

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Perfil tripanocida de lignanas dibenzilbutirolactônicas:
avaliação das propriedades terapêuticas *in vivo* nas fases
aguda e crônica da doença de Chagas experimental**

Viviane Rodrigues Esperandim

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientado (a): Viviane Rodrigues
Esperandim

Orientador (a): Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Esperandim, Viviane Rodrigues

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

67.: il.;30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia. Orientador: Albuquerque, Sérgio.

1. Doença de Chagas. 2. Fases aguda e crônica, 3. Cubebina, 4. Hinoquinina.

Viviane Rodrigues Esperandim

Perfil tripanocida de lignanas dibenzilbutirolactônicas: avaliação das propriedades terapêuticas in vivo nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Sérgio de Albuquerque

Aprovado em: / /

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar.
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim,
vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
do que ficou, vou me lembrar
e realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar.
Vou persistir, continuar a esperar e crer
e mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
mas na alma, há certeza da vitória.*

Dedico este trabalho.....

À minha família,

meu pai Antônio e minha mãe Maria do Carmo. Minhas irmãs Geisa e Tábata.

Agradeço à vocês por tudo que fizeram e ainda tem feito por mim. Agradeço por estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões. Minha eterna gratidão.

Ao meu marido Gustavo,

pela paciência e compreensão durante estes anos. Muito obrigada!

Ao meu filho Pedro,

por estar fazendo parte da minha vida agora, trazendo muita felicidade para mim e nossa família. Amo você!

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pela orientação, ensinamentos, confiança e apoio.

À minha amiga Daniele da Silva Ferreira, por estar sempre me ajudando.

À Juliana Saraiva, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, Toninha, Georgius e Miriam, que sempre estiveram dispostos a ajudar e ensinar em todos os momentos.

A todos os pós-graduandos do Laboratório de Parasitologia.

Aos funcionários da Universidade de Franca, Martinha, Maria Helena e José Luis que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos docentes da parasitologia da FCFRP-USP, Ana Amélia Carraro Abrahão e José Clovis do Prado Júnior por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao Prof. Márcio L. A. e Silva do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e tecnológicas da Universidade de Franca pela síntese das substâncias.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários da pós-graduação da FCFRP-USP.

*A toda minha **família**, por todo carinho, apoio e estímulo.*

*A **Deus**, que iluminou meus caminhos e me ajudou a vencer mais uma etapa em minha vida.*

*À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP**, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.*

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

ESPERANDIM, V. R. **Perfil tripanocida de lignanas dibenzilbutirolactônicas: avaliação das propriedades terapêuticas *in vivo* nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental.** 2010. 67p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.

A doença de Chagas, transmitida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 18 milhões de pessoas na América Latina e mesmo tendo sido descrita há 100 anos por Carlos Chagas, esta ainda representa um importante problema de saúde pública, sendo encontrados casos em 18 países em desenvolvimento na América do Sul e Central. No Brasil, o benzonidazol, (ROCHAGAN), é a única droga de atividade tripanocida disponível no mercado mesmo apresentando vários efeitos colaterais e limitada eficácia na fase crônica da infecção. Em vista da necessidade de novas substâncias com atividade biológica sobre *T. cruzi*, o interesse pela pesquisa vem crescendo com o intuito de se obter compostos capazes de atuarem sobre o parasita, desprovidos dos graves efeitos colaterais. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório envolvendo lignanas demonstraram uma importante atividade destes compostos sobre as formas tripomastigotas sanguíneas. Assim este estudo tem como objetivo avaliar a atividade terapêutica de derivados de lignana dibenzilbutirolactônicas em sistema *in vivo*, em fase aguda e crônica da infecção por *T. cruzi*. Como critérios de estudo avaliamos o comportamento parasitêmico dos animais na fase aguda, quantificamos a enzima β -galactosidase nos tecidos do fígado, baço e coração além da análise morfométrica dos tecidos. Com relação à parasitemia, dos animais na fase aguda, as substâncias cubebina e hinoquina, apresentaram significativa redução parasitêmica comparado ao controle negativo e melhor atividade no

tratamento pela via oral. Na análise por caracterização de β -galactosidase, as substâncias apresentaram melhores resultados comparados ao controle positivo (Benzonidazol) e também melhor eficácia da resposta para o tratamento pela via oral. Nos resultados apresentados pela cariometria os grupos de tratamento com as substâncias cubebina e hinoquinina apresentaram valores próximos ao controle não infectado, mostrando que ocorreu uma resposta celular positiva comparado ao controle infectado.

Palavras chave: Doença de Chagas, fases aguda e crônica, cubebina, hinoquinina.

ABSTRACT

ESPERANDIM, V.R. **Trypanocidal profile of dibenzylbutyrolactone lignans: evaluation of therapeutic properties in vivo, in acute and chronic experimental Chagas' disease.** 2010. 67p. Thesis (Doctorial). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.

Chagas disease, transmitted by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects over 18 million people in Latin America. Even though it was described 100 years ago by Carlos Chagas, it still represents a major public health problem, and there are cases in 18 developing countries located in Central and South America. In Brazil, benznidazole (Rochagan) is the only trypanocidal drug available in the market; however, it has several side effects and limited efficacy in the chronic phase of the infection. In view of the need for new substances with biological activity against *T. cruzi*, there is growing interest in the search for compounds capable of acting on the parasite, but are devoid of serious side effects. Studies involving lignans developed in our laboratory have shown that these compounds are significantly active against bloodstream trypomastigotes. So this study aims to evaluate the therapeutic activity of derivatives of dibenzylbutyrolactone lignans *in vivo*, in the acute and chronic infection by *T. cruzi*. The present study examined the degree of parasitemia in the infected animals during the acute phase of the disease. To this end, the enzyme β -galactosidase was measured in the tissues from the liver, spleen, and heart of infected animals, in addition to the morphometric analysis of these tissues. Cubebin and hinokinin led to significant reduction in parasitemia compared to the negative control, and better treatment was accomplished by the oral route. Concerning β -galactosidase analysis, cubebin and hinokinin furnished better results compared to the positive control (Benznidazole), the most effective response to treatment being also achieved by oral route. Karyometry also

revealed that cubebin and hinokinin were effective, giving values close to those obtained with the uninfected control, thereby showing that there was a positive cellular response.

Key words: Chagas disease, acute and chronic, cubebin, hinokinin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química das substâncias cubebina e hinoquinina.....	11
Figura 2.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente por via oral com hinoquinina e cubebina na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias.....	23
Figura 3.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente por via oral com cubebina e hinoquinina na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias.....	24
Figura 4.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente por via intraperitoneal com hinoquinina e cubebina na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias.....	27
Figura 5.	Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados diariamente por via intraperitoneal com cubebina e hinoquinina na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias.....	29
Figura 6.	Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no fígado de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratados	

intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 36

Figura 7. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no fígado de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 37

Figura 8. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no baço de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 38

Figura 9. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no baço de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 39

Figura 10. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no coração de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 40

Figura 11. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no coração de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados oralmente comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; clone B5 da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i>	26
Tabela 2-	Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados intraperitonealmente comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; clone B5 da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i>	31
Tabela 3-	Parâmetros nucleares do baço de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	44
Tabela 4-	Parâmetros nucleares do coração de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	46
Tabela 5-	Parâmetros nucleares do fígado de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	48
Tabela 6-	Parâmetros nucleares do baço de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	51
Tabela 7-	Parâmetros nucleares do coração de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	53

Tabela 8- Parâmetros nucleares do fígado de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (teste de Tukey).....	55
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BZ	Benzonidazol
Cub	Cubebina
CPRG	Chlorophenol red b-D-galactopyranoside,
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Coeficiente de inibição de 50% dos parasitas
IP	Intraperitoneal
Hin	Hinoquinina

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	1
1.2 – Substâncias utilizadas no controle da doença de Chagas.....	5
1.3 –Lignanas dibenzilbutirolactônicas.....	7
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Substâncias avaliadas.....	11
3.2. Parasitas.....	11
3.3. Ensaio Biológico sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.3.1. Avaliação da fase aguda.....	12
3.3.1.1. Animais utilizados.....	12
3.3.1.2. Grupos experimentais.....	13
3.3.2. Avaliação da fase crônica.....	15
3.3.2.1. Animais utilizados.....	15
3.3.2.2. Grupos experimentais.....	15
3.3.2.3. Determinação quantitativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> por caracterização de β -galactosidase	19
3.3.3. Avaliação Morfométrica.....	20

3.3.3.1. Técnica de Dissecção.....	20
3.3.3.2. Técnica Histológica.....	20
3.3.3.3. Estudo morfométrico.....	21
3.4. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (via oral e intraperitoneal – 20 e 50 mg/kg).....	22
4.1.1 Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (via oral – 20 mg/kg).....	23
4.1.2 Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (via oral – 50 mg/kg).....	24
4.1.3. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (via intraperitoneal – 20 mg/kg).....	27
4.1.4. Avaliação <i>in vivo</i> das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> (via intraperitoneal – 50 mg/kg).....	29
4.2. Determinação quantitativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> por caracterização de β -galactosidase.....	34
4.3. Estudo morfométrico	43
4.3.1. Fase crônica.....	43
4.3.2. Fase aguda.....	50
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ANEXOS

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença de Chagas cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* afeta mais de 18 milhões de pessoas na América Latina, causando cerca de 400.000 mortes por ano (POZAS et al., 2005). Mesmo tendo sido descrita há 100 anos por Carlos Chagas (1909), esta ainda representa um importante problema de saúde pública, sendo encontrados casos em 18 países em desenvolvimento na América do Sul e Central (ROCHA et al., 2007).

Quando avaliamos o Brasil, nesse contexto epidemiológico, podemos observar uma situação não muito diferente à apresentada inicialmente. Com um quadro epidemiológico estimado em pouco mais de 6 milhões de indivíduos parasitados por *Trypanosoma cruzi*, é possível deduzir que a situação sócio-econômica que envolve a infecção chagásica no Brasil é ainda preocupante (WHO 2003).

Seu ciclo biológico envolve um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (vetor), podendo apresentar as seguintes formas: amastigota, encontrada no interior das células de diversos tecidos dos vertebrados ou em cultura de células; epimastigota, no tubo digestivo dos triatomíneos e em cultura axênica; tripomastigota, no sangue dos vertebrados (infectante) e cultura celular; e tripomastigotas metacíclicas, nas fezes dos triatomíneos (CHAGAS, 1909; VIANNA, 1911; ROMAÑA; MEYER, 1942; ZINGALES; COLLI, 1985).

O contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae contaminados com *T. cruzi* é responsável pela maior parte dos casos de infecção em seres humanos e outros vertebrados (CHAGAS, 1909).

Além da transmissão vetorial da doença podemos citar outros tipos de transmissão, como congênita, amamentação e via transfusional. Outras formas também ocorrem, porém em menor porcentagem, como a transmissão acidental em laboratório, transmissão por transplante, oral e sexual (BRENER et al., 2000).

A transmissão oral foi recentemente explorada no início de 2005 quando 25 pessoas foram infectadas oralmente ao consumirem caldo de cana infectado pelo *T. cruzi* em Navegantes, Santa Catarina. Pouco tempo depois, 26 pessoas foram contaminadas após ingerirem suco de açaí contaminado pelo parasita em Igarapé da Fortaleza no Amapá. (IANNI; MADY, 2005). Este episódio nos leva a pensar que a doença de Chagas não está extinta e que as formas não habituais de transmissão devem se lembradas.

O curso da infecção da doença inclui uma fase aguda, que aparece logo após a infecção e cujos sintomas variam desde sintomas leves a miocardite intensa (cerca de 10% das pessoas infectadas) e uma fase crônica sintomática, que se desenvolve em cerca de um terço dos indivíduos infectados após um período assintomático (forma indeterminada) de anos ou décadas (CHAGAS, 1909; BILATE; CUNHA-NETO, 2008). Ainda na fase crônica, alterações digestivas e cardíacas podem ser desenvolvidas, com consequências fatais como resultado de destruição progressiva dos órgãos afetados (VERA-CRUZ et al., 2003). É sugerido que essa variabilidade clínica

pode ser resultante da heterogeneidade entre os isolados de *T.cruzi* e/ou a resposta imune do hospedeiro (TANOWITZ et al., 1992).

Observa-se que a infecção por *T.cruzi* determina uma patogenia caracterizada pelas condições do hospedeiro e da população infectante. O curso da infecção nos vertebrados suscetíveis é influenciado por fatores como a temperatura ambiental, idade, sexo, constituição genética do hospedeiro, características genéticas e morfológicas da cepa infectante e fatores externos, como por exemplo, agentes físicos e químicos (BRENER, 1979).

