$ (KIRMIZIBEKMEZ et al., 2004).

Iridoides não são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo identificados em algumas famílias como por exemplo, Rubiaceae, Apocynaceae, Loganiaceae, Lamiaceae, Scrophulariaceae e Verbenaceae (ALVES et al., 2017). Recentemente uma revisão sistemática sobre a aplicabilidade de produtos oriundos de

plantas no tratamento de *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei*, identificou 44 famílias de plantas, destas, sete pertenciam à família Rubiaceae (PEREIRA et al., 2017).

Estudos fitoquímicos dos extratos das folhas de *G. americana* (família Rubiaceae) revelaram a presença de iridoides, mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteróides, taninos hidrolisáveis, proantocianidinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicósidos, ácido geniposídico, genipatriol e flavonóides (GUARNACCIA et al., 1972; HOSSAIN et al., 2003; ALVES et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017).

A análise quantitativa da composição monossacarídica das frações FI e FII, realizada por cromatografia gasosa, demonstrou que estas são constituídas predominantemente por arabinose, galactose, glicose, fucose, xilose, ramnose e manose (MADEIRA, 2012). De acordo com Turnock e Ferguson (2007), a superfície celular dos parasitos tripanosomatídeos apresentam glicoconjugados que estão envolvidos no reconhecimento, virulência e infecção de parasitos em seus vetores e hospedeiros de mamíferos.

Todos os PLT avaliados apresentaram efeito sobre as formas tripomastigotas após 24 h de tratamento, no entanto os PLT de *G. americana* apresentaram uma menor LC_{50} que foi de 480 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, todas as concentrações dos PLT de *G. americana* demonstraram efeito de maneira dose-dependente. Já as frações FI e FII reduziram a viabilidade celular sobre as formas tripomastigotas de forma mais potente que o extrato. FI apresentou uma LC_{50} 4,8 vezes menor, enquanto que FII demonstrou uma elevada atividade contra os tripomastigotas com uma LC_{50} 20 vezes menor que a do extrato.

Efeito semelhante foi demonstrado para os extratos brutos de *Ampelozizyphus amazonicus* que causou a lise sobre formas tripomastigotas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (ROSAS et al., 2006). Contrariamente, os extratos das folhas e ramos de *Baccharis dracunculifolia* inibiram 100% formas tripomastigotas na concentração de 3000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o extrato da raiz foi pouco ativo, demonstrando uma inibição de apenas 37,3% (DA SILVA FILHO et al., 2004). Ambrozin et al. (2004) avaliou vinte e dois extratos de plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae. Destes, somente os extratos das folhas de *Conchocarpus heterophyllus* e dos ramos de *Trichilia ramalhoi* foram mais ativos, inibindo em 99% e 84% as formas tripomastigotas, respectivamente, porém foi necessário utilizar uma concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$. Assim, nossos dados demonstraram que os PLT de *G. americana* foram

muito mais ativos contra as formas tripomastigotas quando comparados a esses extratos.

Similarmente, três frações obtidas por cromatografia em Sephadex do extrato etanólico das folhas da espécie *B. crassifolia* inibiu o crescimento do parasito com uma CI_{90} de 98,7, 89,3 e 94,3 $\mu\text{g/mL}$. Das doze frações obtidas do extrato etanólico de *Neurolaena lobata*, somente a fração 2 (fração butanol) demonstrou uma inibição de 90% na concentração de 25,6 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que as demais só foram capazes de inibir na concentração acima de 200 $\mu\text{g/mL}$ (BERGER, et al., 1998). Mafezoli et al. (2000) avaliou a atividade de nove espécies de plantas da família Rutaceae contra a forma tripomastigota de *T. cruzi*. Trinta e dois extratos brutos foram testados, desses, somente oito mostraram significativa atividade. O mais ativo foi obtido do caule de *Pilocarpus spicatus* que lisou o parasito em 97,3% (CI_{50} – 650 $\mu\text{g/mL}$). Neste mesmo estudo também avaliaram as frações, das vinte e cinco isoladas, apenas duas mostraram ser mais ativas, as das folhas de *Almeidea coerulea* (fração butanol) e *Conchocarpus inopinatus* (fração diclorometano) que causaram inibição de 100% do parasito, com uma CI_{50} de 940 e 1290 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quarenta e três frações de plantas das famílias Meliaceae e Rutaceae foram avaliadas. As frações de *C. heterophyllus* e de *Galipea carinata* foram mais ativas, lisando em 100% o parasito na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ (IMUZI et al., 2011).

A literatura é escassa em demonstrar os efeitos de polissacarídeos sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*. Previamente foi demonstrado o efeito de polissacarídeos contra *Leishmania* sp. Vale destacar que existem diferenças entre os protozoários parasitários, como *Trypanosoma* sp., *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp., e *Trichomonas vaginalis* que são bem conhecidas, porém os parasitos que causam leishmaniose e tripanossomíase estão relacionados e compartilham certas características bioquímicas e celulares (DAVIS; KEDZIERSKI, 2005). Sendo assim, provavelmente esta similaridade pode estar relacionada a alvos semelhantes, podendo os parasitos serem suscetíveis as mesmas substâncias.

Polissacarídeos podem atuar como imunomoduladores não apenas em suas formas nativas, mas também complexados com metais. Estudos da complexação de polissacarídeos com metais, em especial o vanádio colocaram estas moléculas como promissoras no desenvolvimento de fármacos com atividade leishmanicida (NOLETO, 2002). A xiloglucana obtida de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá - XGJ) e seu complexo (XGJ:VO) exibiram atividade leishmanicida. XGJ (25 $\mu\text{g/mL}$) reduziu o crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis* em 59%, enquanto que sua forma

complexada, XGJ:VO nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL reduziu o crescimento em 63% e 58% , respectivamente, em relação ao controle após 48 h de tratamento. Efeito semelhante também foi observado após 48 h de tratamento em duas preparações de galactomananas (GALMAN-A e GALMAN-B) de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga). A GALMAN-A (100 µg/mL) reduziu o crescimento do protozoário em 60%. O complexo GALMAN-A:VO na concentração de 25 µg/mL reduziu o crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis* em aproximadamente 68%. GALMAN-B na concentração de 100 µg/mL reduziu o crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis* em aproximadamente 67%, enquanto que o complexo GALMAN-B:VO reduziu em 65% o crescimento do protozoário na concentração de 10 µg/mL (AMARAL, 2011). No entanto, o possível efeito destes compostos foram atribuídos a presença do metal em sua estrutura sendo necessário realizar uma complexação química para potencializar o efeito sobre o protozoário, diferente dos PLT e f-PL de *G. americana*.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são fundamentais pois fornecem informações que norteiam o delineamento experimental, como a definição das concentrações do composto estudado e o tempo de tratamento.

Produtos naturais de plantas são uma fonte alternativa de drogas para o combate de infecções por *T. cruzi*, alguns dos quais exibem atividade tripanocida e baixa toxicidade (LUIZE et al., 2005; SÜLSEN et al., 2006; ROJAS; SOLÍS; PALACIOS, 2010). No presente estudo, foi observado que o extrato da espécie *G. americana* apresentou efeito citotóxico apenas nas duas maiores concentrações (1500 e 3000 µg/mL), sendo obtido uma CC₅₀ de 2250 µg/mL, no qual foram capazes de matar o parasito sem causar danos as células hospedeiras LLC-MK₂. Além disso, as f-PL (FI e FII), no período de 24 h de exposição, não apresentou nenhuma citotoxicidade nas concentrações testadas (2,92 a 1500 µg/mL).

Semelhantemente, duas neolignanas obtidas de plantas do nordeste brasileiro foram efetivas contra tripomastigotas e não causaram morte significativa sobre macrófagos peritoneais (CABRAL et al., 2010). Contrariamente, a fração acetato de etila das folhas de *Lygodium venustum* nas concentrações de 500 e 100 µg/mL apresentaram toxicidade em fibroblastos de 67% e 30%, respectivamente, e a fração metanólica (500 µg/mL) causou uma toxicidade de 53% (MORAIS-BRAGA et al., 2013). Extrato metanólico das folhas de *Quercus borealis* e da raiz de *Zingiber officinale* apresentaram elevada citotoxicidade para células VERO, inibindo em até 100%

a viabilidade nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL (SHABA et al., 2001).

Uma galactomanana do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) não afetou a viabilidade de macrófagos peritoneais, em concentrações 0,5 a 2 mg/mL durante 2 h de incubação. Enquanto que nos períodos de 24 e 48 h, GMPOLY nas concentrações de 0,25 a 0,75 mg/mL e 2 mg/mL respectivamente, afetou a viabilidade destas células em aproximadamente 20% para ambos os tempos de incubação (NOLETO, 2002). Arabinogalactana (ARAGAL) não sulfatada mostrou ser tóxico em concentrações até 300 µg/mL em até 5 h de incubação para macrófagos (MORETÃO et al., 2003, 2004). Como podemos observar, a citotoxicidade pode variar conforme o tipo celular, o tempo de incubação das substâncias em estudo, a natureza da substância e o método utilizado. Conseqüentemente, as informações referentes aos estudos de citotoxicidade devem ser cuidadosamente interpretadas, levando em consideração principalmente a aplicação destinada àquela substância ou método (CAVALIERI et al., 2011).

Determinadas as concentrações não tóxicas, avaliou-se o SeI dos PLT das folhas de *G. americana* sobre *T. cruzi* em relação as células hospedeiras LLC-MK₂. Essa avaliação é considerada importante, visto que uma substância é considerada promissora como fármaco citotóxico se ela apresentar seletividade sobre as células-alvo, sem lesar expressivamente a célula hospedeira (PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015).

Os PLT apresentaram toxicidade em 24 h sobre as células LLC-MK₂ apenas nas duas maiores concentrações, sendo mais tóxica para os protozoários do que para as células de mamíferos. Considerando as concentrações de LC₅₀ contra as formas tripomastigotas, o SeI foi de 4,8, demonstrando ser 2,08 vezes maior do que ao BZ, a droga usada atualmente para tratar a DC. Desta forma, os PLT demonstraram boa seletividade contra a cepa Y de *T. cruzi*. Esse índice foi semelhante ao de extratos metanólicos de plantas medicinais da Arábia Saudita e do Iêmen e de óleos essenciais das folhas de *Lippia organoides*, *Justicia pectorales* e *Vitex agnus-castus* que exibiram atividade tripanocida com um SeI <4 (MOTHANA et al., 2014; BORGES et al., 2012).

Como as f-PL não apresentaram citotoxicidade frente às células hospedeiras, sugerimos através da estimativa matemática que o SeI de FI foi superior a 15 e de FII superior a 65, demonstrando desta forma um resultado bem promissor para o desenvolvimento de novas drogas contra *T. cruzi*. Quando o SeI é > 50, significa dizer que satisfaz os critérios exigidos pelo WHO/TDR para *T. cruzi* sendo considerado um critério de sucesso para atividade contra protozoários (NWAKA; HUDSON, 2006). Além disso, subseqüentes ensaios *in vivo* são recomendados apenas para compostos que

atingam um $SeI \geq 50$ (NWAKA; HUDSON, 2006).

Estudos anteriores demonstraram atividade citotóxica de extratos brutos de várias espécies de plantas contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (MAFEZOLI et al., 2000; PIZOLATTI et al., 2002; MOLINA-GARZA et al., 2014; MEIRA et al., 2015). No entanto, não foi encontrado na literatura nenhum dado referente à atividade de polissacarídeos de plantas sobre o parasito *T. cruzi*.

Neste estudo, também avaliamos o efeito anti-amastigota dos PLT e f-PL das folhas de *G. americana* em 24 e 48 h. PLT e f-PL foram testados sobre essa forma em duas concentrações, CI_{50} e $CI_{50/2}$, selecionadas a partir dos ensaios sobre as formas tripomastigotas.

A atividade anti-amastigota dos PLT em estudo evidenciaram que a CI_{50} e $CI_{50/2}$ tanto em 24 como em 48 h, reduziram o percentual de células infectadas, o número de amastigotas/100 células e o índice de sobrevivência. Em FI, somente a CI_{50} inibiu o percentual de células infectadas e o número de amastigotas/100 células. Enquanto que em 48 h, ambas as concentrações reduziram todos os parâmetros avaliados. Já FII, a CI_{50} e $CI_{50/2}$ em ambos os tempos analisados, reduziram o percentual de células infectadas, o número de amastigotas/100 células e o índice de sobrevivência. Além disso, as concentrações utilizadas não causaram efeito citotóxico sobre as células LLC-MK₂, indicando que os polissacarídeos reduziram a proliferação de formas amastigotas sem lesar as células hospedeiras. Como visto, FII foi mais potente que FI, corroborando o efeito desta fração sobre as formas tripomastigotas.

Formas amastigotas correspondem ao estágio evolutivo multiplicativo intracelular encontrado no hospedeiro vertebrado e intrinsecamente ligado ao desenvolvimento do parasitismo tissular, sendo de grande importância para o desenvolvimento da forma crônica da doença e na prospecção de um novo quimioterápico (CLAYTON, 2010). De todas as formas do parasito, a mais difícil de ser afetada é a forma amastigota, pois seu habitat natural está dentro das células hospedeiras, que possuem vários mecanismos para proteger a célula contra agentes citotóxicos. Os compostos devem ter a capacidade de atravessar a membrana plasmática do hospedeiro e, portanto, substâncias que aumentam sua permeabilidade ou atuam sobre bombas de efluxo devem ser consideradas.

Compostos ativos contra formas amastigotas foram obtidos de plantas e foram capazes de reduzir a proliferação do parasito (UCHIYAMA et al., 2002). O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* resultou na

obtenção de um alcalóide de guanidina chamado de alchornedina. Este composto exibiu atividade antiprotozoária contra formas amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), apresentando uma CI_{50} de 27 $\mu\text{g/mL}$ (BARROSA et al., 2014). Compostos isolados de *Pseudocedrela kotschyi* (Meliaceae) exibiram atividade contra formas amastigotas apresentando uma $CI_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ (IZUMI et al., 2011).

Marcolino (2010) avaliou *in vitro* a atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* de polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas marinhas. O polissacarídeo Go3 apresentou atividade a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ chegando a 55% de inibição em 10 $\mu\text{g/mL}$. Iota-Gy iniciou sua atividade já em 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e atingiu 50% de inibição em 10 $\mu\text{g/mL}$. EHW-I exibiu o efeito leishmanicida mais intenso em todas as concentrações, atingindo 98% de inibição com 10 $\mu\text{g/mL}$. Amaral (2011) avaliou a atividade leishmanicida de diferentes polissacarídeos de fontes vegetais e complexados com metal. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que os polissacarídeos complexados potencializaram a atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*. No presente estudo, os polissacarídeos de *G. americana* não apresentam grupos sulfato em sua estrutura química e não sofreram nenhum tipo de alteração química, desta forma, apresentaram uma promissora atividade frente às formas amastigotas de *T. cruzi*.

A partir dos dados obtidos, avaliamos o mecanismo de ação antiparasitário utilizando formas epimastigotas. Para identificar o mecanismo de morte celular induzido pelos PLT e f-PL das folhas de *G. americana*, inicialmente foram analisados os processos clássicos de necrose/apoptose utilizando os corantes fluorescentes 7-AAD e anexina V/PE (KUMAR et al., 2015). Essa metodologia permite a divisão de células suspensas em diferentes populações: células viáveis, que não estão marcadas por nenhum dos fluorocromos; células necróticas, marcadas unicamente com 7-AAD; e células apoptóticas, marcadas unicamente com Ax/PE. As células duplamente marcadas são consideradas em apoptose tardia ou em necrose secundária (MELLO et al., 2014).

Após 24 h de incubação foi observado que tanto os PLT quanto as f-PL exibiram um aumento significativo na fluorescência de células duplamente marcadas e, principalmente, aquelas marcadas com 7-AAD após 24 h de tratamento em comparação com os parasitos não tratados, indicando alteração da integridade da membrana celular, sugerindo morte celular por necrose. As principais características deste tipo de morte celular envolvem alterações dramáticas na mitocôndria incluindo a despolarização mitocondrial, a depleção de ATP, geração de EROs, a vacuolização citosólica, perda da

homeostase de cálcio e principalmente ruptura da membrana plasmática (MENNA-BARRETO; CASTRO 2015; MENNA-BARRETO et al., 2007).

Dentre as organelas encontradas no *T. cruzi*, a mitocôndria é classificada como uma das principais estruturas alvos para potenciais quimioterápicos, devido a suas características distintas em relação às encontradas em mamíferos superiores, além de se mostrar particularmente sensíveis a ação de compostos-testes (SHANG et al., 2009).

Para confirmar se havia alteração no potencial de membrana e esta estar relacionada ao tipo de morte celular do parasito, utilizamos a Rho 123, marcador que se acumula especificamente na mitocôndria de células viáveis (DARZYNKIEWICZ et al., 1981). A marcação com Rho 123 mostrou que os polissacarídeos apresentaram efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial, onde foi observado uma redução do acúmulo do corante nas mitocôndrias pela diminuição da intensidade de fluorescência das células marcadas, sugerindo a perda de integridade da membrana mitocondrial.

Alteração no potencial transmembrânico da mitocôndria podem levar a uma alteração da homeostase intracelular de íons, causando desta forma uma disfunção mitocondrial e uma diminuição na produção de ATP levando a perfis de morte celular programada, como a necrose (ZONG; THOMPSON, 2006). Outro fator associado às alterações no potencial da membrana mitocondrial é a geração de EROs, um produto comum a várias drogas tripanocidas que atuam nesta organela (MENNA-BARRETO et al., 2009).

Com o objetivo de verificar e confirmar se os polissacarídeos em estudo induziam a produção de EROs foi utilizado o H₂DCFH-DA, um reagente que é internalizado pelas células e convertido em produto fluorescente na presença de EROs no citoplasma (SILVEIRA, 2004). Após 24 h de incubação foi observado que tanto os PLT quanto as f-PL demonstraram aumento significativo da intensidade de fluorescência, demonstrando indução de *stress* oxidativo no interior da célula.

Em seu ciclo biológico, o *T. cruzi* precisa lidar com diferentes microambientes redox, por habitar compartimentos biológicos distintos. Dessa forma, esse parasito possui um extenso e diferenciado mecanismo de detoxificação, que atua com o objetivo de protegê-lo do ataque de moléculas oxidantes (IRIGOÍN et al., 2008). Produtos naturais exibem atividade tripanocida ao interferir com o equilíbrio redox dos parasitos, atuando na cadeia respiratória ou na defesa celular contra o *stress* oxidativo. Isso ocorre porque os produtos naturais possuem estruturas capazes de gerar radicais que podem causar dano peroxidativo à tripanotona redutase, uma enzima detoxificante

muito sensível às alterações no equilíbrio redox (ATAWODI et al., 2003).

Embora o DCF seja uma sonda inespecífica, vários autores descrevem sua importância como marcador do *stress* oxidativo celular (COWLEY et al., 2017; KIM et al., 2017; LAJKO et al., 2017; MC MURRAY; PATTEN; HARPER, 2016). Seu mecanismo permite a identificação da produção intracelular de EROs, tal como o peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e anion superóxido. Nossos dados demonstraram que os polissacarídeos de *G. americana* induziram um aumento de EROs intracelular, que pode estar associado ao seu efeito tripanocida.

Alterações morfológicas após 24 h de tratamento com os polissacarídeos foram observadas na topografia do parasito após análise das imagens por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações na forma do corpo, como arredondamento e encurtamento do parasito; vazamento aparente de conteúdo citoplasmático e degradação da membrana celular com poros, achados indicativos de dano necrótico, corroborando com os dados de marcação predominante por 7-AAD (MENNA-BARRETO et al., 2009).

Com o objetivo de investigar a participação de H_2O_2 no efeito biológico dos polissacarídeos sobre *T. cruzi*, realizamos o ensaio de bloqueio com catalase. É amplamente conhecido que essa enzima está ausente em tripanosomatídeos e, em alguns casos, essa deficiência enzimática é considerada importante para a ação antiparasitária de substâncias bioativas (BOVERIS et al., 1980). Desta forma, a produção de EROs é considerada um alvo adequado para drogas tripanocidas (FREIRE et al., 2017; TURRENS, 2004). Neste estudo, foram realizados experimentos com a catalase a fim de identificar o possível envolvimento do H_2O_2 com o efeito dos polissacarídeos. Desta forma, não foi observada diferença significativa nas células tratadas com os polissacarídeos na presença de catalase, e, portanto, a adição de catalase ao experimento não alterou o efeito tripanocida dos polissacarídeos, sugerindo que seu efeito não está relacionado à produção de peróxido de hidrogênio.

Embora a literatura demonstre vários estudos sobre compostos isolados de plantas com potencial tripanocida, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. Além disso, não foram encontrados relatos experimentais sobre o efeito antiparasitário de polissacarídeos de plantas sobre *T. cruzi*. Desta forma, o presente estudo demonstrou pela primeira vez o efeito antiparasitário e o mecanismo de ação dos polissacarídeos isolados das folhas de *G. americana* sobre todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, apresentando-se como substâncias promissoras, oriundas de fontes naturais contra a DC.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito e o mecanismo antiparasitário *in vitro* de extratos polissacarídicos obtidos de vegetais. Os polissacarídeos das folhas de *Genipa americana* foram os mais promissores, apresentaram efeito sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, com alta seletividade (FI) e sem causar toxicidade *in vitro* (FI e FII) sobre as células hospedeiras LLC-MK₂. As alterações celulares relacionadas ao mecanismo de morte celular sugerem a indução de necrose com alteração do potencial transmembrânico mitocondrial, levando a liberação de espécies reativas de oxigênio. Os resultados observados demonstram que os polissacarídeos das folhas de *G. americana* são substâncias promissoras para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários a serem utilizados no tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and molecular immunology. 5a ed. São Paulo: Elsevier, 2005, 562 p.

ABDEL-SATTAR, E.; MAES, L.; SALAMA, M. M. In Vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. **Phytother Res.**, v. 24, n. 9, p. 1322–1328, 2010.

ABE, F. et al. Trypanocidal Constituents in Plants 1 . Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol Pharm Bull.**, v. 25, n. 9, p. 1188–1191, 2002.

ADAMS, D. S. et al. PGG-glucan activates NF-kappa- β -like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. **J Leukoc Biol.**, v. 62, p. 865–873, 1997.

ALVES, J. S. F. et al. Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 27, n. 5, p. 641-644, 2017.

ALZUGARAY, D. Plantas que Curam. São Paulo: Hemus Press, 1984.

AMARAL, A. E. **Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (iv/v) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e Leishmania in vitro.** 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

AMBROZIN, A. R. P. et al. Trypanocidal Activity of Meliaceae and Rutaceae Plant Extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 227-231, 2004.

ANDRADE, J. P. et al. I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arq Bras Cardiol**, v. 97, n.6, p. 434-442, 2011.

ANDREWS, N.W.; COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J Protozool.**, v. 29, n. 2, p.264-269, 1982.

ASRES, K. et al. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. **Phytother Res.**, v. 15, n. 1, p. 62-69, 2001.

ATALE, N. et al. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **J Microsc.**, v. 255, n.1, p. 7–19, 2014.

ATAWODI, S.E . et al. In vitro trypanocidal effects of methanolic extracts of some Nigeria savannah plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.2, n. 9, p. 317-321, 2003.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: _____DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**, Bristol: Academic Press, p.143, 1997.

BABINEAU, T.J. et al. Randomized phase I/II trial of a macrophage-specific immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. **Ann Surg.**, v. 220, n. 5, p. 601–609, 1994.

BADAM, L.; JOSHI, S. P.; BEDEKAR, S. S. “In vitro” antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) leaf extract against group B coxsackie viruses. **J Commun Dis.**, v. 31, n. 2, p. 79-90, 1999.

BAHIA, T. M. et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. **PloS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.

BARACCA, A. et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1606, n. 1-3, p. 137–146, 2003.

BARROSA, K. H. et al. Alchornedine, a New Anti-Trypanosomal Guanidine Alkaloid from *Alchornea glandulosa*. **Planta Med.**, v. 80, n. 15, p. 1310- 1314, 2014.

BARROSO, P.A. et al. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis*

infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. **J Antimicrob Chemother.**, v. 59, n. 6, p. 1123–1129, 2007.

BASILE, L. et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveill.**, v. 16, n. 37, p.ii 19968, 2011.

BERGER, I. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal Infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J Ethnopharmacol.**, v. 62, n. 2, p. 107 – 115, 1998.

BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clin Microbiol Ver.**, v. 24, n. 4, p. 655–81, 2011.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the united states a systematic review. **JAMA.**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 2007.

BERN, C.; MONTGOMERY, S.P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis.**, v. 49, n. 5, p. 52–54, 2009.

BIOLO, A. et al. Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 52, n. 4, p. 300–316, 2010.

BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). **Current Sciencie.**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many. **NIH Public Access.**, v. 8, n. 6, p. 510–518, 2010.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental parasitology.**, v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.

BORGES, V. M. et al. Interação *Leishmania* e células do hospedeiro. In: BARRAL, A.;

COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1ª edição. cap. 19, p. 102-112, 2011.

BOU, D. D. et al. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine.**, v. 21, n. 5, p. 676–681, 2014.

BOVERIS, A. et al. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal.**, v. 188, n. 3, p. 643–648, 1980.

BOWMAN, N. M. et al. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. **Clin Infect Dis.**, v. 46, n. 12, p. 1822–1828, 2008.

BOYRAZ, N.; ÖZCAN, M. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. **Int J Food Microbiol.**, v. 107, n. 3, p. 238–242, 2006.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 540p, 1976.

BRASILEIRO, M. T. et al. *Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Rev. Bras. Farmácia.**, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

BRAUKAISER. Microscope use in brewing. **BRAUKAISER**. Disponível em: <http://braukaiser.com/download/Neubauer_hemocytometer.pdf>. Acesso em: 10 agosto. 2015.

BRENNAND, A. et al. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 177, n. 2, p. 83-99, 2011.

BRENNER, Z. et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro: **G. Ko.**, p. 431, 2000.

CABRAL, M.M.O. et al. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae)

with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.**, v. 124, n. 3, p. 319–324, 2010.

CALIXTO JÚNIOR, J.T. et al. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. **Saudi. J. Biol. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 434–440, 2016.

CAMARGO, E.P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin Of Metacyclic Trypanosomes In Liquid Media. **Rev Inst Med Trop.**, v. 6, n. 6, p.93-100, 1964.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, p. 331–335, 1999.

CANCADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CANTOS, G. et al. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on leishmania-infected macrophages. **Biochem. J.**, v. 289, p. 155–160, 1993.

CARDOSO, R.N. et al. Chagas cardiomyopathy is associated with higher incidence of stroke: a meta-analysis of observational studies. **J Card Fail.**, v. 20, n. 12. p. 931–38, 2014.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: American Trypanosomiasis – Chagas Disease. **O. Hund. Y. Rev. Elsev.**, p. 539-581, 2010.

CAROD-ARTAL, F.J. Policy implications of the changing epidemiology of Chagas disease and stroke. **Stroke**, v. 44, n. 8, p. 2356–2360, 2013.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **J Ethnopharmacol.**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.

CAVALCANTI, D. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Bmc Microbiology**, v. 9, n. 1, p.1-12, 2009.

CAVALIERI, E. et al. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 589–594, 2004.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem: Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, n. 2, p. 219-275, 1911.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, n. 2, p. 159-218,1909.

CHEN, X. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement : Forty years of application and controversy. **Free Radic Res.**, v. 44, n. 6, p. 587–604, 2010.

CHIEFFI, P.P.; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Inst. Med. Trop. SP.**, 2000.

CIMERMAN, B.; CEMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: editora Atheneu, p. 81-112, 2008.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, Basingstoke, v. 465, p. 4-5, 2010.

CLEARY, J.A.; KELLY, G.E.; HUSBAND; A.J. The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. **Immunol Cell Biol.**, v. 77, n. 5, p. 395–403, 1999.

CORRÊA, P.M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF, Rio de Janeiro, 1984.

COWLEY, P.M. et al. Oxidant production and SOD1 protein expression in single skeletal myofibers from Down syndrome mice. **Redox Biol.**, v. 13, p. 421-425, 2017.

CROFT, S.L. et al. A Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, P. L. R. et al. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids.**, v. 23, n. 3, p. 880-885, 2009.

DA SILVA FILHO, A.A. et al. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **J Pharm Pharmacol.**, v. 56, n. 9, p. 1195–1199, 2004.

DARZYNKIEWICZ, Z.; STAIANO-COICO, L.; MELAMED, M. R. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. **Proc Nat Acad Sci U S A**, v. 78, n. 4, p. 2383-2387, 1981.

DAVIS, A.J.; KEDZIERSKI, L. Recent advances in antileishmanial drug development. **Curr Opin Investig Drugs.**, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2005.

DE JUSSIEU A. Mémoire sur le groupe des Méliacées. **Memoires du Museum d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 19, p. 153-304, 1830.

DE MEDEIROS, M.D.G.F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int.**, v. 60, n. 3, p. 237–241. 2011.

DE OLIVEIRA, R.B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Am J Gastroenterol.**, v. 93, p. 884–889, 1998.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des.**, [S.L.], v. 4, n. 8, p.269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, [s.l.], v. 104, p.89-100, 2009.

DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **J Ethnopharmacol.**, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2001.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, [s.l.], v. 25, n. 21, p.1-10, jun. 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *trypanosoma cruzi* no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 68-72, 2011.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DIAS, J.C.P.; MACEDO, V.O. Doença de Chagas. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. **G. Ko.** Rio de Janeiro, p. 557-594, 2005.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 167, n. 1, p. 189-198, 1947.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.

DOONAN, F.; COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. **Methods.**, v. 44, n. 3, p. 200–204, 2008.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem.**, v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 11, p. 536-42, 2006.

DVORAK, J. A.; HOWE, C. L. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells In Vitro. **J. Protozool.**, v. 23, n. 4, p. 534–537, 1976.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. **Exp. Parasitol.**, v. 34, n. 2, p. 268–283, 1973.

ELIAS, M et al. Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. **Protist.**, v. 158, n. 2, p.147-157, 2007.

ESCHENAZI, B. *Trypanosoma cruzi* forms - Job for association Medecins Sans Frontieres. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

ESTRELLA, E. **Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas**. Manaus: TCA, 268 p, 1995.

FABBRO, D. L. et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2007.

FELICIANGELI, M. D. et al. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 44–49, 2003.

FERNANDEZ, A.; BEZERRA, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus comunicações, 1990.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 39, n. 5, p. 507-509, 2006.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J Parasitol**, v. 86, n. 6, p. 1213-1218, 2000.

FREIRE, A. et al. Catalase expression impairs oxidative stress-mediated signalling in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology.**, v. 144, n. 11, p. 1498-1510, 2017.

GAO, Q. P. et al. Characterisation of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Carbohydr. Res.**, v. 181, p. 175-187, 1988.

GALVÃO, C.R. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, n. 1, p.1-36, 2003.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J Bioenerg Biomembr.**, v. 43, n. 6, p.651-661, 2011.

GONTIJO, E. D. et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v. 18, n. 3, p. 243-245, 2009.

GÓRGOLAS, M. et al. The use of steroids to prevent cutaneous reactions to benznidazole in patients with Chagas disease. **Pathog Glob Health.**, v. 107, n. 3, p. 157-60, 2013.

GUARNACCIA, R. et al. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. **Tetrahedron Lett.**, v. 13, n.50, p. 5125-5127, 1972.

GUO, C. et al. Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H₂O₂ via TGF- β signal pathway. **Sci Rep.**, v. 14, n. 5, p. 1-14, 2015.

GUREVITZ, J. M. et al. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2158, 2013.

HALL, B.S.; WILKINSON, S.R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.56, p.115 - 123, 2012.

HANNAERT, V. et al. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biol Dis.**, v. 2, n. 11, p. 2-11, 2003.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; BHUVANESWARI, R. Restorative effect of Azadirachta indicab aqueous leaf extract dip treatment on haematological parameter changes in Cyprinus carpio (L.) experimentally infected with Aphanomyces invadans fungus. **J Appl Ichthyol.**, v. 21, n. 5, p. 410–413. 2003.

HAYASHI, A. et al. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, n. 6, p. 546-552, 2000.

HERNANDEZ, S. et al. Brief Report: Autochthonous Transmission of Trypanosoma cruzi in Southern California. **Open Forum Infect Dis.**, v. 3, n. 4, p. ofw 227, 2016.

HIDRON, A. I. et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 5, p. e688, 2010.

HOSSAIN, C.F. et al. Genipatriol, a new cycloartane triterpene from Genipa spruceana. **J. Nat. Prod.**, v.66, n. 3, p. 398–400, 2003.

HRCKOWA, G.; VELEBNY, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **J. Helminth.**, v. 75, n. 2, p. 141-146, 2001.

HUGHES, J.B. et al. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from Prosopis juliflora Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, v. 43, p. 50–58, 2006.

ISMAN, M. B. et al. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. **J Agric Food Chem.**, v. 38, n. 6, p. 1406-1411, 1990.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against Trypanosoma cruzi. **Nat Prod Rep.**, v. 28, n. 4, p. 809-23,

2011.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 10, p. 69–75, 2010.

JAIN, M. V. et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J Cell Mol Med.**, v. 17, n. 1, p. 12-29, 2013.

JIMENEZ, V. et al. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in Trypanosomacruzi: a new therapeutic target? **Phytomedicine.**, v. 21, n. 11, p. 1411–1418, 2014.

JIMENEZ-COELLO, M. et al. Antitrypanosomal activity of Senna villosa in infected balb/c mice with Trypanosoma cruzi during the sub acute phase of infection. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 8, n. 5, p. 164-169, 2011.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasit Vectors**, v. 3, n. 104, 2010.

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 13ªed., Editora Nacional, São Paulo, 2002.

JUNG, K. et al. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* -glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.**, v. 51, n. 2, p. 72-76, 2004.

KARDOSOVÁ, A. et al. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydr Polym.**, v. 57, n. 2, p. 165-176, 2004.

KESSLER, R. L. et al. Trypanosoma cruzi Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE.**, v. 8, n. 1, 2013.

KFFURI, C.W. et al. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio

Negro in Amazonas, Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v.178, p. 188-198, 2016.

KILLEEN, T.J.; GARCIA, E.; BECK, S.G. **Guia de Arboles de Bolivia**, La Paz: Quipus SRL, 1993.

KIM, E.K. et al. Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth. **PLoS One.**, v. 12, n. 7, 2017.

KIRMIZIBEKMEZ, H. et al. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. **Planta Med.**, v. 70, n.8, p. 711-717, 2004.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D. In: _____ **Medicinal Plants** (eds BLATTER, E.; CAINS, J. F.; MHASKAR, K. S.). New Delhi: Vivek Vihar, 536p, 1975.

KITAJMA, Y. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.**, v. 41, n. 4, p. 211–217, 2000.

KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food Chem Toxicol.**, v. 85, p. 45–51, 2015.

KWOK, T.T. et al. The anti-tumour effect of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharides. **Biol Signals Recept**, v. 10, n. 5, p. 294-298, 2001.

LAJKO, M. et al. Photoreceptor oxidative stress in hyperoxia-induced proliferative retinopathy accelerates rd8 degeneration. **PLoS One**, v.12, n. 7, p. 1-22, 2017.

LE, N.H.T. et al. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. **J Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 3, p. 858-862, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4a. ed. São Paulo: Sarvier, p, 1202. 2006.

LI, W. et al. Immunostimulating properties of intragastrically administered Acetobacter-derived soluble branched (1,4)-^L-d-glucans decrease murine susceptibility to *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 12, p. 7005–7011, 2004.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol.**, v. 8, n. 607, p. 1-14, 2017.

LIMA, D. B. et al. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon.**, v. 120, p.128-132, 2016.

LIU, B. et al. Fellowship o the rings: the replication of Kinetoplast DNA. **Trends Parasitol.**, v. 21, n.8, p. 363-369, 2005.

LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

LUIZE, P.S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41,n. 1, p. 85-94, 2005.

MADEIRA, J. C. **Avaliação das atividades anticoagulante e antitrombótica do extrato polissacarídico da folha de *Genipa americana* L.** 2012. 53f. Monografia (Graduação - Curso de Enfermagem) - Centro de Ciência da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

MADEIRA, J. C. **Polissacarídeos da folha de *Genipa americana*: isolamento, caracterização química e efeitos anticoagulante, antiplaquetário, antitrombótico e anti-inflamatório.** 2014. 71f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

MAFEZOLI, J. et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **J Ethnopharmacol.**, v. 73, n.1-2, p. 335–340, 2000.