Existem cepas que apresentam predominância de formas tripomastigotas sangüíneas delgadas, que por sua vez apresentam tropismo diferenciado para células do sistema fagocitário mononuclear, parasitando com maior frequência esplenócitos, células do fígado e medula óssea. Como característica apresentam altos e precoces picos parasitêmicos. Apesar de serem mais sensíveis à ação dos anticorpos circulantes, determina na fase aguda da infecção uma elevada taxa de mortalidade na grande maioria dos animais experimentais infectados (ANDRADE, 1976).

Por outro lado existem cepas que apresentam como característica morfológica predominante a presença de formas tripomastigotas sangüíneas largas, possuindo assim, marcante tropismo para células musculares (musculatura lisa, esquelética e cardíaca) e tecido glandular (RIBEIRO et al., 1982). Esse tipo de conformação morfológica confere a este tipo de cepa uma maior resistência aos anticorpos circulantes. Como consequência permanecem por mais tempo na corrente circulatória determinando picos parasitêmicos tardios e infecções de duração mais prolongada.

Trypanosoma cruzi também é conhecido por sua heterogeneidade no genótipo e fenótipo, talvez como resultado de seu método de propagação clonal, na qual é proposto que a mutação é acumulada em diferentes sub-populações do parasita (TIBAYRENC et al., 1990).

Alguns autores sugerem que trocas genéticas podem contribuir para essa diversidade de *T. cruzi* (BOGLIOLO et al., 1996; CARRASCO et al., 1996). Contudo Tibayrenc et al. (1984, 1986), interpretando geneticamente os zimogramas de *T. cruzi*, formularam a hipótese de que esse parasita é diplóide, e que a recombinação entre e dentro dos zimodemas é restrita ou ausente em populações naturais.

O modelo clonal histotrópico da doença de Chagas descreve a relação entre a estrutura clonal da população de *T. cruzi* e seu tropismo tissular e nos oferece uma possível explicação sobre a variabilidade determinada pelo parasito (MACEDO; PENA, 1998). Assim, o estudo da estrutura genética do parasito e da expressão diferencial dos genes em diferentes períodos da infecção por populações de *T. cruzi*, serão importantes para o entendimento da patogênese da doença de Chagas.

O advento do estudo do DNA, baseado em marcadores multilocais como *DNA fingerprinting* (MACEDO et al., 1992), *random-amplified polymorphic DNA* (TIBAYRENC et al., 1990) e *simple-sequence-repeat PCR* (ZINGALES et al., 1998) mostraram um grande nível de variabilidade genética intraespecífica do parasito. Amplificação das sequências do gene do RNA ribossômico (rRNA) 24S α e do gene mini-exon não transcrito por técnica de PCR, indicam um claro dimorfismo entre os isolados de *T. cruzi*. (FERNANDES et al., 1998; SOUTO; ZINGALES, 1993; SOUTO et al., 1996).

1.2 – Substâncias utilizadas no controle da doença de Chagas

O benzonidazol (ROCHAGAN[®]/ROCHE – GRUMBERG et al., 1968) e o nifurtimox (LAMPIT[®]/BAYER – BOCK et al., 1972), são as drogas disponíveis para o tratamento de pacientes chagásicos. Entretanto, devido à sua conhecida toxicidade e efeito limitado para diferentes isolados do parasita e para as fases da doença (principalmente pacientes em fase crônica), novos fármacos são urgentemente necessários (COURA; de CASTRO, 2002; SOEIRO; de CASTRO, 2009).

Nos anos 80 com a proibição do nifurtimox no Brasil, o benzonidazol é a única droga de atividade tripanocida disponível no mercado. Apesar de possuir limitada eficácia na fase crônica da infecção e de apresentar vários efeitos colaterais, tais como dermatite, depressão da medula óssea, agranulocitose e trombocitopenia (PEDROSA et al., 2001).

A situação é parecida em relação à quimioprofilaxia. A transmissão sanguínea pode ser evitada pela adição de violeta de genciana ao sangue infectado (NUSSENZWEIG, 1953). No entanto esta medida profilática ainda é insuficiente, já que este corante apresenta restrições à sua utilização (THOMAS; McPHEE, 1984).

Além de existirem apenas duas drogas eficazes para o tratamento da doença, nenhuma dessas terapêuticas cumpre os preceitos de uma boa droga, em conformidade com os critérios da Organização Mundial da Saúde: (i) cura parasitológica de casos agudos e crônicos da infecção, (ii) efetivo em

dose única ou poucas doses, (iii) acessível aos pacientes, ou seja, de baixo custo e de fácil obtenção, (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos, (v) sem necessidade de hospitalização para tratamento, (vi) nenhuma resistência induzida pelo agente etiológico. Ambas as drogas apresentam cura em torno de 80% dos casos agudos e 20% dos casos crônicos. Os pacientes necessitam de 60 dias de tratamento, com 2-3 doses por dia e a distribuição do benzonidazol é restrita a clínicas especializadas que exigem acompanhamento médico durante o tratamento. Além disso, induzem efeitos colaterais significativos e algumas cepas de *T. cruzi* são resistentes ao tratamento (COURA, 2009).

Em vista da necessidade de novas substâncias com atividade biológica sobre *T. cruzi*, o interesse pela pesquisa vem crescendo com o intuito de se obter compostos capazes de atuarem sobre o parasita, porém desprovidos dos graves efeitos colaterais.

Uma das principais causas relacionadas à dificuldade de se encontrar uma substância capaz de combater o parasitismo está diretamente ligada às características morfológicas da cepa, principalmente às diferentes populações existentes, que podem apresentar um tropismo tecidual diferenciado (ANDRADE, 1976; DEANE, 1979; RIBEIRO; BELDA-NETO, 1983; RIBEIRO et al., 1982).

Grande importância terapêutica vem sendo atribuída a produtos de origem vegetal e a atividade tripanocida de vários princípios ativos naturais vem sendo descrita (BOZA, 1996; BASTOS et al., 1999).

1.3 –Lignanas dibenzilbutirolactônicas

Com o objetivo de se obter medicamentos contra doenças ainda sem tratamento ou medicamentos mais seguros e eficazes, novas drogas são desenvolvidas. Devido à grande diversidade da flora brasileira, cabe ao pesquisador o papel da descoberta e o desenvolvimento de medicamentos, sendo a avaliação dos efeitos tóxicos, colaterais e adversos dessas substâncias uma etapa crítica nesse processo (COX; BALICK, 1994).

Zanthoxylum naranjillo Griseb é uma planta usada na medicina folclórica no Brasil, conhecida popularmente como “Mamica de Cadela”. No estudo fitoquímico das folhas de *Z. naranjillo*, foram isolados os seguintes compostos: sesquiterpenos, lignanas e sosterol (BASTOS et al., 2001).

As lignanas são uma classe de metabólitos secundários de plantas produzidas por dimerização oxidativa de duas unidades fenilpropanóides (C₆C₃). As lignanas são na sua maioria presentes na natureza na forma livre, amplamente distribuídas no Reino Vegetal e tem sido encontrada em espécies pertencentes a mais de setenta famílias, sendo isoladas de raízes, rizomas, caules, folhas, sementes e frutos (SALEEM et al, 2005).

Ainda na fração axênica de *Z. naranjillo* isolou-se um princípio ativo, a cubebina, uma lignana com potente ação antiinflamatória, (BASTOS, 1999), porém devido a redução de plantas desta espécie, optou-se pela importação de sementes de uma outra espécie vegetal, a *Piper cubeba*, que apresenta a vantagem da não destruição da planta, pois dela utilizam-se apenas as sementes para a obtenção da lignana.

O gênero *Piper* tem mais de 700 espécies vegetais. *Piper cubeba*, pertencente à família *Piperaceae* é uma planta usada em muitos países para o tratamento de sífilis, dor abdominal, diarreia e asma (USIA et al., 2005).

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, envolvendo lignanas demonstraram uma importante atividade destes compostos sobre as formas tripomastigotas sanguíneas, superior à apresentada pela violeta de genciana, além do fato de não apresentarem danos às hemácias (LOPES et al., 1999). Esses resultados proporcionaram a solicitação da patente (Protocolo nº 003066), junto ao instituto Nacional da Propriedade Intelectual, por parte dos pesquisadores envolvidos.

A cubebina é um composto pertencente ao grupo das lignanas dibenzilbutirolactônicas que foi investigado por pesquisadores de diferentes áreas apresentando uma série de atividades biológicas, tais como antitumoral (AYRES et al., 1990), antiviral (RIMANDO et al., 1994), anti-PAF (SHEN et al., 1985; BRAQUET; GODFROID, 1986), antidepressiva (GHOSAL et al., 1979), antiinflamatória (KADOTA et al., 1987), destacando-se a ação inibidora da topoisomerase, ação anti-paf e anti viral (COSTA, 2000; YANG et al., 1996). Estes compostos também demonstraram significativa atividade tripanocida, tornando importante a avaliação de derivados de cubebina, isolados da semente de *Piper cubeba* (BASTOS et al., 1999).

Estudos pré-clínicos de possíveis efeitos adversos da cubebina, lignana dibenzilbutirolactônica, demonstraram que esta não apresenta qualquer efeito tóxico quando administrada via oral, o que torna importante à avaliação deste composto assim com de seus derivados para fins terapêuticos (RODRIGUES, 2002).

A hinoquinina, uma lignana dibenzilbutirolactônica, exibe significativa atividade tripanocida *in vivo* e *in vitro*, sendo obtida por síntese parcial da cubebina, demonstrando ainda atividade antiinflamatória e analgésica (SILVA et al., 2005).

Visto que o tratamento com o Benzonidazol provoca efeitos secundários graves e não é eficaz para o tratamento da fase crônica da doença, vê-se urgência na descoberta de novos compostos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas. Neste contexto, os produtos naturais têm chamado especial atenção para os pesquisadores devido às notáveis estruturas químicas encontradas na natureza que mostram importantes atividades biológicas (SOUZA et al., 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade biológica terapêutica de lignanas dibenzilbutirolactônicas em sistema *in vivo*, em fase aguda e crônica da infecção experimental de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* por meio das seguintes observações:

- Fase aguda: avaliação do comportamento parasitêmico de animais infectados e por meio da análise morfométrica.

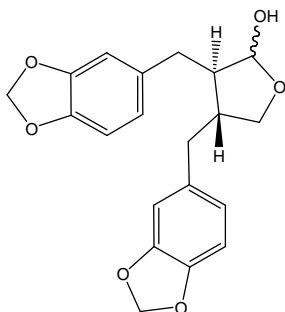
- Fase crônica: avaliação dos índices de parasitismo tecidual por meio da quantificação da enzima β -galactosidase, produzida pelo clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, alterada geneticamente para essa finalidade e por meio de análise morfométrica.

MATERIAL E MÉTODOS

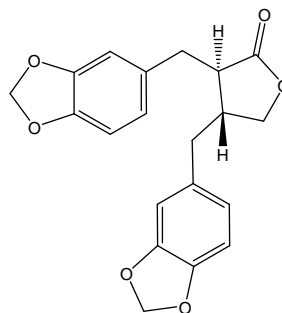
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias avaliadas

Foram avaliados dois derivados de dibenzilbutirolactonas, os quais anteriormente já demonstraram atividade antichagásica. São eles a hinoquinina e a cubebina.



(-)-Cubebina



(-)-Hinoquinina

Figura 1 – Estrutura química das substâncias cubebina e hinoquinina

3.2. Parasitas

Neste trabalho foi utilizado o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, o qual contém o gene da β -galactosidase que confere alta especificidade e sensibilidade aos ensaios farmacológicos (BUCKNER et al., 1996), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Alicia Gómez Bário, da Universidade Complutense de Madrid.

3.3. Ensaios Biológicos sobre *Trypanosoma cruzi*

3.3.1. Avaliação da fase aguda

3.3.1.1. Animais utilizados

Foram utilizados 65 camundongos albinos, machos, da linhagem BALB/C, pesando aproximadamente 25g cada. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controlada, recebendo água e ração *ad libitum*. O tratamento com as substâncias testadas ocorreu durante um período de vinte dias.

As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de 5µL de sangue da cauda de cada animal em experimentação, de dois em dois dias, sendo o número de parasitas quantificado de acordo com a técnica descrita por Brener (1962).

Este trabalho possui a aprovação do comitê de ética para o uso de animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA) protocolo 06.1.284.53.7.