MAIKAI, V. A. Antitrypanosomal activity of flavonoid extracted from *Ximenia americana* stem bark. **Int J Biol.**, v. 3, n. 1, p. 115-121, 2011.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. **Clin. Cardiol.**, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015.

MARCOLINO, M. M. K. Avaliação de atividade leishmanicida in vitro de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e naturalmente sulfatados. **Dissertação**. Universidade Federal do Paraná. Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, 2010.

MARÍN, C. et al. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. **Acta Trop.**, v. 148, p. 170–178, 2015.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C. et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydr Polym.**, v. 60, n. 1, p. 7-13, 2005.

MARTINS-MELO, F.R. et al. Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 45, n. 5, p.591–596, 2012.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 122-124, 2007.

MC MURRAY, F.; PATTEN D. A.; HARPER, M.E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches. **Obesity**, v. 24, n. 11, p. 2301–2310, 2016.

MEDDA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BASU, M.K. Evaluation of the in-vivo activity and toxicity of amarogentin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, n. 6, p. 791, 1999.

MEIRA, C.S. et al. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11,

p. 969–974, 2015.

MELLINGER, C.G. et al. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. **Int J Biol Macromol.**, v. 43,n. 2, p. 115–120, 2005.

MELLO, C. P. et al. Bothropoides insularis venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon.**, v. 88, p. 107–114, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphtoimidazoles synthesized from beta-lapachone. **Parasitol Res.**, v. 101, n. 4, p. 895 – 905, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. **Cell Death - Autophagy, Apoptosis And Necrosis**, p.953-978, 2015.

MESIA, G. K. et al. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **J Ethnopharmacol.**, v. 115, n. 3, p. 409–415, 2008.

MESQUITA, M.L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 100, n. 7, p.783-787, 2005.

MINUZZI-SOUZA, T.T.C. et al. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. **Parast. Vectors.**, v. 9, n. 39, p. 1-6, 2016.

MIRANDA, K. et al. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Exp Parasitol.**, v. 118, n. 1, p.2-9, 2008.

MOLINA, I. et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 6125–31, 2015.

MOLINA-GARZA, Z. J. et al. Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Trop.**, v. 136, p. 14-18, 2014.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 17–30, 2009.

MORAIS-BRAGA, M.F. et al. Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae). **Exp Parasitol.**, v. 134, n.2, p. 178-82, 2013.

MORETÃO, M. P. et al. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophages functions. **Immunol Lett.**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M. P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunol Lett**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for Chronic Chagas' cardiomyopathy. **N Engl J Med.**, v. 373, n. 14,p. 1295–306, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, v. 1-2, n. 65, p.55-63, 1983.

MOTHANA, R. A. et al. Evaluation of the *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants uses in Saudi and Yemeni traditional medicine. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, *eCAM*, 2014, 905639. <http://doi.org/10.1155/2014/905639>

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative methabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. **Mononuclear Phagocytes.**, p. 411-420, 1985.

NEVES, D.P.; FILIPPIS, T. Parasitologia básica. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Ath.**, p. 224, 2010.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NISHINO, T. et al. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. **Carbohydr Res.**, v. 255, p. 213-224, 1994.

NOGUEIRA, F.A. et al. Efficacy of aqueous extracts of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) in inhibiting larval development and eclosion of gastrointestinal nematodes of sheep. **J Appl Anim Res.**, v.42, n. 3, p. 356-360, 2014.

NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. **PLoS ONE.**, v. 10, n. 2, p. e0116712, 2015.

NOLETO, G. R. et al. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 233, n. 1-2, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G.R. et al. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and their effects on peritoneal macrophages. **Carbohydr Polym.**, v. 57, n. 2, p. 113-122, 2004.

NUNES, M. C. P. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological, 2013.

NUNES, M. C. P. et al. Ischemic cerebrovascular events in patients with Chagas cardiomyopathy: a prospective follow-up study. **J Neurol Sci**, v. 278, n. 1-2, p. 96-101, 2009.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nat Ver Drug Discov.**, v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Trop J Pharm Res.**, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, L. D. R. et al. *Haemonchus contortus*: in vivo anthelmintic activity of

Genipa americana L. leaves in sheep. **Planta Med.**, v. 78, 2012, doi: 10.1055/s-0032-1321107.

OLIVEIRA, M. DE F. et al. Tratamento etiológico da doença de chagas no brasil. **Rev patol trop.**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

OLIVEIRA, V. C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia* and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 104, n. 5, p.1053–1059, 2009.

PARSONS, M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular Microbiology.**, v. 53, n. 3, p. 717-724, 2004.

PAULSEN, B.S. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Curr. Org. Chem.**, v. 5, n. 9, p. 939-950, 2001.

PAVETO, C. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 1, p. 69–74, 2004.

PEÑA, S.; SCARONE, L.; SERRA, G. Macrocycles as potential therapeutic agents in neglected diseases. **Future Med Chem.**, v. 7, n. 3, p. 355–382, 2015.

PEREIRA, L. P. et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.

PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURAO, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology.**, v. 12, n. 10, p. 573-580, 2002.

PEREIRA, R.M. et al. Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. **Parasitology.**, v. 144, n. 10, p. 1275-1287, 2017.

PÉREZ-AYALA, A. et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. **Clin Microbiol Infect.**, v. 17, n. 7, p. 1108–13, 2011.

PEREZ-MOLINA J.A. et al. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. **Acta Trop.**, v. 127, n.2, p. 101–104, 2013.

PEREZ-MOLINA, J. A. et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. {[Review]}. **J Antimicrob Chemother.**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Seminar.** [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4), 2017.

PINAZO, M. J. et al. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 57, n.1, p. 390–95, 2012.

PINAZO, M. J. et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4896–99, 2010.

PIO CORREA, M. In: _____ Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. 3ed, v. 1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 6, p 49-50, 1984.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine**, v. 9, p. 422-426, 2002.

PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosome. **Eur J Cell Biol.**, v. 79, n. 11, p. 858-869, 2000.

PRANCE, G. T. Árvores de Manaus. 17ed. Manaus: INPA, p.223-225, 1975.

RAMESH H.P.; YAMAKI K.; TSUHIDA T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr Polym.**, v. 50, n. 1, p. 79-83, 2002.

RASSI, A. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with an association of nifurtimox and corticoid. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, n. 6, p. 547–50, 2002.

RASSI, A. J.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arq. Bras. Cardiol.** v.76, n. 1, p. 86–96, 2001.

RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol.**, v. 23, n. 12, p. 883–889, 2000.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI, JR. A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas' heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 1, p. 152-158, 2009.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RAY, A; BANERJEE, B. D.; SEN, P. Modulation of humoral and cell mediated immune responses by *Azadirachta indica* (Neem) in mice. **Indian J Experimen Biol.**, v. 34, n. 7, p. 698-701, 1996.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 205-236, 1997.

REQUENA-MENDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n. 2, p. e0003540, 2015.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: **G. Ko.**, p. 883, 2013.

RODRIGUES, C. J, CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

ROJAS, J.; SOLÍS, H.; PALACIOS, O. Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. **Anal Facult Med.**, v. 71, n. 3, p. 161–165, 2010.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576–588, 18 mar. 2010.

ROSAS, L.V. et al. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Curr Med Chem.**, v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006.

RUIZ-BRAVO, A.; JIMENEZ-VALERA, M.; MORENO, E.; GUERRA, V. & RAMOSCORMENZANA, A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Paenibacillus jamilae* CP-7. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 8, n. 4, p. 706-710, 2001.

RUSSOMANDO, G. et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 3, p. 487–91, 1998.

SAIMA, Y. et al. An antitumor pectic polysaccharide from *Feronia limonia*. **Int J Biol Macromol.**, v. 27, n. 5, p. 333–335, 2000.

SALEM, M.M., WERBOVETZ, K.A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Curr Med Chem.**, v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006.

SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine.**, v. 11, n. 2-3, p. 230-234, 2004.

SALVATELLA, R. et al. South-south cooperation for chagas disease. **Lancet.**, v. 382, n. 9890, p. 395–396, 2013.

SALVATELLA, R.; IRABEDRA, P.; CASTELLANOS, L. G. Interruption of vector

transmission by native vectors and the art of the possible. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 122–30, 2014

SAMPAIO, T. L. et al. Nephroprotective effects of (-)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine.**, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SAMUELS, A. M. et al. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 8, p. e2358, 2013.

SAMUELSEN, A. B. et al. Isolation and partial characterization of biologically-active polysaccharides from *Plantago major* L. **Phytother. Res.**, v. 9, p. 211-218, 1995.

SANTORO, G. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology.**, v. 134, n. 11, p. 1649–1656, 2007.

SANZ, M.L. et al. Prebiotic properties of alternansucrose maltose-acceptor oligosaccharides. **J Agric Food Chem.**, v. 53, n. 15, p. 5911-5916, 2005.

SASAKI, H. et al. Effects of Z-100, a *Mycobacterium-tuberculosis*-derived arabinomannan, on the LP-BM5 murine leukemia virus infection in mice. **Pathobiology.**, v. 69, n. 2, p. 96-103, 2001.

SCHIJMAN, A. G. et al. A etiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **J Antimicrob Chemother.**, v. 52, n. 3, p. 441–49, 2003.

SCHIJMAN, A. G. et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e931, 2011.

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.

SCHULTZ, A. R. Introdução ao estudo da botânica sistemática. v. 2. Globo, Porto Alegre, 1984.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, Brasil, v. 46, n. 21, p.1-9, 2015.

SHABA, P. et al. In vitro trypanocidal activity of methanolic extracts of *Quercus borealis* leaves and *Zingiber officinale* roots against *Trypanosoma evansi*. **Greener J Agri Sci.**, v. 1, n. 1, p. 41-47, 2011.

SHANG, X. J. et al. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. **J Andrology.**, v. 30, n. 2, p.122 – 126, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.*, v. 54, n. 6, p. 845–52, 2012.

SILVA-LEITE, K. E.S. et al. Polysaccharide rich fractions from barks of *Ximenia americana* inhibit peripheral inflammatory nociception in mice antinociceptive effect of *Ximenia americana* polysaccharide rich fractions. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 27, n. 3, p. 339–345, 2017.

SILVEIRA, A. C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 122-124, 2011.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 52-63, 2011.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 48, n. 6, p. 812–822, 2004.

SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 1, n. 94, p.139-141, 1999.

SOBREIRA, A. C. M. et al. Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Iguatu, CE. **Rev. Soc. Bras Med. Trop.**, v. 34, n, 2, p. 193-196, 2001.

SOSA-ESTANI, S. et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 4, p. 526–29, 1998.

SOUZA, R.O.S. et al. Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. **Carbohydr Polym.**, v. 124, p. 208-215, 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira baseado em AP II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 640, 2005.

SOUZA, W. Protozoologia médica. Rio de Janeiro: **Rubio.**, p. 416, 2013.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell Biol.** 2010:295394. doi: 10.1155/2010/ 295394, 2010.

STIMPEL, M. et al. Macrophage activation and induction of macrophage cyto-toxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. **Infection and Immunity.**, v. 46, n.3, p.845-849, 1984.

STIMPERT, K. K.; MONTGOMERY, S. P. Physician awareness of Chagas disease, USA. **Emerg Infect Dis.**, v 16, n. 5, p. 871–782, 2010.

STREIGER, M. L. et al. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 37, n. 5, p. 365–75, 2004.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest.**, v. 118, n. 4, p.1301-1310, 2008.

SUDHAKAR, M. et al. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia.**, v. 77, n. 5, p. 378-380, 2006.

SÜLSEN, V. et al. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitol. Res.**, v. 98, n. 4, p. 370–374, 2006.

SUN, X. B.; MATSUMOTO, M.; YAMADA, H. Anti-ulcer activity and mode of action of the polysaccharide fraction from the leaves of *Panax ginseng*. **Planta Med.**, v. 58, p. 432-435, 1992.

TAGBOTO, S.; TOWNSON, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products: advances in parasitology. **Adv. Parasitol.**, v.50, p. 199–295, 2001.

TALARICO, L.B. et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int J Biol Macromol.**, v. 34,n. 1-2, p. 63-71, 2004.

TALLENT, W.H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron.**, v. 20, p. 1781-1787, 1964.

TAN, C. P. et al. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. **Metallomics.**, v. 6, n. 5, p. 978–95, 2014.

TEIXEIRA, T. et al. Potential therapeutic use of herbal extracts in Trypanosomiasis. **Pathog Glob Health.**, v. 108, n. 1, p. 30-36, 2014.

TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Bioresour. Technol.**, v. 98, n. 16, p. 3076–3079, 2007.

THOMAS, G.; ARAUJO, C. C.; SOUZA, P. S. Avaliação das atividades

antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. **10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. São Paulo, Brasil, 1988.

TIDJANI, M. A.; DUPONT, C.; WEPIERRE, J. *Azadirachta indica* stem bark extract antiinflammatory activity. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 23, n. 4, p. 259-266, 1989.

TURNOCK, D.C.; FERGUSON, M.A.J. Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell.**, v. 6, n. 8, p. 1450-1463, 2007.

TURRENS, J.F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol Aspects Med.**, v. 25, n. 1-2, p. 211-220, 2004.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharides immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clin Microb Rev.**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

UCHIYAMA, N. et al. Trypanocidal Terpenoids from *Laurus nobilis* L. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 11, p. 1514–1516, 2002.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Trop.**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2009.

VAN DER NAT, J. M. et al. Activity guided isolation and identification of *Azadirachta indica* bark extract constituents which specifically inhibit chemiluminescence production by activated human polymorphonuclear leukocytes. **Planta Med.**, v. 57, n. 1, p. 65- 68, 1991.

VANKA, A.; TANDON, S.; RAO, S.R. The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* mouth wash on *Streptococcus mutans* and lactobacilli growth. **Indian Soc Dent Res.**, v. 3, n. 12, p. 133-144, 2001.

VANNIER-SANTOS, M. A; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Current drug targets.**, v. 10, n. 3, p. 246–260, 2009.

VASCONCELOS, A.L. et al. Anatomical characterization of ultra-structures, biominerals and histolocalization of metabolites in leaves of *Genipa americana*. **Rev. Bras. Farmacogn.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.002>, 2017.

VENTURA-GARCIA, L. et al. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, p. e2410, 2013.

VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Ann Intern Med.**, v. 144, n. 10, p. 724–734, 2006.

WANG, L. et al. The analgesic and anti-rheumatic effects of *Thladiantha dubia* crude polysaccharide fraction in mice and rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 3, p. 1381–1387, 2011.

WATANABE COSTA, R.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Front. Microbiol.**, v.7, n. 388, 2016. doi: [10.3389/fmicb.2016.00388](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00388)

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Aetiological treatment. **World Health Organ Tech Rep Ser.**, v. 905, p. 1-109, 2002.

WHO a (World Health Organization). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates Wkly. **Epidem.**, v. 90, p. 33–44, 2015.

WHO. Epidemiology, Disponível em:< <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>, Acesso em 09/08/2017.

WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010. Geneva: World Health Organization, 2010.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Exp Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 255–262, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva: **World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Atualizado em março de 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 06 agosto de 2017.

XIE, W. et al. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. **Carbohydr Polym.**, v. 50, n. 1, p. 35-40, 2002.

YALIN, W. et al. P. Structure analysis and antitumor activity of (1-->3)-beta-d-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Planta Med.**, v. 71, n. 4, p. 381-384, 2005.

YAMADA, H. et al. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydr Res.**, v. 144, n. 1, p. 101-111, 1985.

YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas disease. **Adv Parasitol.**, v. 61, p. 129–65, 2006.

YANG, J. et al. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydr Polym.**, v. 52, n. 4, p. 397–403, 2003.

YOON S.J. et al. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thromb Res.**, v. 106, n. 1, p. 51-58, 2002.

YUN, C.H. et al. β -(1-->3, 1-->4) oat glucan enhances resistance to *Eimeria vermiformis* infection in immunosuppressed mice **Int. J. Parasitol.**, v. 27, n. 3, p. 329-337, 1997.

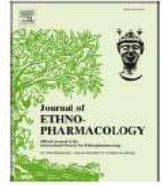
YUN, O. et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. **PLoS Negl Trop Dis.**,v. 3, n. 7, p. e488, 2009.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor NY. v. 20, p. 1-15, 2006.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Trypanocidal activity of polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves



Racquel Oliveira da Silva Souza^{a,*}, Paloma Leão Sousa^a,
Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes^b, Tiago Lima Sampaio^b,
Louise Donadello Tessarolo^a, Francisca Crislandia Oliveira Silva^c, Maria Gonçalves Pereira^c,
Alice Maria Costa Martins^a

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

^b Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

^c Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central, Universidade Estadual do Ceará, Quixadá, Ceará, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:

Plant polysaccharide
Genipa americana
Trypanosoma cruzi
Necrosis
Reactive oxygen species

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The parts of the *Genipa americana* (Rubiaceae) tree, also known as “jenipapo” or “jenipapeiro”, has been used in traditional Medicine in parasitic and bacterial infections. Thus, the experimental evolution of the antiparasitic activity of polysaccharide extracts from *Genipa americana* leaves, and correlation with antiparasitic and popular use is important.

Aim of the study: To evaluate the effect of polysaccharide extract obtained from *Genipa americana* leaves on all *Trypanosoma cruzi* (Y strain; benznidazole-resistant) developmental forms, a protozoan that causes Chagas' disease.

Materials and methods: An extract rich in polysaccharides was obtained from the leaves of *Genipa americana* (GaEPL) by associating depigmentation in methanol followed by extraction of polysaccharides in NaOH and precipitation with ethanol. Cytotoxicity to mammalian cells (LLC-MK2) was determined using an MTT assay. Antiparasitic activity was evaluated against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. Cell-death mechanism was determined in epimastigote forms by flow cytometry analysis after FITC-annexin V (Ax), 7-AAD, and H2DCFDA staining. Striking morphological changes were observed by scanning electron microscope.

Results: GaEPL (6.5% yield; 54.6% total carbohydrate; 21.1% uronic acid and 12% protein), inhibited all *T. cruzi* developmental forms, epimastigotes after periods of 24 h ($IC_{50} = 740 \pm 0.075 \mu\text{g/mL}$), 48 h ($IC_{50} = 710 \pm 0.053 \mu\text{g/mL}$) and 72 h ($IC_{50} = 870 \pm 0.052 \mu\text{g/mL}$) of incubation; trypomastigotes ($IC_{50} = 470 \pm 0.082 \mu\text{g/mL}$) after periods of 24 h and intracellular amastigotes ($IC_{50/2} = 235$ or $IC_{50} = 470 \mu\text{g/mL}$) after periods of 24 and 48 h of incubation, with no toxicity on LLC-MK2 cells at the used concentrations. Analysis of the possible action mechanism in the parasites suggested cell death by necrosis with the involvement of reactive oxygen species (ROS). The scanning electron microscopy (SEM) confirmed *T. cruzi* death by necrosis.

Conclusions: GaEPL showed significant activity against the epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, strain Y, suggesting cell death by necrosis with involvement of reactive oxygen species.

1. Introduction

American trypanosomiasis, also called Chagas disease, is considered one of the main public health problems in Latin America, where it causes more than 7000 deaths per year (WHO, 2015). In Brazil, benznidazole (BZ) is the drug of choice to treat the disease, but it has limited therapeutic action and several side effects, which frequently lead to treatment interruption (Cerecetto and González, 2002; Bahia et al., 2012).

Natural plant products are a source of compounds that could be potentially active against protozoa (Croft et al., 2005; Salem and Werbovetz, 2006). Mesquita et al. (2005) identified antileishmanial and antitrypanosomal activities of ethanolic extract of *Caesaria sylvestris* leaves from medicinal plants of the Brazilian Cerrado (tropical savanna ecoregion). A previous study demonstrated that methanolic extracts of plants used in Mexican folk medicine exhibited the highest trypanocidal activity (Molina-Garza et al., 2014).

Genipa americana (Rubiaceae), a plant popularly known as

* Corresponding author.

E-mail addresses: racquel_oliveira2@hotmail.com (R.O.d.S. Souza), martinsalice@gmail.com (A.M.C. Martins).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.042>

Received 23 May 2017; Received in revised form 30 August 2017; Accepted 31 August 2017

Available online 05 September 2017

0378-8741/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

“jenipapo” or “jenipapeiro”, is found in Brazil from Amapá to São Paulo and Mato Grosso states (Corrêa, 1984; Delprete et al., 2005). In Brazil, several medicinal uses have traditionally been attributed to this species. The leaves decoction has been used as antidiarrheal and anti-syphilitic therapy (Corrêa, 1984), whereas the leaves macerated, has been used to treat fever by some native tribes (Delprete et al., 2005). Based on ethnobotanical surveys, the traditional use of this species is for the treatment of cough, anemia, contusions, dislocations; as depurative and associated with popular beliefs (Souza et al., 2013). In addition, the barks decoction (*ad libitum*) is used in the treatment of malaria by indigenous of the Upper Rio Negro in Amazonas (Kffuri et al., 2016).

The phytochemical analysis of *G. americana* leaves extracts revealed the presence of iridoids, mono and sesquiterpenes and of triterpenes and steroids. Therefore, also revealed the presence of hydrolyzable tannis, proanthocyanidins, cinnamic derivatives, phenylpropanoglycosides, geniposidic acid, genipatriol and flavonoids (Guarnaccia et al., 1972; Hossain et al., 2003; Alves et al., 2017; Vasconcelos et al., 2017).

Experimental studies performed with the extracts of leaves from *G. americana* had demonstrated antimalarial activity *in vitro* on *Plasmodium falciparum* and *in vivo* on *Plasmodium berghei* (Deharo et al., 2001), as well as the anti-parasitic and antimicrobial effects (Oliveira et al., 2012; Nogueira et al., 2014; Tallent, 1964).

Although the literature has several studies on extracts and pure compounds obtained from plants with good potential for the trypanocidal action (Paveto et al., 2004; Veiga-Santos et al., 2010), little is known about their mechanism of action. However, experimental reports of the antitypanosomal effect of *Genipa americana* polysaccharide extracts were not found. Thus, this study focuses on evaluation of antitypanosomal activity of polysaccharide extracts from *Genipa americana* leaves on all *Trypanosoma cruzi* developmental forms and the type of cell death that was triggered.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Samples of *G. americana* leaves were collected in nature in the District of Custodio-Quixadá, state of Ceará, Brazil and identified by Ms. Vanecia dos S. Gomes (State University of Ceará). A voucher specimen was deposited at Prisco Bezerra Herbarium (Federal University of Ceará, n. 4683).

2.2. Chemicals

Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Invitrogen (Grand Island, NY, USA). LIT medium (HiMedia Laboratories, Mumbai, IND), DMEM medium (VITROCELL, São Paulo, BR), Catalase (CAT; Sigma-Aldrich, Brazil). Benznidazole (BZ; Lafepe, Brazil), Sodium dodecyl sulfate (SDS - Vetec, São Paulo, Brazil), (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide formazan - MTT) were obtained from Amresco (Ohio, USA), FITC-conjugated to annexin V/7-AAD from BD Pharmingen, California, USA, and H₂DCFDA from Sigma-Aldrich™, St. Louis, USA.

2.3. Extraction of polysaccharides from *Genipa americana* leaves

G. americana leaves were washed with distilled water, dried at 40 °C, grounded into powder (5 g), suspended in methanol (1:50 w/v, 76 °C, 2 h) and the filtered for removal of methanol-soluble material; the procedure repeated twice. The insoluble material was extracted in 0.1 M NaOH (1:50 w/v, 97 °C, the procedure was repeated three times) resulting in alkaline extracts that were pooled (supernatants 2 and 3), neutralized with 1 M HCl, precipitated with 4 volumes of ethanol and centrifuged. The supernatant was dialyzed against running water for 72 h, centrifuged (1445 ×g, 30 min, r.t.) and the final supernatant was lyophilized and named polysaccharide extract of *G. americana* - GaEPL

(Souza et al., 2015).

2.4. Cells and parasites

LLC-MK2 (epithelial cells from the kidney of the monkey *Macaca mulatta*) were maintained in DMEM medium (Vitrocell, São Paulo, Brazil) supplemented with 1% antibiotic solution and 10% of FBS in T-25/75 cm² flasks maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. These cells were split each time they reached 80–90% confluence after being harvested with a solution containing 0.25% trypsin and 2.21 mM EDTA.