3.3.1.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos da seguinte forma para a análise da atividade de cada substância:

- Controle negativo: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados com o solvente utilizado na preparação das soluções (DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5% em solução fisiológica) ;
- Cubebina 20 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 50 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 20 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 50 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;

- Hinoquinina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 20 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 50 mg/Kg/dia - oral: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: cinco animais inoculados com 2×10^4 parasitas e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente.

3.3.2. Avaliação da fase crônica

3.3.2.1. Animais utilizados

Foram utilizados 75 camundongos albinos, machos, da linhagem BALB/C, pesando aproximadamente 25g cada. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, em sala com temperatura e luminosidade controlada, recebendo água e ração *ad libitum*.

Para que fosse avaliada a efetividade das substâncias na fase crônica, os animais foram inoculados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e aguardado um período de 90 dias para que os animais se tornassem crônicos antes do início do tratamento, de acordo com o protocolo estabelecido por Toledo et al. (2004). O tratamento com as substâncias testadas ocorreu durante um período de vinte dias.

3.3.2.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos da seguinte forma para a avaliação da atividade de cada substância para o tratamento na fase crônica:

- Controle negativo: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados com o solvente utilizado na preparação das soluções (DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5% em solução fisiológica) ;

- Cubebina 20 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento cubebina 20 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 50 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento cubebina 50 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento cubebina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Cubebina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 parasitas e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento cubebina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com a cubebina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 20 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;

- Controle tratamento hinoquinina 20 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 50 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento hinoquinina 50 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento hinoquinina 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Hinoquinina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Controle tratamento hinoquinina 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com a hinoquinina na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 20 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;

- Controle tratamento benzonidazol 20 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 50 mg/Kg/dia - oral: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Controle tratamento benzonidazol 50 mg/Kg/dia - oral: três animais não infectados e tratados oralmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Controle tratamento benzonidazol 20 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Benzonidazol 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais inoculados com 100 formas tripomastigotas e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente;
- Controle tratamento benzonidazol 50 mg/Kg/dia - intraperitoneal: três animais não infectados e tratados intraperitonealmente com o benzonidazol na dosagem correspondente.

Imediatamente após o término do tratamento foram coletados coração, baço e fígado dos grupos experimentais. Metade de cada órgão foi utilizada para a quantificação do parasita por caracterização da enzima β -

galactosidase e a outra metade para a confecção de lâminas histológicas para avaliação do estudo morfométrico.

3.3.2.3. Determinação quantitativa de *Trypanosoma cruzi* por caracterização de β -galactosidase

Após a coleta dos órgãos, estes foram pesados e homogeneizados em 10 mL de tampão de lise (100 mM Tris base), sendo essa atividade realizada em triturador Ultraturax® (12,000 rpm), intercalando-se em intervalos de 30 segundos de agitação e 30 segundos em banho de gelo, para preservação das proteínas, sendo posteriormente o material submetido à avaliação quantitativa da enzima β -galactosidase

Após ser filtrado, o material foi deixado em repouso durante duas horas, a 4°C, sendo então centrifugado a 5.000 g, a 4°C, durante 10 minutos para separação dos restos teciduais. Um mililitro do sobrenadante obtido de cada amostra foi retirado e alicotado em placas de microtitulação de 96 poços (100 μ L em cada poço) para a realização da reação colorimétrica.

Cinquenta microlitros de solução de CPRG (chlorophenol red b-D-galactopyranoside, 400 μ M em 0.3 % Triton X-100, pH 7.4) foi adicionado e a placa incubada a 37° C por 6h. A absorbância foi determinada por leitura da placa em leitor específico, em 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$\%AE = [(AE-AEB)/(AC-AEB)] \times 100$ onde:

AE = absorvância dos poços contendo material obtido dos grupos de tratamento de cada substância;

AEB = absorvância dos poços contendo apenas tampão;

AC = absorvância dos poços contendo material obtido dos grupos controle de tratamento de cada substância (animais sem infecção).

3.3.3. Avaliação Morfométrica

3.3.3.1. Técnica de Dissecção

Três animais de cada grupo (fase aguda e crônica) foram sacrificados, por deslocamento da cervical e após a divulsão da pele, foram retirados imediatamente coração, fígado e baço, sendo estes órgãos colocados em fixador ALFAC e, após 24 horas, em solução de álcool de 80%.

3.3.3.2. Técnica Histológica

Após fixação, o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados de 5 μm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina.

3.3.3.3. Estudo morfométrico

Os cortes realizados foram utilizados nas análises morfométricas. Desta maneira, cada corte foi focalizado em microscópico óptico (Axioskop 40) com objetiva de imersão (100X), munido de uma câmara para captura de imagem. As imagens de setenta e cinco núcleos das células dos órgãos foram mensuradas por meio de um programa de computador (AxioVision release 4.6), onde foram verificados os seguintes parâmetros: área, diâmetro nuclear maior diâmetro menor e perímetro.

3.4. Análise estatística

Para a análise estatística assim como para diversos cálculos matemáticos dos resultados, utilizamos o *software GrafPad prisma 4.0*. Foi utilizado o teste One-Way ANOVA para determinação dos níveis de significância da atividade das substâncias nos ensaios *in vivo*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (via oral e intraperitoneal – 20 e 50 mg/kg)

Para avaliação da fase aguda da infecção chagásica os animais foram tratados, diariamente pela via oral e intraperitoneal, com as substâncias em estudo (cubebina e hinoquinina) nas concentrações de 20 e 50 mg/kg, além da substância controle (benzonidazol), avaliada nas mesmas concentrações.

A parasitemia foi realizada com intervalo de 48 horas de acordo com a técnica descrita por Brener (1962), em camundongos BALB/C, machos, pesando em torno de 25 gramas e infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas pertencentes ao clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*.

A parasitemia sanguínea é um parâmetro importante para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção necessária para o estabelecimento da correlação anátomo-patológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR et al., 1993).

4.1.1 Avaliação *in vivo* das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (via oral – 20 mg/kg)

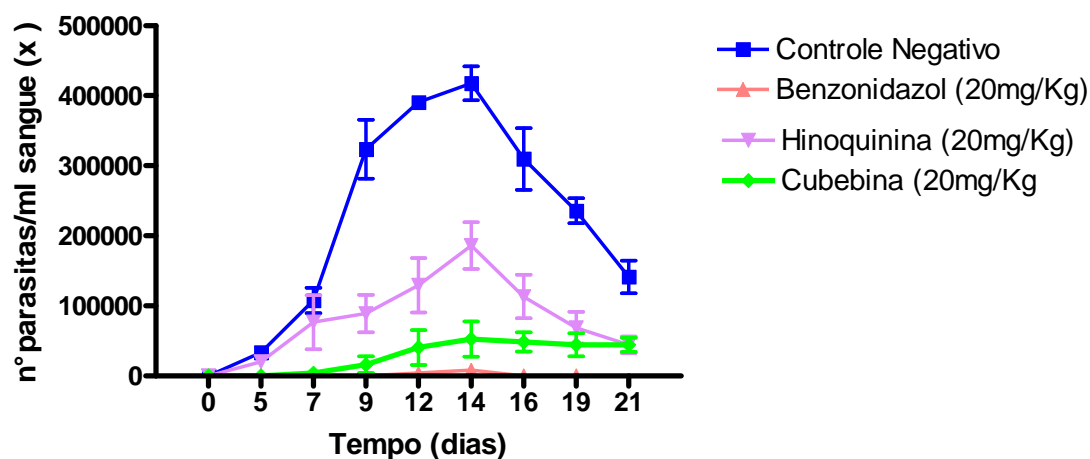


Figura 2- Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com hinoquinina e cubebina na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

De acordo com a figura acima, podemos visualizar na curva parasitêmica que ambas as substâncias, hinoquinina e cubebina, demonstraram atividade biológica na concentração de 20 mg/Kg, em relação ao grupo controle negativo.

Com relação à atividade da substância hinoquinina, pode-se observar que houve uma redução significativa do número de formas circulantes ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle negativo no pico parasitêmico (aproximadamente 51,6%).

Analisando os resultados para os animais tratados com a substância cubebina, verifica-se uma redução do número de formas parasitárias circulantes em torno de 80,7% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle negativo.

Ao se observar o pico parasitêmico das duas substâncias, observa-se que não ocorreu o deslocamento deste, permanecendo em torno do 14º dia. Após o pico parasitêmico observa-se redução do número de formas tripomastigotas circulantes.

4.1.2 Avaliação *in vivo* das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (via oral – 50 mg/kg)

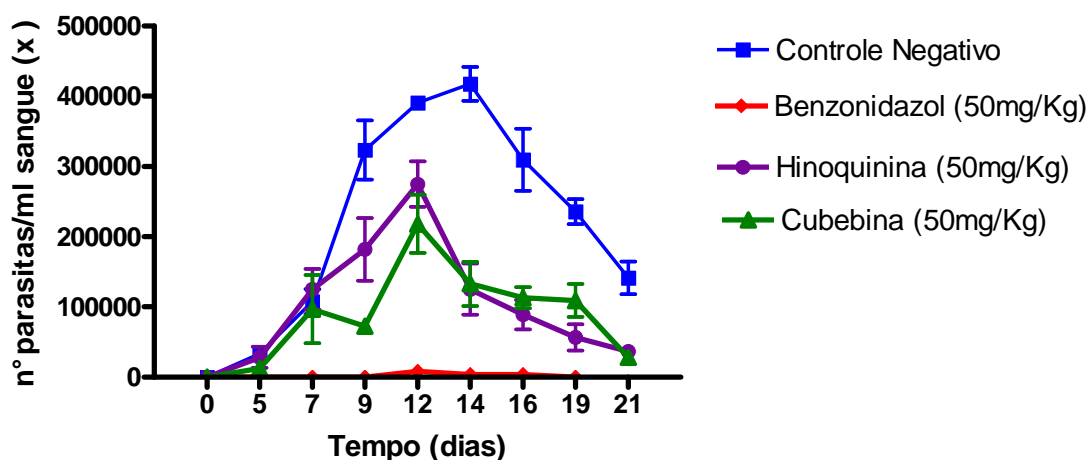


Figura 3- Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via oral com cubebina e hinoquinina na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

A curva parasitêmica acima mostra novamente que as substâncias em estudo demonstraram atividade biológica na concentração de 50 mg/Kg, em relação ao grupo controle negativo.

A substância hinoquinina apresentou, nessa concentração, uma redução significativa ($p < 0,01$) no número de formas circulantes de 34,2%, quando comparado ao grupo controle negativo no pico parasitêmico.

Com relação à atividade da substância cubebina, pode-se observar que houve uma redução do número de formas circulantes quando comparado ao grupo controle negativo, aproximadamente 43% ($p < 0,01$).

Ao contrário do que aconteceu com a concentração de 20 mg/Kg, nesta concentração houve um deslocamento do pico parasitêmico para o 12º dia nas duas substâncias analisadas.

O tratamento pela via oral com as duas substâncias nas concentrações de 20 e 50 mg/kg conseguiu aumentar o tempo de sobrevivência dos animais infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* em relação aos animais pertencentes ao grupo controle negativo. Para o grupo controle negativo a morte dos animais ocorreu no 23º ao 26º dia e para os animais tratados com as diferentes substâncias, do 28º ao 32º dia.

Na Tabela 1 estão representados os valores referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados oralmente comparados ao grupo controle negativo. A substância cubebina mostrou um melhor resultado na concentração de 20 mg/Kg (80,7%), comparado aos grupos de tratamento da substância hinoquinina.

Tabela 1- Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados oralmente comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Substâncias administradas	Redução parasitária (%) –	Redução parasitária (%) –
	20 mg/kg	50 mg/kg
Cubebina	80,7	43
Hinoquinina	51,6	34,2

Mesmo com os grandes avanços atingidos pela medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda são consideradas muito importantes em relação aos cuidados com a saúde. O crescimento acentuado mundial de fitoterápicos tem ocorrido nos últimos 15 anos (CALIXTO, 2000). As plantas fornecem diversidade química e várias atividades, o que levou ao desenvolvimento de centenas de drogas farmacêuticas além de representarem uma fonte incomparável de diversidade molecular para o descobrimento de novas drogas (SHU, 1998). Vários estudos demonstraram que algumas plantas possuem atividade contra *T. cruzi* (MUELLAS-SERRANO et al., 2000; IGWEH et al., 2002).

Com relação ao tratamento da doença de Chagas há ainda a necessidade de se encontrar drogas mais eficientes e menos tóxicas para agir especificamente contra o patógeno (COURA; CASTRO, 2002).

A cubebina, composto pertencente ao grupo das lignanas dibenzilbutirolactônicas (BASTOS et al., 1996), e que é amplamente distribuído no reino vegetal, foi investigado por diferentes pesquisadores de diferentes áreas de conhecimento,

levando ao isolamento de vários compostos de interessantes atividades biológicas, como é o caso da hinoquinina, substância também avaliada nesse trabalho.

4.1.3. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (via intraperitoneal – 20 mg/kg)

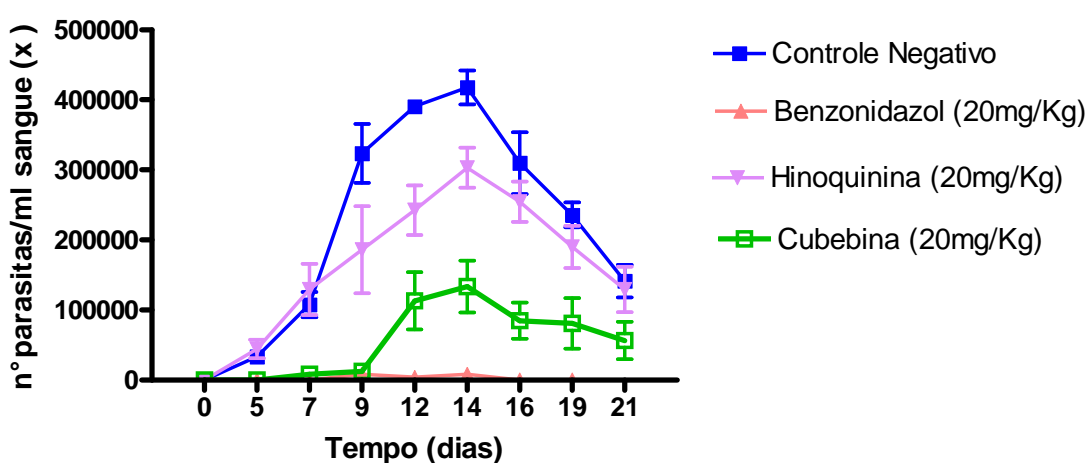


Figura 4- Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com hinoquinina e cubebina na concentração de 20 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Para os animais tratados intraperitonealmente com as substâncias hinoquinina e cubebina, na concentração de 20mg/Kg pode-se observar um

comportamento semelhante àquele apresentado no tratamento pela via oral, ambas demonstrando atividade biológica.

Porém ao se analisar a redução das formas circulantes em relação ao grupo controle negativo, ambas as substâncias apresentaram um valor menor de redução da parasitemia, que aquele observado na mesma concentração em animais tratados oralmente.

Para a substância hinoquinina a redução do número de formas circulantes foi de 27,4% ($p < 0,05$) e para a substância cubebina de 62,2% ($p < 0,01$).

Ao se observar o pico parasitêmico das duas substâncias, observa-se que não ocorreu o deslocamento deste, permanecendo em torno do 14º dia. Após o pico parasitêmico observa-se redução do número de formas tripomastigotas circulantes para a substância hinoquinina e para a substância cubebina a redução das tripomastigotas após o pico parasitêmico foi acompanhada de um discreto pico no 19º dia da infecção.

4.1.4. Avaliação *in vivo* das substâncias sobre o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (via intraperitoneal – 50 mg/kg)

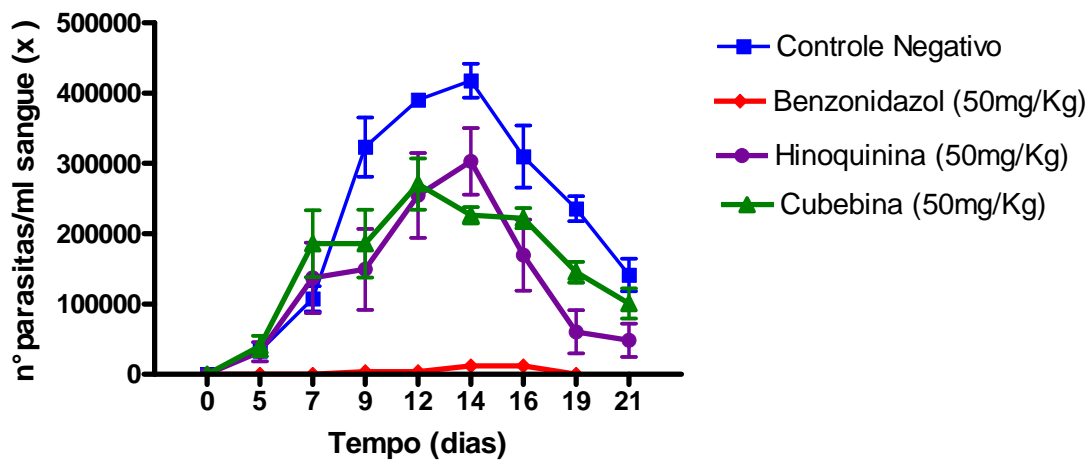


Figura 5- Comportamento parasitêmico de animais infectados com 2×10^4 formas tripomastigotas do clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados diariamente por via intraperitoneal com cubebina e hinoquinina na concentração de 50 mg/kg durante 20 dias. Controle positivo (benzonidazol) e controle negativo animais tratados com solução de DMSO 5%, TWEEN 2,5% e etanol 5%. Avaliação estatística realizada por One-Way ANOVA complementada pelo método de Dunnett.

Para a concentração de 50 mg/Kg, pode-se observar que as duas substâncias conseguiram diminuir o número de parasitas ao se observar a curva parasitêmica da Figura 6, demonstrando atividade biológica para ambas as substâncias.

Novamente nesta concentração as substâncias cubebina e hinoquinina demonstraram um menor valor de redução das formas circulantes, comparado aos valores dos animais tratados oralmente.

Pode-se observar neste caso uma redução do número de formas circulantes de 23,6% ($p>0,05$) para a hinoquinina e 31,3% ($p<0,05$) para a cubebina.

O pico parasitemico da substância hinoquinina permaneceu no 14º dia como o grupo controle negativo e para a substância cubebina houve um deslocamento para o 12º dia, com redução dos parasitas após este.

Com relação ao tempo de sobrevivência dos animais infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados pela via oral com a cubebina e a hinoquinina, nas concentrações de 20 e 50 mg/kg, houve um aumento deste em relação aos animais pertencentes ao grupo controle negativo. Para o grupo controle negativo a morte dos animais ocorreu no 23º ao 26º dia e para os animais tratados com as diferentes substâncias, do 28º ao 32º dia.

Na Tabela 2 estão representados os valores referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados intraperitonealmente comparados ao grupo controle negativo. A substância cubebina mostrou um melhor resultado na concentração de 20 mg/Kg (62,2 %), comparado aos grupos de tratamento da substância hinoquinina.

Tabela 2 - Valores absolutos referentes à redução da parasitemia dos animais dos grupos tratados intraperitonealmente comparados ao grupo controle negativo. Inóculo de 20.000 formas tripomastigotas / animal; clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Substâncias administradas	Redução parasitária (%) –	
	20 mg/kg	50 mg/kg
Cubebina	62,2	31,3
Hinoquinina	27,4	23,6

Poucos trabalhos foram desenvolvidos a fim de se avaliar a atividade tripanocida *in vivo* da cubebina e da hinoquinina.

Em estudo *in vivo* com a cepa Y de *T. cruzi*, realizado por Saraiva et al., 2007 com a hinoquinina, foi observado significativa redução da parasitemia em relação ao controle positivo, o benzonidazol. Além disso, o tratamento de camundongos infectados com a hinoquinina na concentração de 20 mg/ kg/ dia, apresentou 70,8% de redução na parasitemia, enquanto que o benzonidazol exibiu aproximadamente 29,0% de redução do parasita. Além disso, a hinoquinina foi capaz de reduzir o número de parasitas não só no pico parasitêmico, mas também em todo o curso da infecção. Também se observou que o grupo tratado com hinoquinina apresentou melhores taxas de sobrevivência do que o grupo tratado com benzonidazol.

Outra classe de lactonas foram avaliadas por Sulsen et al., 2008. Neste trabalho foram avaliadas duas substâncias, a psilostacina e a peruvina, isoladas do extrato de *Ambrosia sprengel* (Asteraceae). A psilostacina induziu a diminuição significativa da parasitemia e 100% de sobrevivência após 100 dias de infecção. Por outro lado os animais controles morreram antes do final da fase aguda.

Existem alguns artigos que estudaram a atividade *in vitro* das substâncias cubebina e hinoquinina, entretanto pouco se tem avaliado a atividade dessas substâncias em modelos animais, dessa forma é difícil compararmos os efeitos da atividade dessas substâncias em modelos *in vivo* e os efeitos que elas podem determinar sobre o sistema biológico.

O comportamento apresentado pelos animais tratados com as substâncias na concentração de 50 mg/kg foi diferente em relação ao apresentado pelos animais tratados com a menor concentração das mesmas, onde foi observada uma redução do número de formas circulantes do parasita.

A não linearidade de atividade biológica dose-dependente apresentado tanto pela cubebina como pela hinoquinina, independentemente da via de tratamento utilizada, pode ser explicada por outros resultados obtidos por nosso grupo, os quais indicam uma exacerbação da parasitemia de animais infectados e tratados por via intraperitoneal com o tratamento por produtos naturais (dados não publicados). Esse fato, observado também para os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e sal derivado de ácido ursólico, pode ter sido desencadeado por uma modulação da resposta imune pelas substâncias avaliadas, o que permitiria uma maior quantidade de formas tripomastigotas na circulação do hospedeiro. Essa observação pode ser confirmada, de acordo com a citação de Marquez-Martin et al. (2006), onde em um estudo anteriormente realizado por Eugui et al. (1994) foi relatada a atividade imunomodulatória apresentada por substâncias de origem natural, onde os primeiros autores demonstraram que triterpenos pentacíclicos, que exibem propriedade antiinflamatória, participam do processo de modulação da resposta imune de forma dose-dependente.

Entretanto, para esclarecer esse fenômeno, uma avaliação farmacocinética das substâncias seria necessária a fim de se determinar a concentração de substância circulante ativa sobre as formas tripomastigotas.

Uma vez que a atividade antiinflamatória é também característica das substâncias aqui avaliadas (COIMBRA et al., 2004), acreditamos que esse deva ser a principal razão para uma diminuição da redução do número de parasitos, conforme observado tanto para a cubebina, como para hinoquinina. Entretanto, estudos relacionados com a atividade imunomodulatória destes compostos devem ser realizados, a fim de elucidar esta hipótese apresentada.

No geral, os resultados apresentados pela cubebina e a hinoquinina em nosso trabalho na fase aguda nos ensaio *in vivo*, mostram que estas lignanas podem ser consideradas potenciais promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas. Além disso, é importante ressaltar que outras análises *in vivo*, sob diferentes protocolos terapêuticos devem ser desenvolvidos a fim de se obter melhor eficácia das drogas analisadas.

4.2. Determinação quantitativa de *Trypanosoma cruzi* por caracterização de β -galactosidase

Após a infecção, cronificação e tratamento dos animais dos diferentes grupos experimentais, parte dos órgãos retirados foram empregados para as preparações necessárias para a determinação quantitativa de *T. cruzi* nos tecidos dos animais infectados, por meio da dosagem da enzima β -galactosidase expressa pelo clone B5 da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Dois principais métodos, com exceção da análise histológica, têm sido utilizados para detectar a presença de parasitas em tecidos de pacientes ou de animais infectados com *Trypanosoma cruzi*. São esses o método imunohistoquímico (BEN YOUNES-CHENNOUFI et al., 1988; HIGUCHI et al., 1993; BELLOTTI et al., 1996) e a detecção do DNA através do PCR (BRANDARIZ et al., 1995; TARLETON et al., 1997). Estes métodos têm demonstrado com sucesso a presença do parasita no tecido, mas são incapazes de demonstrar o grau de parasitas presentes nos tecidos.

Buckner et al. (1996) relataram que a quantificação de parasitas por meio da enzima β -galactosidase seria um eficiente método para ensaios com substâncias para fins terapêuticos. A cepa CL de *T. cruzi* foi geneticamente modificada para expressar o gene da β -galactosidase da *Escherichia coli*, lacZ, sendo esta enzima capaz de catalisar uma reação colorimétrica. A quantidade da atividade da enzima β -galactosidase é diretamente proporcional ao número de parasitas (clone CL B5). A eficiência deste ensaio tem facilitado ensaios com compostos contra *T. cruzi* (Buchner et al. 1996).