The *Trypanosoma cruzi* Y (benznidazole-resistant) strain was isolated in the Laboratory of Parasite Biochemistry, University of São Paulo (São Paulo – Brazil) and donated in epimastigote and trypomastigote forms. Epimastigote forms of *T. cruzi* (Y strain) were maintained at 28 °C with weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) supplemented with 10% FBS. Trypomastigote forms were obtained by infecting LLC-MK2 cell monolayers in DMEM supplemented with 2% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

2.5. *Genipa americana* polysaccharide extract activity assay against *T. cruzi* epimastigote forms

Epimastigote forms of *T. cruzi* (10⁶ cells/mL) were grown in 96-well plates at 28 °C in LIT medium supplemented with 10% FBS, incubated in triplicate in the absence or presence of the GaEPL (9–1500 µg/mL) or the positive control BZ (1.56–200 µg/mL) for 24, 48 and 72 h. Subsequently, parasite growth inhibition was estimated by counting the parasites in a Neubauer chamber, and the concentration that inhibited growth by 50% (IC₅₀) was determined by a nonlinear regression in relation to the reference drug (Camargo, 1964).

2.6. *Genipa americana* polysaccharide extract activity assay against *T. cruzi* trypomastigote forms

Trypomastigote forms (10⁶ cells/mL) were obtained from the supernatant of infected LLC-MK₂ cells that were dispensed into 96-well plates in DMEM medium supplemented with 2% FBS in the absence or presence of different concentrations of GaEPL (9–1500 µg/mL) or BZ (1.56–200 µg/mL), in triplicate. The parasites were incubated for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After incubation, parasite viability was determined by assessing mobility under an Olympus CX31 light microscope. An aliquot (10 µL) of each sample was placed on slides. The slides were cover-slipped and the parasites were counted in a Neubauer chamber, and the concentration that inhibited growth by 50% (IC₅₀) was determined by regression analysis of the data (Adade et al., 2014).

2.7. Cytotoxicity to mammalian cells

LLC-MK₂ cells were assayed for cell viability determination using MTT assay (Mosmann, 1983). A suspension of 10⁵ cells was seeded in a 96-well microplate and maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h to obtain confluent cell monolayers. Subsequently, the medium was removed, and the monolayers were then treated with different concentrations of GaEPL (9–3000 µg/mL), BZ (1.56–200 µg/mL) or phosphate-buffered saline (PBS) in triplicates for 24 h. After the treatment, 100 µL of the culture medium were removed and 10 µL of MTT (Amresco, Ohio, USA; 5 mg/mL) solution was added. The microplate was incubated for 4 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, and 90 µL of 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) was added. After 17 h of incubation, absorbance was read at 570 nm on a microplate reader (Biochrom® Asys Expert Plus). The percentage of viable cells was calculated by comparison with controls. The IC₅₀ was determined by regression analysis of the data. The Selectivity index (SI) was calculated by the ratio of cytotoxic/trypanocidal activity (Nwaka and Hudson, 2006).

2.8. *Genipa americana* polysaccharide extract activity assay against *T. cruzi* amastigote forms

LLC-MK2 cells were seeded in 24-well plates containing glass coverslips (13-mm diameter) cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics, at 37 °C, in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h. Subsequently, the media was removed from the wells and LLC-MK2 cells were infected with trypomastigote forms (parasite: host-cell ratio of 20:1) in DMEM medium containing 2% FBS. After 48 h of interaction, the microplate was washed with PBS to remove the non-intercalized parasites and treated with GaEPL (235 and 470 µg/mL), BZ (67 and 134 µg/mL) or PBS. After incubation for 24 or 48 h at 37 °C, the coverslips were collected, washed with PBS, fixed in Bouin's solution, and stained with Giemsa (Lima et al., 2016). The percentage of infected cells and the number of intracellular amastigotes per 100 cells was determined by counting 300 cells in triplicate under an Olympus light microscope CX 31.

2.9. *T. cruzi* epimastigote death pathway assays induced by the *Genipa americana* polysaccharide extract

Flow cytometry experiments were performed in a FACSCalibur system and analyzed using the Cell Quest software (Becton-Dickinson, California, USA). A total of 10.000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to *T. cruzi* epimastigote forms. The results were established by determining the fold change (treated/non-treated cell ratio) of the geometric mean of fluorescence. At the end of each incubation period, the cells were washed and submitted to cytometry flow analysis to evaluate the pathways by which GaEPL induces *T. cruzi* death.

Epimastigote forms (10⁶ cell/mL) were incubated for 24 h at 37 °C in the absence or presence of GaEPL (740 µg/mL). After incubation, the parasites were washed and stained with FITC-annexin V (Ax) and/or 7-AAD, according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, California, USA). Reactive oxygen species (ROS) were also determined. Epimastigotes were treated with GaEPL (740 µg/mL) and 3 h after they were loaded with 20 mMol/L of the cell-permeable probe H2DCFDA in the dark for 24 h, and measured as an increase in fluorescence caused by the conversion of nonfluorescent dye to highly fluorescent 2',7' dichlorofluorescein, according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich™, St. Louis, USA). Epimastigotes without GaEPL treatment were used as controls and experiments were carried out in triplicate.

2.10. *T. cruzi* epimastigote morphological changes induced by the *Genipa americana* polysaccharide extract

Epimastigotes forms were treated with GaEPL for 24 h [IC₅₀/2 (370 µg/mL) and IC₅₀ (740 µg/mL)]. After incubation, the parasites were washed with PBS and fixed for 2 h with 2.5% glutaraldehyde solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania). After fixation for 2 h at room temperature, parasites were washed with PBS,

and then dehydrated with ethanol. Subsequently, samples were dried with CO₂, coated with gold, and observed in a FEG Quanta 450 scanning electron microscope (FEI, Oregon, USA). Digital images were acquired and stored in a computer (Lima et al., 2016).

2.11. Evaluation of the involvement of peroxyde hydrogen on *Genipa americana* polysaccharide extract tripanocidal effect

Epimastigote forms of *T. cruzi* (10⁶ cells/mL) were cultivated as described above and treated with GaEPL for 24 h [IC₅₀ (740 µg/mL)] in the absence or presence of catalase (25 µg/mL). Afterward, parasite growth inhibition was quantified in a Neubauer chamber (Guo et al., 2015, with modifications).

2.12. Statistical analyses

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean ± S.E.M. and analyzed by ANOVA and Bonferroni test. Differences were considered for *p* values less than 0.05.

3. Results

The extraction of polysaccharides from *G. americana* leaves showed a total yield of 6.5%, revealing high content of carbohydrate (54.6%, including 21.1% uronic acid) and 12% protein.

The GaEPL exhibited trypanocidal activities for all developmental forms of the parasites. GaEPL inhibited growth of the epimastigote with an IC₅₀ at 24, 48 and 72 h of 740 ± 0.075, 710 ± 0.053, 870 ± 0.052 µg/mL, respectively, while BZ exhibited an IC₅₀ at 24, 48 and 72 h of 56.76 ± 1, 15.91 ± 3, 16.5 ± 1 µg/mL, respectively. For the trypomastigote forms, GaEPL showed an IC₅₀ of 470 ± 0.082 µg/mL, while the BZ positive control showed IC₅₀ of 67 ± 20 µg/mL. Next, the cytotoxicity of GaEPL was determined in LLC-MK2 cells with different concentrations using the MTT assay. GaEPL reduced LLC-MK2 viability with an IC₅₀ of 2250 ± 0.071 µg/mL and SI of 4.8 for trypomastigotes, showing good selectivity for these infective forms (Table 1).

In addition, GaEPL was also tested against *T. cruzi* amastigote forms after LLC-MK2 cell infection with the trypomastigotes. GaEPL reduced the percentage of infected cells at 24 and 48 h. Untreated cells showed approximately 79% of infected cells in 24 h and 70% in 48 h. Cells treated with 235 or 470 µg/mL of GaEPL showed 49% and 46% reduction of infected cells in 24 h; and 44% and 53% in 48 h, respectively. GaEPL (235 and 470 µg/mL) was also assessed in amastigotes/100 LLC-MK2 cells, showing inhibition in 24 and 48 h, as well as BZ, with 67 and 134 µg/mL (Fig. 1). In the light microscopy analysis, it was observed that the GaEPL significantly decreased cell infectivity at both concentrations and periods studied (Fig. 2).

After the observation of GaEPL toxicity to *T. cruzi*, the parasite death mechanism was investigated. *T. cruzi* epimastigotes treatment with GaEPL at 740 µg/mL (IC₅₀) for 24 h resulted in an increase in 7AAD +/AX- labelled cell populations when compared to non-treated cells.

Table 1

Antiparasitic activity of *G. americana* polysaccharide extract on the extracellular forms of *T. cruzi* and host cell cytotoxicity.

	Epimastigote (<i>T. cruzi</i>)		Trypomastigote (<i>T. cruzi</i>)		LLC-MK ₂		SI	
	GaEPL IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	BZ IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	GaEPL IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	BZ IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	GaEPL IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	BZ IC ₅₀ ± S.D (µg/mL)	GaEPL	BZ
24 h	740 ± 0.075	56.76 ± 15	470 ± 0.082	67 ± 20	2250 ± 0.071	160 ± 75.09	4.8	33.6
48 h	710 ± 0.053	15.91 ± 3	–	–	–	–	–	–
72 h	870 ± 0.052	16.5 ± 1	–	–	–	–	–	–

GaEPL = polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves.

BZ = benzimidazole, IC₅₀ = Inhibitory concentration at 50%. SD = Standard deviation. SI = Selective index. Values are shown as means ± SD of three independent experiments performed in triplicate.

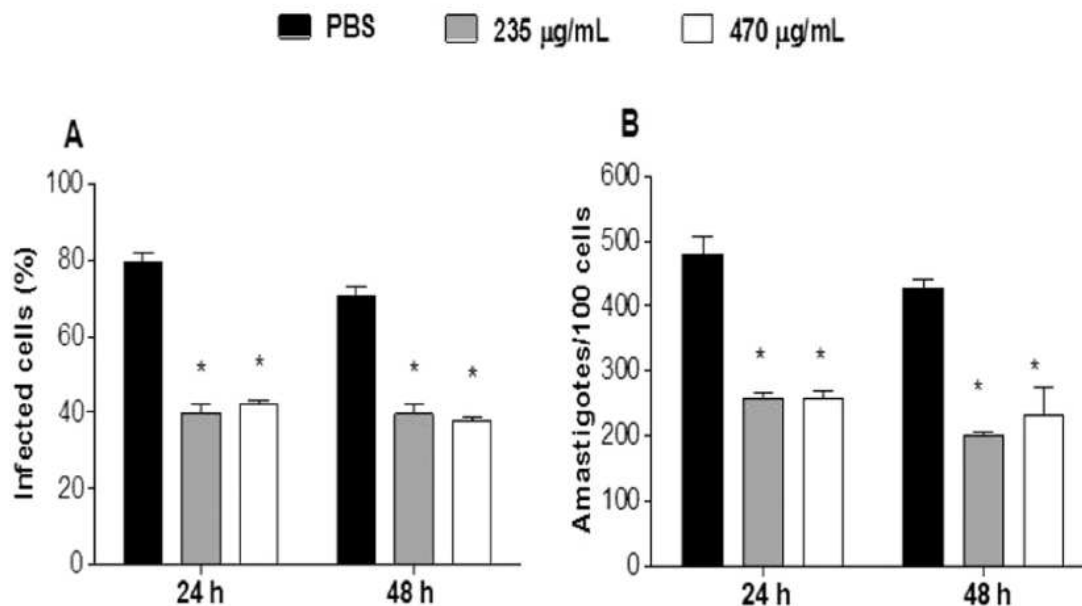


Fig. 1. GaEPL inhibited amastigote proliferation in *T. cruzi*-infected LLCMK2. Cells were infected with Y strain trypomastigotes for 24 and 48 h and treated with 235 or 470 µg/mL of GaEPL, fixed in Bouin's solution and stained with Giemsa and analyzed by optical microscopy. The percentage of infected cells (A) and the relative number of amastigote forms per 100 cells (B). Mean \pm S.E.M of at least three independent experiments. ANOVA and Bonferroni test, * $p < 0.001$, compared to PBS.

These results suggest that *T. cruzi* death occur predominantly by necrosis (Fig. 3A-C). In addition, it evaluated the production of reactive oxygen species (ROS) in epimastigote forms treated with GaEPL at 740 µg/mL (Fig. 4). The results showed a significant increase in total ROS production after 24 h of treatment.

Morphological changes induced by GaEPL in epimastigotes are shown in Fig. 5. Scanning electron microscopy (SEM) images with epimastigotes treated for 24 h with GaEPL (370 and 740 µg/mL) showed changes in body shape, with rounding and shortening of the parasite and apparent leakage of cytoplasmic contents, and cell membrane degradation with pores (Fig. 5B-C). These data are typical evidence of necrosis, confirming the flow cytometry data.

In order to determine the involvement of peroxide hydrogen on GaEPL effect, epimastigotes treated with GaEPL (IC_{50}) or GaEPL (IC_{50}) + CAT shows no significant differences (Table 2). These data suggest

that the effect of GaEPL is not related to the production of peroxide hydrogen.

4. Discussion

The extraction of crude polysaccharides from *G. americana* leaves revealed satisfactory yield and present high carbohydrate content (including uronic acid) and lower protein. These findings agree with the data found for the polysaccharide extracts and fractions obtained from the leaves of this plant (data in publication) and other polysaccharide extracts from plants using the same extraction protocols (Souza et al., 2015; Pereira et al., 2012, 2016).

Extraction of polysaccharides from *G. americana* leaves showed a total yield similar to those described for *Geoffroea spinosa* bark (Souza et al., 2015). Chemical analysis of polysaccharides from *G. americana*

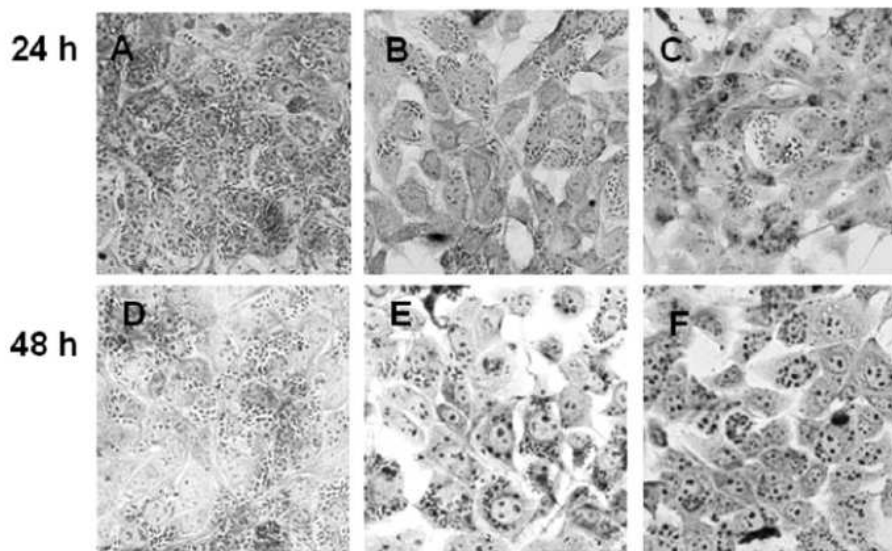


Fig. 2. Light microscopy of *Trypanosoma cruzi*-infected LLCMK2 cells treated with GaEPL for 24 (A, B, C) and 48 h (D, E, F) at 37 °C. A – Untreated cells showed high level of infection with intracellular amastigotes; B – Cells treated with 235 µg/mL of GaEPL; C – Cells treated with 470 µg/mL of GaEPL; D – Untreated cells showed high level of infection with intracellular amastigotes; E – Cells treated with 235 µg/mL of GaEPL; F – Cells treated with 470 µg/mL of GaEPL.

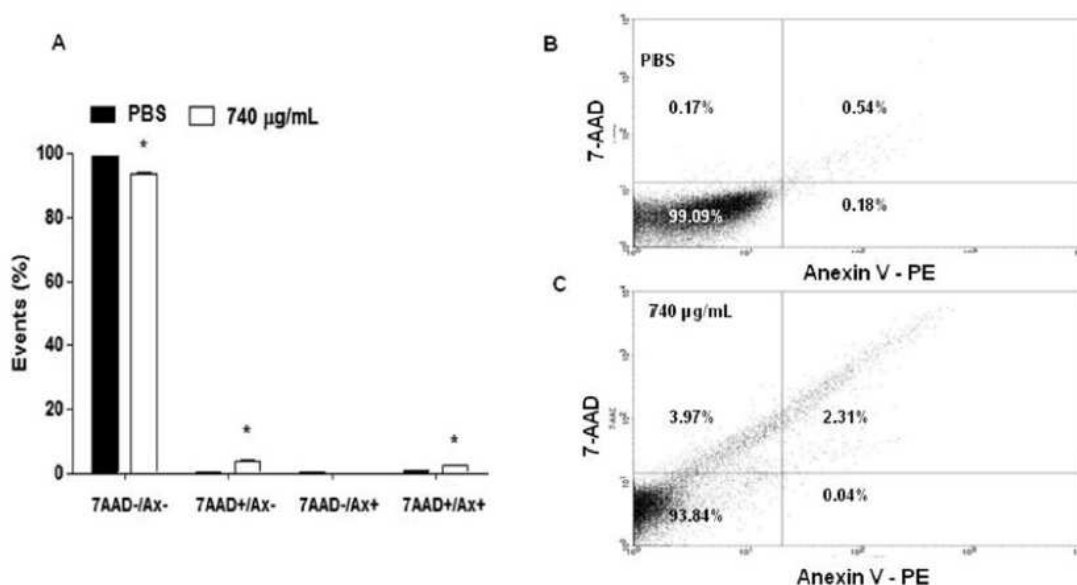


Fig. 3. Flow cytometry analysis of epimastigotes treated with GaEPL. (A) The decreased the percentage of 7AAD/Ax fluorescence in epimastigote forms of *T. cruzi* treated with 740 µg/mL of GaEPL for 24 h. (B) Untreated epimastigotes. (C) Epimastigotes treated with 740 µg/mL of GaEPL. Mean \pm S.E.M of at least three independent experiments. ANOVA and Bonferroni test, * $p < 0.001$, compared to PBS.

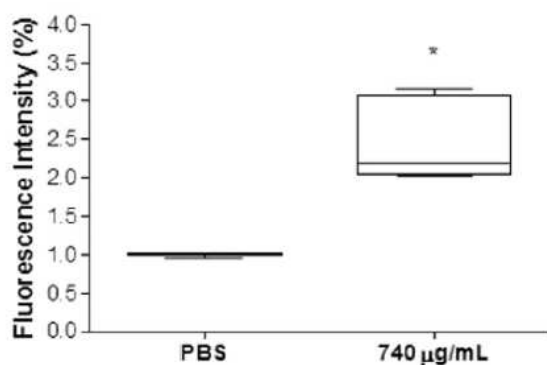


Fig. 4. Total ROS production in *T. cruzi* epimastigotes treated with 740 µg/mL of GaEPL for 24 h and stained with the cell-permeable probe H_2DCFDA staining, with flow cytometry analysis. Mean \pm S.E.M of at least three independent experiments. ANOVA and Bonferroni test, * $p < 0.05$, compared to PBS.

leaves showed a high content of carbohydrates (54.6%), with a minor protein content (12%). The carbohydrate and protein contents were similar to those described for *G. spinosa* bark (62% and 9%), *Azadirachta indica* seed tegument (54% and 4%) and *Caesalpinia ferrea* pods

Table 2

Evaluation of the involvement of hydrogen peroxide on epimastigote forms of *T. cruzi* in the effect of *G. americana* polysaccharide extract.

	% cell viability
Control	100 \pm 5.2
Catalase (25 µg/mL)	90 \pm 5.1
GaEPL (IC ₅₀ – 740 µg/mL)	44.4 \pm 4.4*
GaEPL + CAT	34.2 \pm 2.9*

GaEPL = polysaccharide extract from *Genipa americana* leaves.

CAT = Catalase.

IC₅₀ = Inhibitory concentration at 50%. Values are shown as means \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from the control group (One-way analysis of variance and Bonferroni post-test, * $p < 0.05$).

(44% and 6%) (Souza et al., 2015; Pereira et al., 2012, 2016).

Studies have been establishing a correlation between the presence of iridoids (genipinic and genipic acids) and the biological activities, such as antimicrobial, antifungal and antiparasitic (Tallent, 1964). *In vitro* toxicity study using the extract of *G. americana* fruits, extracted with acetone, demonstrated the ability of the extract to promote the inhibition of the cellular proliferation of HepG2 (hepatocellular carcinoma of the human liver) with dose-dependent activity (Finco et al.,

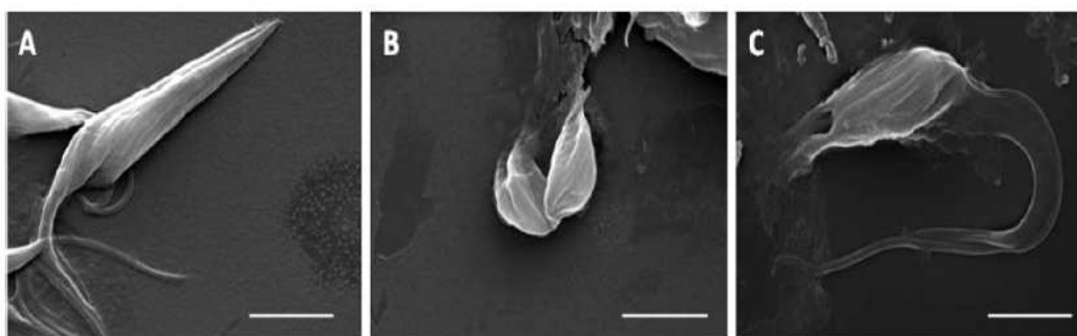


Fig. 5. Scanning electron microscopy of *T. cruzi*. The images show control epimastigotes (A) and epimastigotes treated with 370 µg/mL (B) and 740 µg/mL (C) of GaEPL. Scale bar = 3 µm.

2013). Similarly, the ethanolic extract of the leaves of *G. americana* promoted an inhibitory effect on the cell cycle (Fernandez et al., 2011).

Several plant polysaccharides have been described with *in vitro* and *in vivo* immunostimulating activity (Luetting et al., 1989; Tomoda et al., 1994). A novel cytotoxic proteoglycan, structurally related to arabinogalactan-protein, from the corn of saffron plant (*Crocus sativus* L.) showed a certain level of apoptosis in macrophages culture with non-cytotoxic concentration resulting in an increase in DNA laddering, characteristic of apoptotic cells (Escribano et al., 1999). This correlation and the high carbohydrate content associated with protein would also be linked to associated the anti-parasitic activity demonstrated in our study.

Our results show that polysaccharides extracted from *Genipa americana* leaves have an anti-parasitic effect against the epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. The leaves of *G. americana* are used in traditional Medicine to treat diarrhea, syphilis and fever (Côrrea, 1984; Delprete et al., 2005). Additionally, the anti-parasitic and antimicrobial effects had been already experimentally demonstrated for the leaves (Oliveira et al., 2012; Deharo et al., 2001; Nogueira et al., 2014; Tallent, 1964), and our present results are in accordance with the use of *G. americana* for treatment of parasitic and bacterial infections.

Other plant extracts also showed trypanocidal activities. The aqueous extract from *Neurolaena lobata* leaves demonstrated an effect against epimastigote forms of *T. cruzi* after incubation for 48 h at 550 µg/mL (Berger et al., 1998) and eighteen out of 43 crude methanolic extracts showed trypanocidal activity against epimastigote forms at 2000 µg/mL after incubation for 2 h, while thirteen showed trypanocidal activity even at 1000 µg/mL after incubation for 48 h (Abe et al., 2002). The ethanolic extract from *Guazuma ulmifolia* leaves showed 63.86% inhibited on epimastigote growth at a concentration of 1000 µg/mL for 72 h (Calixto Júnior et al., 2016). In this study, we showed that GaEPL significantly inhibited the growth of epimastigotes (24, 48 and 72 h) at concentrations lower than 1000 µg/mL.

The trypanocidal activity of crude extracts from *Ampelozizyphus amazonicus* leaves demonstrated parasite lysis at a concentration of 500 µg/mL in the trypomastigote forms (Rosas et al., 2006). On the contrary, the extracts of leaf rinse and branch extract of *Baccharis dracunculifolia* showed total lysis of the trypomastigote form at a concentration of 3000 µg/mL, while the root extract was barely active, showing only 37.3% of lysis of trypomastigote forms (da Silva Filho et al., 2004). Thus, our data demonstrated that GaEPL were most effective against trypomastigote forms in comparison to those extracts.