Em nosso laboratório conseguimos quantificar os parasitas presentes nos tecidos através desse método adaptado para verificar a efetividade de substâncias tripanocidas na fase crônica da doença de Chagas (Esperandim et al, 2010).

As figuras 6 e 7 representam os resultados encontrados para as verificações da efetividade do tratamento no fígado, pelas vias intraperitoneal e oral , respectivamente, dos grupos com as substâncias benzonidazol (Bz – controle positivo), cubebina (Cb) e hinoquinina (Hin), considerando que o grupo controle negativo (CN) possui o número máximo de parasitas no tecido, determinado pela ausência de tratamento. Os resultados estão apresentados em porcentagem de parasitas.

Podemos verificar que para ambas as substâncias houve uma redução significativa em relação ao controle negativo. A substância cubebina apresentou uma redução de 51,2% ($p < 0,01$) na dosagem de 20mg/Kg e de 54,1% ($p < 0,01$) na dosagem de 50mg/Kg do número de parasitas na via intraperitoneal. Para a substância hinoquinina a redução parasitária mostra-se também significativa, porém menos eficaz que a substância em comparação, visto que a redução no número de parasitas foi de 34,7% ($p < 0,01$) para a dosagem de 20 mg/Kg e 39,7% ($p < 0,01$) para 50mg/Kg na via intraperitoneal. (Figura 6)

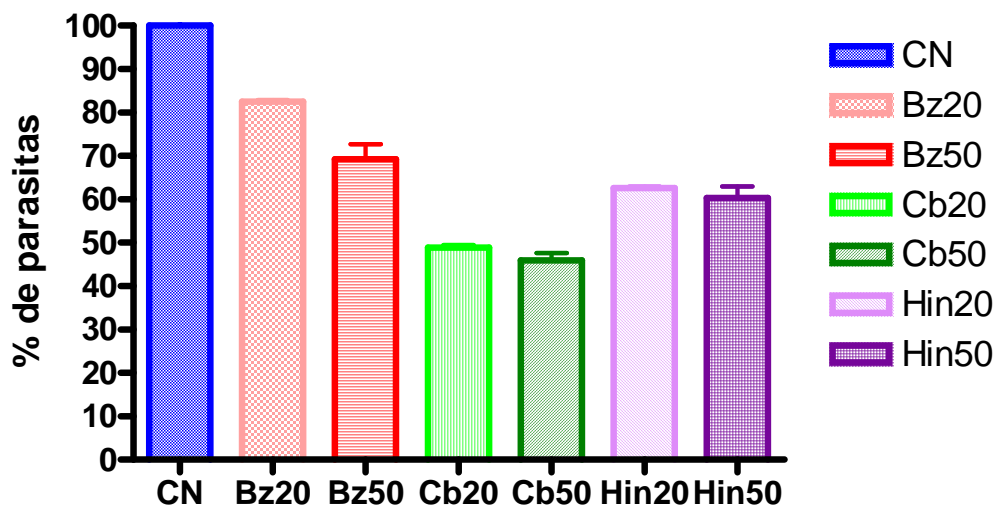


Figura 6. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no fígado de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

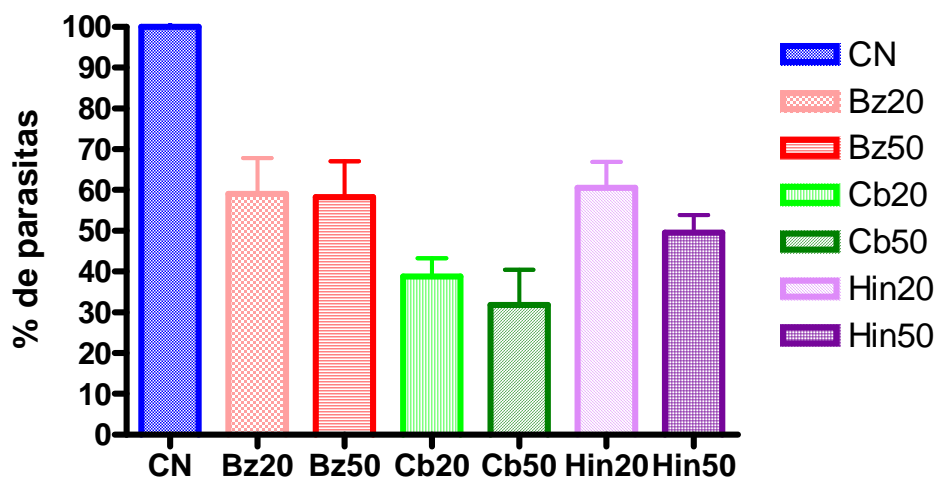


Figura 7. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no fígado de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

Pela avaliação da Figura 7, referente ao tratamento pela via oral, observamos uma melhor eficácia da resposta para as duas substâncias avaliadas em relação ao tratamento pela via intraperitoneal, onde a substância cubebina apresentou redução de 61,2%, ($p < 0,01$) na concentração de 20mg/Kg e de 68,2 % ($p < 0,01$) na concentração de 50 mg/Kg, no número de parasitas. Para a hinoquinina houve redução de 39,5% ($p < 0,01$) na concentração de 20 mg/Kg e de 50,5% ($p < 0,01$) na concentração de 50 mg/Kg.

Já para o benzonidazol, considerado como controle positivo, a redução do número de parasitas foi significativamente menor quando comparado com as substâncias em análise, uma vez que na via intraperitoneal esta atingiu 17,5% ($p < 0,05$) na concentração de 20 mg/Kg e 30,8% ($p < 0,05$) na

concentração de 50mg/Kg. Na via oral, observamos uma redução de 40,9% ($p < 0,05$) para a concentração de 20 mg/Kg e de 41,7% ($p < 0,05$) para a concentração de 50 mg/Kg.

Para a avaliação da incidência parasitária no baço dos animais tratados com a cubebina pela via intraperitoneal (Figura 8), o tratamento resultou em uma redução do número de parasitas de 51,6% ($p < 0,01$) na concentração de 20 mg/Kg e 57,4% ($p < 0,01$) na concentração de 50 mg/Kg. Para a hinoquinina esta redução se mostrou em um nível menor: 41,7% ($p < 0,01$) para 20mg/kg e 44,8% ($p < 0,01$) para 50 mg/Kg. O grupo controle positivo apresentou, nos resultados referentes ao baço, uma menor redução parasitária comparada aos grupos de tratamento (36,3%- Bz 20mg/Kg e 38,2% Bz50mg/Kg) em relação ao controle negativo.

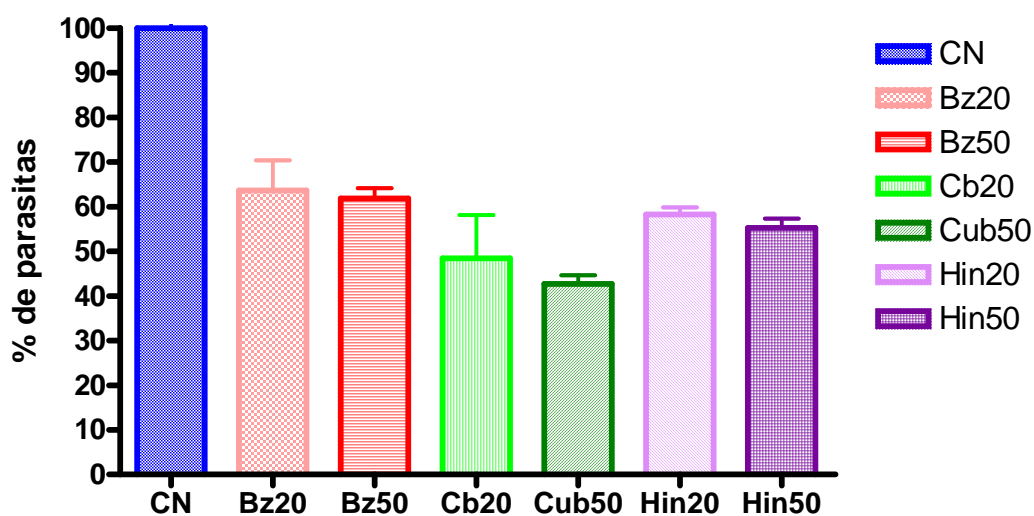


Figura 8. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no baço de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

Pela Figura 9, que representa o baço dos animais dos grupos de tratamento, observamos uma maior eficácia no tratamento pela via oral. Na dosagem de 20 mg/Kg foi demonstrado uma redução de 75% ($p < 0,01$) para a cubebina e 67,4% ($p < 0,01$) para hinoquinina. Uma redução maior foi observada na dosagem de 50 mg/Kg, 82% ($p < 0,01$) para cubebina e 71% ($p < 0,01$) para hinoquinina. Os resultados do grupo benzonidazol foram estatisticamente menos significantes, tendo o número de redução de parasitas se mantido nos níveis de 12% ($p < 0,05$) para 20 mg/Kg e 16% ($p < 0,01$) para 50 mg/Kg.

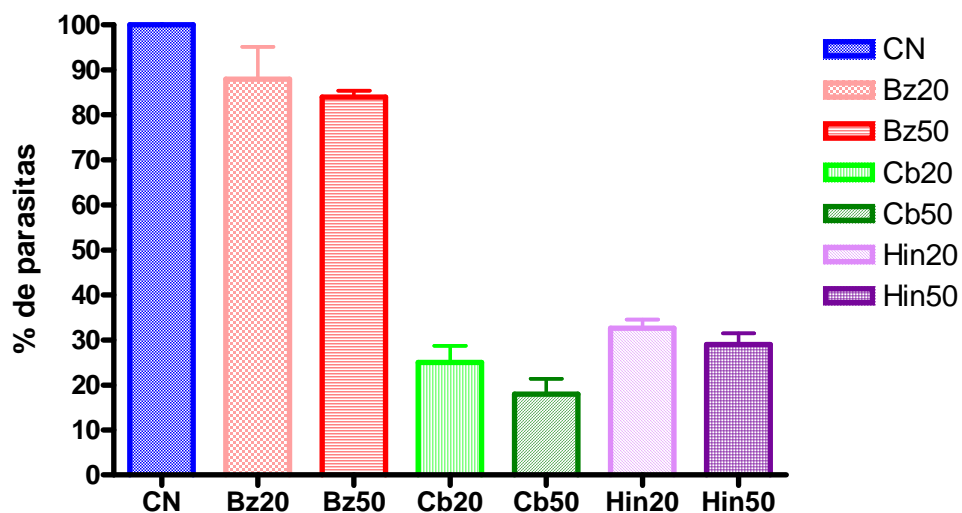


Figura 9. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no baço de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

Quando avaliamos o tecido cardíaco dos grupos de animais tratados pela via intraperitoneal (Figura 10), observamos desempenho das substâncias quanto à redução do número de parasitas em relação ao controle negativo. Para cubebina 20 mg/Kg observamos uma redução de 59,4%

($p < 0,01$) dos parasitas teciduais, enquanto que para cubebina 50 mg/Kg a redução foi de 77,3% ($p < 0,01$). Já para hinoquinina essa redução, aqui ocorrida em menores níveis que o controle positivo (Bz20 mg/Kg 44,7% e Bz 50mg/Kg 49,6%), atingiu o índice de 28,5% ($p < 0,05$) para 20 mg/Kg e 15,5% ($p < 0,05$) para 50 mg/Kg.

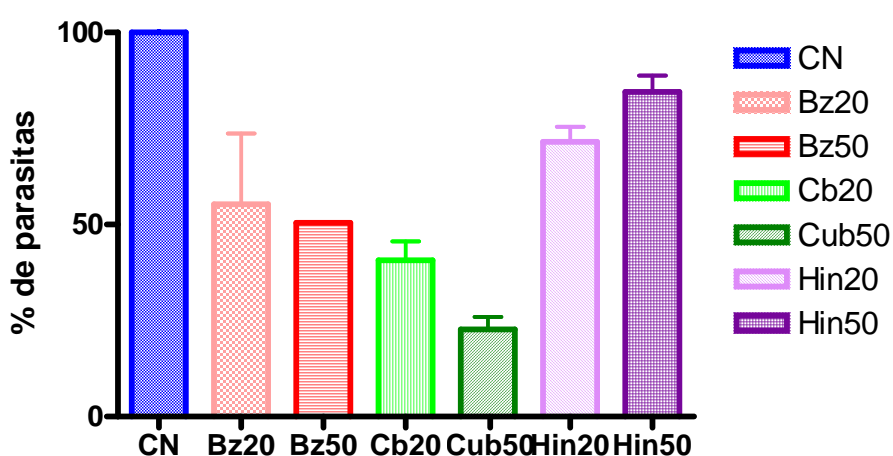


Figura 10. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no coração de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados intraperitonealmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

Em relação à obtenção dos resultados de avaliação do efeito do tratamento com as diferentes substâncias pela via oral, e em relação ao tecido cardíaco, apresentados na Figura 11, observamos resultados melhores das substâncias avaliadas em relação ao controle negativo e também ao controle positivo (benzonidazol).