Natural plant products are an alternative source of drugs to fight *T. cruzi* infection, some of which exhibit trypanocidal activity and lower toxicity (Luize et al., 2005; Silsen et al., 2006; Rojas et al., 2010). In this study, GaEPL showed low toxicity against LLC-MK2 cells, being more toxic to the protozoa than to the mammalian cells. Considering the LC₅₀ concentrations against the trypomastigotes, GaEPL SI was 4.8, demonstrating to be 2.08 times higher than that of BZ, the drug currently used to treat Chagas disease, showing that GaEPL has good selectivity against the *T. cruzi* Y strain. Moreover, methanolic extracts of the medicinal plants found in Saudi Arabia and Yemen exhibited anti-trypanosomal activity with SI < 4 (Mothana et al., 2014).

A previous study demonstrated the cytotoxicity activity of crude extracts of several plant species against epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi* (Mafezoli et al., 2000; Pizzolatti et al., 2002; Molina-Garza et al., 2014; Meira et al., 2015). In the present study, GaEPL showed potent activity against the amastigote forms it is suggested that the GaEPL has to cross the host cell membrane in the order to gain access to the intracellular parasite, whereas the extracellular trypomastigote is directly exposed to the extract.

To identify the mechanism of cell death induced by GaEPL treatment, analyses of the classical necrosis/apoptosis processes were performed. In this study, GaEPL treatment caused an increase in the fluorescence intensity of 7AAD+/Ax- and 7AAD+/Ax+, indicating

alteration of cell membrane integrity, suggestive of cell death by necrosis.

Natural products exhibit their trypanocidal activity by interfering with the redox balance of the parasites, acting either on the respiratory chain or on the cell defenses against oxidative stress (Atawodi et al., 2003). This occurs because natural products have structures capable of generating radicals that may cause peroxidative damage to trypanothione reductase, which is very sensitive to alterations in redox balance (Atawodi et al., 2003). Our results demonstrated that GaEPL induces ROS production, suggesting the involvement of these molecules in the trypanocidal effects.

The morphological changes observed at electron microscopy such as body shape, with rounding and shortening of the parasite and apparent leakage of cytoplasmic contents, of cell membrane degradation with pores, in addition to the flow cytometry results, suggest that GaEPL causes necrotic cell death in *T. cruzi*.

The main contribution of this study was the demonstration of the effect of polysaccharide extract obtained from *G. americana* leaves as a rich source of natural antiparasitic product against *T. cruzi*.

5. Conclusions

The polysaccharide extract of *G. americana* showed significant activity against the epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, strain Y (benznidazole-resistant), suggesting cell death by necrosis with involvement of reactive oxygen species. Therefore, GaEPL can be a rich source of natural products against Chagas' disease.

Acknowledgements

The authors are grateful to Ms. Vanecia dos S. Gomes, who identified the plant species and Profa. Julia Manso Alves for the donation of cells and parasites (IQ-USP). This research was funded by Brazilian grants from CNPq and CAPES. We also thank Analytic Center - UFC/CT - INFRA/Pro and CAPES Equipment.

References

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., 2002. Trypanocidal constituents in plants. 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1118–1191.
- Adade, C.M., Carvalho, A.L., Tomaz, M.A., Costa, T.F., Godinho, J.L., Melo, P.A., Lima, A.P.C.A., Rodrigues, J.C.F., Zingali, R.B., Souto-Pádon, T., 2014. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3252.
- Alves, J.S.F., de Medeiros, L.A., Fernandez-Pedrosa, M.F., Araújo, R.M., Zucolotto, S.M., 2017. Iridoids from leaf extract of *Genipa americana*. *Rev. Bras. Farmacogn.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.03.006>.
- Atawodi, S.E., Bulus, T., Ibrahim, S., Ameh, D.A., Nok, A.J., Mamman, M., Galadima, M., 2003. In vitro trypanocidal effects of methanolic extracts of some Nigeria savannah plants. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 317–321.
- Bahia, T.M., Andrade, L.M., Martins, T.A.F., Nascimento, A.F.S., Diniz, L.F., Caldas, L.S., Talvani, A., Trunz, B.B., Torrele, E., Ribeiro, I., 2012. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1870.
- Berger, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter, C.M., Kubelka, W., 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 62, 107–115.
- Calixto Júnior, J.T., de Moraes, S.M., Gomez, C.V., Molas, C.C., Rolon, M., Boligon, A.A., Athayde, M.L., de Moraes Oliveira, C.D., Tintino, S.R., Henrique Douglas, M.C., 2016. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast "Cerrado". *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 434–440.
- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6, 93–100.
- Cerecetto, H., González, M., 2002. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 1187–1213.
- Corrêa, P.M., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. IBDF, Rio de Janeiro.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 21, 508–512.
- da Silva Filho, A.A., Pires Bueno, P.C., Gregório, L.E., Andrade e Silva, M.L., Albuquerque, S., Bastos, J.K., 2004. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and

- isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1195–1199.
- Delprete, P.G., Smith, L.B., Klein, R.M., 2005. *Flora Ilustrada Catarinense: Rubiaceas*. *Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí*.
- Deharo, E., Bourdy, G., Quenevo, C., Muñoz, V., Ruiz, G., Sauvain, M., 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J. Ethnopharmacol.* 77, 91–98.
- Escribano, J., Rios, I., Fernández, J.A., 1999. Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 217–222.
- Fernandez, V., Franco de Diana, D., Fernández, D., Vega Gómez, M.C., Segovia Abreu, J., Castiglioni, D., Sales, L., Martínez, M., López, D., Bobadilla, N., Alfonso, J., Mojoli Le Quenne, A., Monges, D., Vera, M., 2011. Efecto antimitótico y citotóxico del extracto etanólico de *Genipa americana* L. sobre tejido meristemático de *Allium cepa* L. y cultivo celular NCTC-929. *Steviana* 3, 48–53.
- Finco, F.D.B.A., Böser, S., Graeve, L., 2013. Antiproliferative activity of Bacaba (*Oenocarpus bacaba*) and Jenipapo (*Genipa americana* L.) phenolic extracts: a comparison of assays. *Nutr. Food Sci.* 43, 98–106.
- Guarnaccia, R., Madyastha, K.M., Tegtmeyer, E., Coscia, C.J., 1972. Geniposidic acid, an iridoid glucoside from *Genipa americana*. *Tetrahedron Lett.* 50, 5125–5127.
- Guo, C., Liu, S., Dong, P., Zhao, D., Wang, C., Tao, Z., Sun, M.Z., 2015. Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H2O2 via TGF- β signal pathway. *Sci. Rep.* 5, 1–14.
- Hossain, C.F., Jacob, M.R., Clark, A.M., Walker, L.A., Nagle, D.G., 2003. Genipatriol, a new cycloartane triterpene from *Genipa spruceana*. *J. Nat. Prod.* 66, 398–400.
- Kffuri, C.W., Lopes, M.A., Ming, L.C., Odonne, G., Kimupp, V.F., 2016. Antimalarial plants used by indigenous people of the Upper Rio Negro in Amazonas, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 178, 188–198.
- Lima, D.B., Sousa, P.L., Torres, A.F., Rodrigues, K.A., Mello, C.P., Menezes, R.R., Tassarolo, L.D., Quinet, Y.P., de Oliveira, M.R., Martins, A.M., 2016. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadricipes* giant ant venom. *Toxicon* 120, 128–132.
- Luetting, B., Steinmüller, C., Gifford, G.E., Wagner, H., Lohmann-Matthes, M.L., J., 1989. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *Natl. Cancer Inst.* 81, 669–675.
- Luize, P.S., Shioji-Tiومان, T., Morello, L.G., Korehiza Maza, P., 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41, 85–94.
- Mafezoli, J., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., da Silva, M.F.G.F., de Albuquerque, S., 2000. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 73, 335–340.
- Meira, C.S., Guimarães, E.T., Santos, J.A.F., Moreira, D.R.M., Nogueira, R.C., Tomassini, T.C.B., Ribeiro, I.M., Souza, C.V.C., Santos, R.R., Soares, M.B.P., 2015. In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine* 22, 969–974.
- Mesquita, M.L., Desrivot, J., Bories, C., Fournet, A., Paula, J.E., Grellier, P., Espindola, L.S., 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 783–787.
- Molina-Garza, Z.J., Bazaldua-Rodriguez, A.F., Quintanilla-Licea, Galaviz-Silva, L., 2014. Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Trop.* 136, 14–18.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mothana, R.A., Al-Musayeb, N.M., Al-Ajmi, M.F., Cos, P., Maes, L., 2014. Evaluation of the in vitro antiparasitic activity of medicinal plants uses in Saudi and Yemeni traditional medicine. *Evid. Based Complement. Altern. Med. eCAM* 2014, 905639.
- Nogueira, F.A., Nery, P.S., Moraes-Costa, F., Oliveira, N.J.F., Martins, E.R., Duarte, E.R., 2014. Efficacy of aqueous extracts of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) in inhibiting larval development and eclosion of gastrointestinal nematodes of sheep. *J. Appl. Anim. Res.* 42, 356–360.
- Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 941–955.
- Oliveira, L.D.R., Miranda, J.P.H.V., Curado, G.S., Costa Neto, J.P., Santos, B.F., Barros, E.E.L., Louvandini, H., Melo, F.R., 2012. *Haemonchus contortus*: in vivo anthelmintic activity of *Genipa americana* L. leaves in sheep. *Planta Med.* 78, 420.
- Paveto, C., Güida, M.C., Esteve, M.L., Martino, V., Cousio, J., Flawiá, M.M., Torres, H.N., 2004. Anti-Trypanosoma cruzi activity of green tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 69–74.
- Pereim, L.P., Silva, R.O., Bringel, P.H.S.F., Silva, K.E.S., Assrey, A.M.S., Pereira, M.G., 2012. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. *J. Ethnopharmacol.* 139, 642–648.
- Pereira, L.P., Mota, M.R.L., Brizeno, L.A.C., Nogueira, F.C., Ferreira, E.G.M., Pereira, M.G., Assrey, A.M.S., 2016. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . *J. Ethnopharmacol.* 187, 213–223.
- Pizzolatti, M.G., Koga, A.H., Grisard, E.C., Steindel, M., 2002. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine* 9, 422–426.
- Rojas, J., Solís, H., Palacios, O., 2010. Evaluación in vitro de la actividad anti trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *Anal. Fac. Med.* 71, 161–165.
- Rosas, L.V., Cordeiro, M.S.C., Campos, F.R., Nascimento, S.K.R., Januário Salem, M.M., Werbovetz, K.A., 2006. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 13, 2571–2598.
- Salem, M.M., Werbovetz, K.A., 2006. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 13, 2571–2598.
- Souza, R.O.S., Assrey, A.M.S., Madeira, J.C., Chagas, F.D.S., Parreiras, L.A., Santos, G.R.C., Mourão, P.A.S., Pereim, M.G., 2015. Purified polysaccharides of *Geoffrea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. *Carbohydr. Polym.* 124, 208–215.
- Souza, R.K.D., Mendonça, A.C.A.M., Silva, M.A.P., 2013. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects Rubiaceae species in Brazil. *Rev. Cuba. Plant.* 18, 140–156.
- Sülzen, V., Güida, C., Cousio, J., Paveto, C., Muschietti, L., Martino, V., 2006. In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol. Res.* 98, 370–374.
- Tallent, W.H., 1964. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. *Tetrahedron* 20, 1781–1787.
- Tomoda, M., Miyamoto, H., Shimizu, N., Gonda, R., Ohara, N., 1994. Two acidic polysaccharides having reticuloendothelial system-potentiating activity from the raw root of *Rehmannia glutinosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1456–1459.
- Vasconcelos, A.L., Santos, A.V., Padilha, R.J.R., Alves, L.C., Randau, K.P., 2017. Anatomical characterization of ultra-structures, biominerals and histolocalization of metabolites in leaves of *Genipa americana*. *Rev. Bras. Farmacogn.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjrp.2017.05.002>.
- Veiga-Santos, P., Pelizzaro-Rocha, K.J., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Silva, S.O., Sudatti, D.B., Bianco, E.M., Pereira, R.C., Nakamura, C.V., 2010. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology* 137, 1661–1670.
- WHO/Department of control of neglected tropical diseases, 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases. In: Chairman, P.H. (Ed.) World Health Organization's Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/.