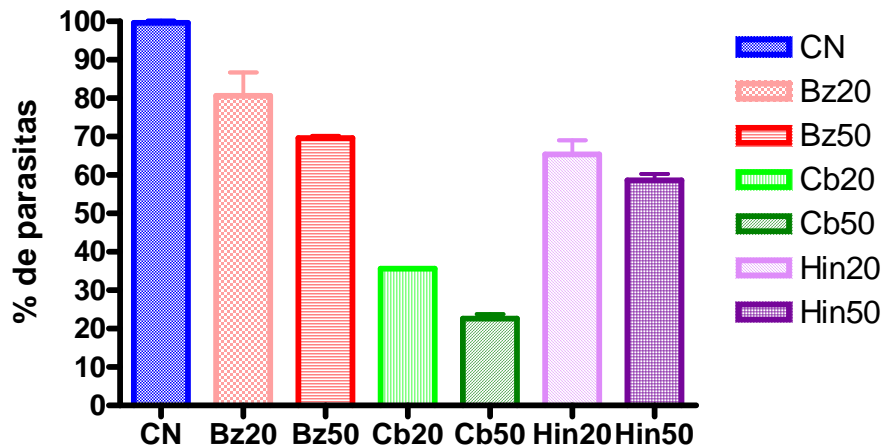


Figura 11. Representação gráfica da porcentagem de parasitas encontrados no coração de diferentes grupos de animais em fase crônica infectados com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* e tratados oralmente com benzonidazol nas concentrações de 20 e 50 mg/Kg/dia, cubebina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia e com hinoquinina na concentração de 20 e 50 mg/Kg/dia durante o período de 20 dias.

A substância cubebina na concentração de 20 mg/Kg apresentou redução de 64,4% ($p < 0,01$) e 77,4% ($p < 0,01$) na concentração de 50 mg/Kg em relação ao controle negativo.

Resultados de redução de parasitas menores foram observados para hinoquinina, 34,7% ($p < 0,01$) para a concentração de 20 mg/Kg e 41,4% ($p < 0,01$) para a concentração de 50 mg/Kg comparados aos resultados da cubebina. Entretanto estes resultados de redução de parasitas teciduais ainda são mais significativos que aqueles observados para o benzonidazol (19,4% para 20 mg/Kg e 30,4% para 50 mg/Kg), uma vez que esta é a substância indicada para tratamento de indivíduos chagásicos (Figura 11).

Os resultados apresentados pela cubebina e a hinoquinina, nos animais infectados e cronificados, mostraram-se significativamente melhores que os resultados obtidos para o fármaco utilizado para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol.

Docampo, 2001 avaliando a atividade do benzonidazol, observou que quando administrado durante a fase aguda da doença de Chagas, este apresentou de 50 – 70% de cura dos pacientes tratados. No entanto este mesmo fármaco mostrou eficácia limitada no tratamento da fase crônica da doença, além de ser elevadamente tóxico para o paciente. Estes dados ainda confirmam os relatos de Souza et al., 2005 que afirma que o benzonidazol não é eficaz para o tratamento da fase crônica da doença.

É importante salientar que Rodrigues 2002, analisando cortes de rim, fígado e intestino, não observou nenhuma alteração celular ou tecidual determinada por essa classe de substâncias. Essa ausência de alterações teciduais confirma a baixa toxicidade da cubebina que também não alterou nenhum parâmetro sanguíneo em análise.

Em trabalho realizado por Souza et al, 2004, foi avaliado cinco compostos derivados da cubebina em ensaio *in vitro* com formas amastigotas livres de *T. cruzi* e a hinoquinina foi o composto mais ativo apresentando um resultado de $IC_{50} = 0.7\mu M$ e o composto menos ativo, a dinitrohinoquinina, apresentou valor de $IC_{50}=95,3 \mu M$. Apesar de alguns trabalhos tratarem do aspecto da atividade *in vitro*, sobre formas amastigotas, é a primeira vez em um trabalho que se avalia a atividade em nível tecidual de substâncias sobre *T. cruzi* na fase crônica da infecção, ficando desta forma difícil a comparação do

efeito dessas substâncias em modelos *in vivo* e os efeitos que elas possam determinar sobre o sistema biológico.

4.3. Estudo morfométrico

4.3.1. Fase crônica

Para avaliação do estudo morfométrico da fase crônica foram avaliados os cortes histológicos obtidos a partir dos grupos: controle infectado sem tratamento; controle não infectado; grupo de tratamento com a cubebina e a hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg em duas vias de administração, oral e intraperitoneal. Foram avaliados os seguintes parâmetros nucleares: área, diâmetro maior, diâmetro menor e perímetro, do baço, fígado e coração.

A Tabela 3 representa os valores dos parâmetros nucleares médios do baço de animais cronificados. Ao observar os valores relacionados ao controle infectado sem tratamento verifica-se que houve uma hipertrofia das células comparadas ao controle não infectado em todos os parâmetros nucleares. Com relação aos grupos de tratamento os valores apresentados encontram-se mais próximos ao controle não infectado, mostrando que ocorreu uma resposta celular positiva comparado ao grupo controle infectado.

No baço podemos destacar os valores dos grupos de tratamento com a substância cubebina (Tabela 3). Para o grupo tratado oralmente com a cubebina na concentração de 50 mg/Kg destaca-se os valores da área, $8,48 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) e perímetro $10,42 \mu\text{m}$, ($p < 0,001$), pois para o grupo infectado e não tratado estes valores se encontram aumentados significativamente, $10,46 \mu\text{m}^2$ para a área e $11,48 \mu\text{m}$ para o perímetro.

Tabela 3. Parâmetros nucleares do baço de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do baço			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	10.46±3.11	4.00±0.71	3.28±0.54	11.48±1.74
CNI	8.23±2.62	3.02±0.56	2.78±0.54	9.87±1.74
Cub20 IP	9.36±2.42	3.88±0.67	3.08±0.64	11.02±1.41
Cub20oral	8.61±2.25***	3.63±0.51	3.07±0.38	10.55±1.19**
Cub50IP	8.80±1.98**	3.56±0.53*	3.15±0.46	10.65±1.37*
Cub50oral	8.48±2.16***	3.64±0.57	2.99±0.45*	10.42±1.74***
Hinok20IP	9.30±1.74	3.84±0.74	3.08±0.40	10.92±1.01
Hinok20oral	8.72±2.04***	3.59±0.51*	3.08±0.42	10.59±1.21*
Hinok50IP	9.46±2.08	3.92±0.57	3.08±0.57	11.08±1.21
Hinok50oral	8.98±2.04**	3.54±0.56**	3.09±0.48	10.98±1.43
Bzn20IP	9.80±2.04	3.84±0.55	3.24±0.44	11.16±1.21
Bzn20oral	10.02±2.74	3.92±0.57	3.24±0.60	11.30±1.41
Bzn50IP	9.98±2.62	3.81±0.56	3.28±0.54	11.20±1.50
Bzn50oral	9.51±2.27	3.76±0.49	3.20±0.55	10.97±1.29

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral - infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral; Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Analisando-se os dados da Tabela 4, verifica-se um valor aumentado para todos os parâmetros nucleares do grupo de animais infectados e sem tratamento em relação ao grupo não infectado. Com relação aos grupos de tratamento com as substâncias em análise, destaca-se a cubebina nas duas dosagens testadas, 20 e 50 mg/Kg e nas duas vias de administração, oral e intraperitoneal.

Para o grupo de tratamento com a substância cubebina na dosagem de 20 mg/Kg tratados oralmente obtivemos um valor de $14,42 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) para a área e $18,79 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$) para o perímetro. Já para o grupo de animais tratados com a dosagem de 50 mg/Kg obtivemos um valor de área de $14,29 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) e de perímetro de $16,27 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$).

Com o grupo da cubebina tratados intraperitonealmente também obtivemos resultados significativamente melhores que os outros grupos ($p < 0,001$). Para a concentração de 20 mg/Kg o valor foi $16,08 \mu\text{m}^2$ para a área e $16,21 \mu\text{m}$ para o perímetro. Na concentração de 50 mg/Kg os valores para a área e para o perímetro foram de $15,36 \mu\text{m}^2$ e $16,21 \mu\text{m}$ respectivamente.

Todos estes valores dos parâmetros nucleares apresentados para o coração dos animais tratados com a cubebina são considerados estatisticamente significativos uma vez que estão mais próximos aos valores apresentados pelo grupo de animais não infectados. Para este grupo obtivemos um valor de $10,68 \mu\text{m}^2$ para a área e $14,48 \mu\text{m}$ para o perímetro. Para o grupo de animais infectados e não tratados os valores encontram-se aumentados (área $21,24 \mu\text{m}^2$ e perímetro $21,58 \mu\text{m}$), mostrando que ocorreu um aumento nuclear para as células do tecido cardíaco.

Tabela 4. Parâmetros nucleares do coração de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do coração			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	21.24±7.97	8.04±1.74	3.36±0.99	21.58±4.19
CNI	10.68±3.95	5.28±1.70	2.60±0.76	14.48±3.98
Cub20 IP	16.08±6.49***	6.04±0.67***	3.36±0.81	16.87±4.08***
Cub20oral	14.42±4.98***	7.12±1.39	2.56±0.65**	18.79±3.40**
Cub50IP	15.36±6.07***	5.76±1.33***	3.36±0.91	16.21±3.34***
Cub50oral	14.29±6.46***	5.88±1.64***	3.08±0.97	16.27±3.99***
Hinok20IP	19.13±6.00	7.40±1.55	3.36±1.11	20.07±3.59
Hinok20oral	18.05±8.11	6.68±1.85***	3.44±1.15	18.44±4.45***
Hinok50IP	18.94±9.54	6.28±2.13***	3.76±1.20	17.75±5.30***
Hinok50oral	17.98±2.39	5.93±2.04***	3.71±1.58	16.93±4.39***
Bzn20IP	17.90±1.39	5.92±1.65***	3.64±1.47	16.81±4.60***
Bzn20oral	19.26±7.94	6.60±1.65***	3.71±1.24	18.48±4.04***
Bzn50IP	17.25±8.82*	6.47±1.84***	3.31±1.07	17.83±4.66***
Bzn50oral	19.13±6.85	6.80±1.71***	3.60±1.71	18.85±4.03**

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral –infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral; Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Observando a Tabela 5, onde estão expressos os valores dos parâmetros nucleares médios do fígado verificou-se melhores resultados para os grupos de animais tratados oralmente com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg.

Para o grupo de animais tratados com a substância cubebina na dosagem de 20 mg/Kg tratados oralmente, obtivemos um valor de $38,61 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) para a área e $21,96 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$) para o perímetro. Já para o grupo de animais tratados com a dosagem de 50 mg/Kg obtivemos um valor de área de $37,89 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) e de perímetro de $21,77 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$).

Ainda na Tabela 5, constatou-se que ocorreu hipertrofia dos núcleos das células do fígado do grupo de animais infectados e não tratados (área $58,50 \mu\text{m}^2$ e perímetro $27,21 \mu\text{m}$) comparados aos valores do grupo dos animais não infectados (área $36,73 \mu\text{m}^2$ e perímetro $21,35 \mu\text{m}$).

Os melhores resultados cariométricos foram observados para as células do fígado, onde ocorreu uma melhora de 63% no parâmetro nuclear relacionado à área, para o grupo de tratamento com a cubebina na dosagem de 50 mg/Kg pela via oral, em relação ao grupo de animais infectados e não tratados. Estes dados podem indicar que a cubebina exiba um efeito hepatoprotetor, fato este também relatado por Yoshitake et al., (1989) onde foi constatado que a cubebina é um agente ativo com alta satisfação para tratamento de doenças hepáticas além de excelente ação protetora.

Tabela 5. Parâmetros nucleares do fígado de animais infectados em fase crônica com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do fígado			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	58.50±9.86	9.32±0.99	7.96±0.79	27.21±2.35
CNI	36.73±12.30	7.32±1.41	6.24±1.05	21.35±6.65
Cub20 IP	41.00±13.06***	7.44±1.04**	6.88±1.30***	22.52±3.46***
Cub20oral	38.61±9.45***	7.28±0.89**	6.68±0.99***	21.96±2.66***
Cub50IP	38.64±10.26***	7.80±1.22**	6.24±0.88***	22.15±2.91***
Cub50oral	37.89±9.44***	7.36±0.95**	6.48±0.82***	21.77±2.60***
Hinok20IP	44.97±10.02***	7.96±1.02**	7.00±0.82***	23.54±2.84***
Hinok20oral	43.54±11.37***	7.76±1.01**	7.04±1.02***	23.27±3.04±***
Hinok50IP	43.67±8.21***	8.04±0.84**	6.88±0.78***	23.49±2.17***
Hinok50oral	41.97±10.31***	7.68±0.95**	6.88±0.93***	22.90±2.72***
Bzn20IP	56.96±16.08	8.92±1.35**	8.00±1.08	26.61±3.66
Bzn20oral	51.65±12.73*	8.64±1.08**	7.52±1.05	25.43±3.10
Bzn50IP	54.54±12.58	8.96±1.10**	7.68±1.03	26.20±2.97
Bzn50oral	48.38±15.22***	8.48±1.58**	7.12±1.01***	24.57±3.92***

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral –infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral; Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Pode ser observado nas Tabelas 3, 4 e 5 um aumento dos valores dos parâmetros nucleares da área, do diâmetro maior e menor e do perímetro do grupo de animais infectados sem tratamento quando comparados ao grupo controle de animais não infectados, indicando desta forma que o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* provoca uma hipertrofia das células dos órgãos infectados.

O mesmo não acontece com outras cepas de *T. cruzi*. Sala et al., (2008) ao avaliarem cariometricamente as alterações causadas por diferentes cepas de *T. cruzi*, nas placentas de ratas, observaram que as cepas Y e Bolívia provocaram diminuição do volume do núcleo das células trofoblásticas gigantes e não causaram alterações de tamanho e da forma dos núcleos das células trofoblásticas da zona esponjosa. Já para as cepas Colombiana e RC, ocorreu um aumento significativo do tamanho nuclear dos trofoblastos da zona esponjosa e diminuição do volume nuclear das células trofoblásticas gigantes.

De um modo geral, os resultados apresentados pelos grupos de tratamento propostos, na fase crônica, mostraram-se expressivamente mais satisfatórios que aqueles apresentados pelos grupos de tratamento com o benzonidazol, confirmando mais uma vez, como observado pela metodologia da caracterização da β -galactosidase em nosso trabalho, que esta substância apresenta baixa atividade na fase crônica da doença de Chagas.

4.3.2. Fase aguda

Para avaliação do estudo morfométrico da fase aguda foram avaliados os cortes histológicos obtidos a partir dos grupos: controle infectado sem tratamento; controle não infectado; grupo de tratamento com a cubebina e a hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg em duas vias de administração, oral e intraperitoneal. Foram avaliados os seguintes parâmetros nucleares: área, diâmetro maior, diâmetro menor e perímetro, do baço, fígado e coração.

A Tabela 6 representa os valores dos parâmetros nucleares médios do baço dos animais tratados na fase aguda da doença. Observando-se os valores dos parâmetros nucleares podemos relatar um aumento dos núcleos das células dos animais infectados e não tratados quando comparados aos valores do grupo de animais não infectados.

Ao analisar os grupos de tratamento, destaca-se o grupo de animais tratados com a cubebina na dosagem de 50 mg/Kg pela via oral de tratamento. O valor da área para este grupo de tratamento ficou em torno de $9,31 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) e do perímetro $10,85 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$), resultados estes muito relevantes visto que para o grupo de animais infectados os valores para a área e o perímetro foram $10,85 \mu\text{m}^2$ e $11,76 \mu\text{m}$, respectivamente.

Para este órgão, além dos resultados apresentados para a substância cubebina, também podemos destacar os resultados apresentados para a substância hinoquinina, ao contrário do observado na fase aguda da infecção. Os resultados médios obtidos para a área foram de $9,32 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) e $10,90 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$), para o grupo de animais na dosagem de 20 mg/Kg pela via oral de tratamento (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros nucleares do baço de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do baço			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	10.86±2.45	4.09±0.52	3.36±0.54	11.76±1.32
CNI	8.12±2.04	3.51±0.55	2.93±0.47	10.16±1.25
Cub20 IP	9.33±2.38**	3.76±0.57	3.13±0.50	10.7±1.38**
Cub20oral	9.63±2.48*	3.81±0.48	3.19±0.56	11.04±1.38
Cub50IP	9.60±3.02*	3.76±0.69	3.57±0.82	10.92±1.74*
Cub50oral	9.31±2.47**	3.72±0.56	3.16±0.55	10.85±1.41**
Hinok20IP	9.72±2.48*	3.80±0.52	3.23±0.53	11.08±1.38
Hinok20oral	9.32±2.22**	3.79±0.55	3.12±0.52	10.90±1.30*
Hinok50IP	10.55±2.71	3.91±0.50	3.40±0.59	11.51±1.47
Hinok50oral	10.00±2.68	3.87±0.53	3.25±0.57	11.22±1.50
Bzn20IP	9.02±2.53**	3.69±0.59	3.07±0.47	10.66±1.48**
Bzn20oral	9.69±2.50**	3.71±0.59	3.29±0.49	11.02±1.45
Bzn50IP	9.36±2.50**	3.72±0.58	3.17±0.53	10.87±1.46**
Bzn50oral	9.62±2.37**	3.75±0.52	3.24±0.49	11.00±1.36

* p<0,05 **p<0,01

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20 IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral - infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral; Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Avaliando-se os dados da Tabela 7, podemos observar um valor aumentado para todos os parâmetros analisados do grupo de animais infectados e sem tratamento, em relação ao grupo de animais não infectados. Ao analisar os grupos de tratamento destacam-se a substância cubebina na dosagem de 50 mg/Kg pela via intraperitoneal e a substância hinoquinina na mesma dosagem e via de administração.

Para o grupo de tratamento com a cubebina obtivemos um valor de $15,43 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) para a área e $16,61 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$) para o perímetro. Já para o grupo de animais tratados com a hinoquinina obtivemos um valor de área de $15,59 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$) e de perímetro de $15,72 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$).

Estes valores dos parâmetros nucleares apresentados para o coração dos animais tratados com a cubebina e a hinoquinina são considerados estatisticamente significativos uma vez que estão próximos aos valores apresentados pelo grupo de animais não infectados. Para este grupo obtivemos um valor de $15,05 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) para a área e $15,39 \mu\text{m}$ ($p < 0,01$) para o perímetro. Para o grupo de animais infectados e não tratados os valores encontram-se aumentados (área $18,20 \mu\text{m}^2$ e perímetro $16,81 \mu\text{m}$), mostrando que ocorreu um aumento nuclear para as células do tecido cardíaco dos animais infectados.

As alterações teciduais dependem do tropismo da cepa e, conseqüentemente, do maior grau de parasitismo dos diferentes setores do organismo. Na infecção com as cepas de Tipo II, conforme a classificação estabelecida por Andrade et. al. (1976), cuja parasitemia tem um curso mais lento entre o 12º e o 20º dia, como é o caso do clo ne B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, cepa esta utilizada em nosso trabalho, as lesões

predominantes ocorrem no miocárdio na fase aguda, com acentuado parasitismo das células cardíacas.

Tabela 7. Parâmetros nucleares do coração de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do coração			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	18.20±8.81	5.85±1.44	3.84±1.23	16.81±3.88
CNI	15.05±8.64	6.16±1.63	3.67±1.13	15.39±4.12
Cub20 IP	18.36±8.59	6.67±1.86	3.45±1.00	18.42±4.60
Cub20oral	18.47±10.34	6.36±1.88	3.61±1.27	18.82±4.76
Cub50IP	15.43±6.18***	5.95±1.62	3.31±0.93	16.61±3.87**
Cub50oral	17.60±6.56**	6.20±1.37	3.64±1.23	17.47±3.27
Hinok20IP	19.05±8.62	6.55±1.51	3.68±1.24	18.32±3.77
Hinok20oral	17.48±8.53**	6.09±1.85	3.60±1.25	17.44±4.59
Hinok50IP	15.59±5.78***	5.47±1.13	3.61±0.97	15.72±2.84***
Hinok50oral	18.56±7.74	6.27±1.51	3.73±1.08	17.70±3.77
Bzn20IP	16.49±6.08**	6.13±1.68	3.45±1.02	17.16±3.95
Bzn20oral	17.59±7.08**	6.56±1.53	3.41±1.00	18.14±3.69
Bzn50IP	24.93±10.00	6.96±1.51	4.49±1.21	19.93±3.92
Bzn50oral	20.42±10.75	6.43±1.66	3.93±1.15	18.23±4.34

p<0,01 *p<0,001

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20 IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral –infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral;

Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Observando a Tabela 8, onde estão expressos os valores dos parâmetros nucleares médios do fígado para a fase aguda, verificamos melhores resultados para os grupos de animais tratados oralmente e intraperitonealmente com a cubebina na dosagem de 50 mg/Kg.

Para o grupo de animais tratados oralmente com a substância cubebina, na dosagem de 50 mg/Kg, obtivemos um valor de $28,75 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) para a área e $18,61 \mu\text{m}$ ($p < 0,01$) para o perímetro. Já para o grupo de animais tratados intraperitonealmente com a dosagem de 50 mg/Kg obtivemos um valor de área de $28,36 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,01$) e de perímetro de $18,77 \mu\text{m}$ ($p < 0,01$).

Observamos ainda, pela análise da Tabela 8, que ocorreu hipertofia dos núcleos das células do fígado do grupo de animais infectados e não tratados (área $32,99 \mu\text{m}^2$ e perímetro $20,30 \mu\text{m}$) comparados aos valores do grupo dos animais não infectados (área $28,56 \mu\text{m}^2$ e perímetro $18,54 \mu\text{m}$).

Tabela 8. Parâmetros nucleares do fígado de animais infectados em fase aguda com o clone B5 da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* (teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros nucleares do fígado			
	Área(μm^2)	Diâmetro maior(μm)	Diâmetro menor(μm)	Perímetro(μm)
CINF	32.99±7.78	6.81 ±0.83	6.09±0.84	20.30±2.42
CNI	28.56±5.69	6.39±0.77	5.65±0.63	18.54±1.93
Cub20 IP	33.83±7.81	6.79±0.90	6.28±0.75	20.54±2.39
Cub20oral	29.12±6.95**	6.31±0.82	5.81±0.77	19.06±2.28**
Cub50IP	28.36±8.08***	6.29±0.98	5.64±0.85	18.77±2.70***
Cub50oral	28.75±7.16***	6.25±0.82	5.57±0.82	18.61±2.39***
Hino20IP	31.32±7.12	6.60±0.82	5.99±0.73	19.80±2.19
Hino20oral	30.15±7.90	6.55±0.90	5.79±0.81	19.41±2.48
Hino50IP	32.18±8.06	6.67±0.91	6.07±0.79	20.02±2.50
Hino50oral	30.50±7.49	6.52±0.89	5.88±0.82	19.51±2.47
Bzn20IP	31.16±7.62	6.65±0.95	5.89±0.73	19.74±2.44
Bzn20oral	29.46±8.03**	6.43±0.87	5.75±0.84	19.15±2.55*
Bzn50IP	30.70±8.45	6.51±0.95	5.91±0.93	19.52±2.77
Bzn50oral	28.56±6.45***	6.24±0.79	5.77±0.71	18.89±2.16***

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

CINF - controle infectado sem tratamento; CNI - controle não infectado; Cub20 IP; Cub20oral; Cub50IP; Cub50oral - infectados tratados com a cubebina nas dosagens de 20 e 50 mg/Kg pelas vias intraperitoneal e oral; Hino20 IP; Hino20oral; Hino50IP; Hino50oral - infectados tratados com hinoquinina nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral; Bzn20IP; Bzn20oral; Bzn50oral - infectados tratados com benzonidazol nas dosagens de 20 e 50 mg/kg pelas vias intraperitoneal e oral

Alterações morfológicas no fígado durante a infecção aguda e crônica causada por *Trypanosoma cruzi* têm sido muito bem demonstradas, tanto em pacientes chagásicos como em animais experimentais, a exemplo de hepatomegalias, colonizações das amastigotas nas células de Kupffer e hepatócitos, e relevantes presenças de infiltrados inflamatórios (SEKI et al., 2000; SARDINHA et al., 2006)

O grau de infecção do fígado parece depender do tipo de cepa de *T. cruzi* inoculada no hospedeiro vertebrado. Nunes et al. (1992), em trabalho experimental em camundongos, relataram que a intensidade do parasitismo hepático é maior com a cepa Y do que com a cepa Colombiana de *T. cruzi*, de características morfométricas e filogenéticas distintas.

Ao analisar os resultados apresentados dos parâmetros nucleares para os órgãos em estudo, observa-se que os grupos de tratamento com as substâncias cubebina e hinoquinina mostraram-se estatisticamente satisfatórios em relação ao grupo de animais infectados e não tratados.

Porém ao contrário dos dados apresentados para a fase crônica, os grupos de animais tratados com o benzonidazol também mostraram efeitos significativos na fase aguda, dado este já esperado uma vez que esta ainda é o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas na fase aguda da infecção.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Pela avaliação dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Com relação à parasitemia, utilizada para avaliar a atividade biológica das substâncias na fase aguda, cubebina e hinoquina, apresentaram redução do número de parasitas circulantes comparadas ao controle negativo. Para o tratamento pela via oral observou-se melhor resultado para a substância cubebina na concentração de 20 mg/Kg, apresentando uma porcentagem de redução da parasitemia de 80,7% comparado ao controle negativo. Para o tratamento pela via intraperitoneal, mais uma vez obtivemos um melhor resultado para a cubebina na mesma concentração, com um valor de redução da parasitemia de 62,2%.
- Se tratando da análise por caracterização de β -galactosidase, utilizada para avaliar as mesmas substâncias na fase crônica da doença, os resultados demonstraram uma atividade promissora, demonstrando melhores resultados que o controle positivo, o benzonidazol. Para o fígado um melhor resultado foi observado para a substância cubebina na concentração de 50 mg/Kg pela via oral de tratamento, com uma porcentagem de 68,2% de redução do parasitismo tecidual em relação ao controle negativo. Para o baço o melhor resultado foi atingido pela cubebina na mesma dosagem e via de administração, com uma redução de 82% do parasitismo tecidual. No coração o melhor resultado foi mais uma vez para a cubebina nas mesmas condições que os outros órgãos com redução de 77,4%.

- Nos resultados apresentados pela análise cariométrica, os grupos de tratamento com as substâncias cubebina e hinoquinina apresentaram valores próximos ao controle não infectado, mostrando que ocorreu uma resposta celular positiva dos grupos tratados comparado ao controle infectado. Na fase crônica da infecção os melhores resultados foram observados no grupo de tratamento com a cubebina na dosagem de 50 mg/Kg pela via oral. Para a fase aguda também obtivemos bons resultados para a cubebina na mesma concentração, entretanto também a hinoquinina mostrou-se efetiva na concentração de 50 mg/Kg pela via oral e intraperitoneal.
- No geral, os resultados apresentados pela cubebina e a hinoquinina em nosso trabalho na fase aguda e crônica mostrou que estas lignanas podem ser consideradas potenciais promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains insome types. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v.18, p.140-44, 1976.

AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Lignans. **Chemical, Biological and Clinical Properties**, England, v.5, p. 402-409, 1990.

BASTOS, J. K.; GOTTLIEB, O. R.; SARTI, J. S.; FILHO, D. S. Isolation of lignans and sesquiterpenoids from leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Natural product letters**, Englands, v. 9, p. 65–70, 1996.

BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, Germany, v. 65, p.1-4, 1999.

BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T.; SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, Irland, v. 75, p. 279–82, 2001.

BELLOTTI, G.; BOCCHI,E.; E. MORAES, A. V.; HIGUCHI, M. L.; BARBERO-MARCIAL, M.; SOSA, E.; ESTEVES-FILHO, A.; KALIL, R.; WEISS,R.; JATENE, A.; PILEGGI, F.. *In vivo* detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **American heart journal**, United States, v. 131, p. 301–307. 1996.

BEN YOUNES-CHENNOUFI, A. M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, V.; TRICOTTET, H. EISEN, M. REYNES, G. S. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v. 82, p.77–83, 1988.

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

BOCK, M.; HABERKORN, A.; HERLINGER, H.; MAYER, K.H.; PETERSEN, S. The structure-activity relationship of 4-5' – nitrofurfurylidene – amino –

tetrahydro - 4H - 1,4 – thiazine -1,1-dioxides active against *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittel-Forschung**, Germany, v. 22, p. 1564-9, 1972.

BOGLIOLO, A.R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C. Polymorphism in *Trypanosoma cruzi*: evidences of genetic recombination. **Acta Tropica**. Netherlands, v.61, p.31-40, 1996.

BOZA, S. S.; CASSELS, B. K. Plants metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Médica**, Germany, v. 62, p. 98-105, 1996.

BRANDARIZ, S.; A. SCHIJMAN, A.; VIGLIANO, C.; ARTEMAN,P.; VIOTTI,R.; C. BELDJORD,C.; LEVIN, M. J. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. **Lancet**, England, v. 346, p.1370–1371, 1995.

BRAQUET, P.; GODFROID, J. J. PAF-acether specific binding sites. Design of specific antagonists. **Trends in pharmacological sciences**, England, v. 7, p. 397-403, 1986.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, Brasil, v.4, p. 389-96, 1962.

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

BUCKNER, F. S.; VERLINDE,C. M. J.; FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing b-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian journal of medical and biological research**, Brasil, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARASCO, H. J.; FRAME, I.A.; VALENTE, A.S.; MILES, M.A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, United States, v.54, p.418-424, 1996.

CHAGAS, C. “Nova tripanozomíaze humana”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, (reimpresso), v.1, p.9-80, 1909.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana - Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v.1, p. 159-218, 1909.

COIMBRA H. S.; ROYO, V. A.; de SOUZA, V. A. PEREIRAA. C. de SOUZA, G. H.; da SILVA, R.; NONATE, P. M.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K. Analgesic and anti-inflammatory activities of (-)-o benzyl cubebin, a (-)-cubebin derivative, obtained by partial synthesis. **Bollettino chimico farmaceutico**, Italy, v.143, p. 65-69, 2004.

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

COURA J. C. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v.104, p. 549-554, 2009.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da atividade química e uso em síntese de produtos biologicamente ativos e seus derivados. **Química nova**, v. 23, p. 357-369, 2000.

COX, P. A.; BALICK, M. J. The ethnobotanical approach to drug discovery. **Scientific American**, United States, v.5, p. 60-65, 1994.

DEANE, M.P. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979 - **Anais/Abstracts**, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, p.A6-A7, 1979.

DOCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, Netherlands, v.7, p.1157-1164, 2001.

ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; TOLDO, M. P.; SARAIVA, J.; AUGUSTO, M. B.; ALBUQUERQUE, S. New method for quantification of *Trypanosoma cruzi* in animal's tissue in the chronic phase of experimental Chagas' disease. **Parasitology research**, 2010.

EUGUI, E. M.; DELUSTRO, B.; ROUHAFZA, S.; ILNICKA, M.; LEE, S. W.; WIHELM, R.; ALISO, A. C. Some antioxidants inhibit, in a co-ordinate fashion, the production of tumor necrosis factor- α , IL- β and IL-6 by human peripheral

blood mononuclear cells. **International Immunology**, England, v. 6, p. 409-422, 1994.

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosome cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Unites States, v. 58, p. 807-811, 1998.

GHOSAL, S.; BANERJEE, S.; FRAHM, A. W. Prostalidin-A, Prostalidin-B, Protaslidun-C and retrochinensin-new anti-depressant – 4-ARYL-2,3-naphthalide lignans from justicia-prostata. **Chemistry & industry**, England, v. 23, p. 854-855, 1979.

GRUMBERG, E.; BESKID, G.; CLEELAND, R.; DE LORENZO, W.F.; TITSWORTH, E.; SCHOLER, H.J.; RICHLE, R.; BRENER, Z. Anti-protozoan and antibacterial activity of 2-nitorimidazole derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v.2, p.513-9, 1968.

HIGUCHI, M. L.; de Brito, M. M. REIS, A. BARBOSA, G. BELLOTTI, A. C.; PEREIRA-BARRETO, F. 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, United States, v. 2, p. 101–106, 1993.

IANNI, B, M.; MADY,C. The sugarcane juice was delicious, but... **Arquivos brasileiros de cardiologia**, Brasil, v. 85, p.379-381, 2005.

IGWEH, A. C.; AGUIVI, J. C.; OKWUASABA, F. K. Antitrypanosomal effect of the aqueous extract of *Brassica oleracea*. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 73, p. 17-21, 2020.

KADOTA, S.; TSUBONO, K.; MAKINO, K.; TAKESHITA, M.; KIKUCHI, T. Convenient synthesis of magnoshinin, an antiinflammatory neolignan. **Tetrahedron letters**, Englands, v. 28, p. 2857-2860, 1987.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, United States, v. 51, p. 29-33, 1999.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v.55, p.147-53, 1992.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today**, England, v.14, p. 119-24, 1998.

MARQUEZ-MARTIN, A.; DE LA PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; YAQOOB, P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomaceoil in human mononuclear cells. **Cytokine**, United States, v. 36, p. 211-217, 2006.

MUELLAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J. MARTINEZ-DIAS, R. A.; ESCARIO, J. A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; GOMES-BARRIO, A. In vitro screening of american plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and trichomonas vaginalis. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 71, p. 101-107, 2000.

NUNES, M. P.; SOBRAL, A. C.; COUTINHO, S. G. Quantification of *Trypanosoma cruzi* in heart, lymph nodes and liver of experimentally infected mice, using limiting diluting analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 87, p. 503-509, 1992.

NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J.L.P.; NUSSENZWEIG, R.S.; KLOETZEL, J. Ação de corantes trifenílmetânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro. Emprego da violeta-de-genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. **Hospital**, v. 44; p. 731-44, 1953.

PEDROSA, R. C.; DE BEM, A. F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R. C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox report : communications in free radical research**, England, v. 6, p. 265-270, 2001.

POZAS, RR.; CARBALLO, J.; CASTRO, C.; RUBIO J. Syntesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, England, v. 15, p. 1417-1421, 2005.

RIBEIRO, R.D. & BELDA NETO, F.M. Estudo morfológico de subamostras do *Trypanosoma cruzi*. II - Estudo micrométrico de tripomastigotas sanguícolas das subamostras Bolívia SN e Bolívia SD. In: JORNADA FARMACÊUTICA, 30ª, Araraquara, 1983. **Resumos**, Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, p. 31,1983.

RIBEIRO, R.D.; FERRIOLI FILHO, F. & BELDA NETO, F.M. Comportamento de subamostras do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiro vertebrado e invertebrado. **Revista brasileira de biologia**, Brasil, v. 42, p. 51-4, 1982.

RIMANDO AM, PEZZUTO JM, FARNSWORTH NR; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, T.; KAWANISHI, K. New lignans from *Anogeissus acuminata* with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Journal of natural products**, United States, v. 57, p. 896-904, 1994.

RODRIGUES, E.R. Estudos pré-clínicos de possíveis efeitos adversos da Cubebina. Ribeirão Preto, 2002. (Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP).

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of anti-infective therapy**, England, v.5, p. 727-743, 2007.

ROMAÑA, C.; MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo do “*Schizotrypanum cruzi*” em cultura de tecidos de embrião de galinha. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v.37, p.19-27, 1942.

SALA, M.A.; LOPES, R. A.; ABRAHÃO, A. A. C.; MENEGUETTE, C.; ALBUQUERQUE, S.; RIBEIRO, R. D. Estudio cariométrico de placentas de ratones com infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. **International journal of morphology**, Chile, v. 26, p. 623-627, 2008.

SALEEM, M.; KIM, H. J.; ALIC, M. S.; LEE, Y. S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Product Reports**, England, v. 22, p. 696-716, 2005.

SARAIVA, J.; VEGA, C.; da SILVA, R.; SILVA, M. L.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; GOMES-BARRIO, A.; ALBUQUERQUE, S. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, Germany, v. 100, p.791-795, 2007.

SARDINHA, L.R.; ELIAS, R. M. ; MARINHO, M. R. L. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, United States, v.74, p. 2031-2042, 2006.

SEKI, S. Y.; HABU, T.; KAWAMURA, K.; TAKEDA, H.; DOBASHI, T.; OHKAWA, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+T cells in T helper 1 immune responses. **Immunological reviews**, Denmark, v. 174, p. 35-46, 2000.

SHEN T. Y.; HWANG S. B.; CHANG M. N.; DOEBBER, T. W.; LAM, M. H. T.; WU, M. S.; WANG, X. ; HAN, G. Q.; LI, R. Z. Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (piper-futokadsura) specific-inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 82, p. 672-676, 1985.

SILVA, R.; DE SOUZA G H.B., DA SILVA, A. A.; DE SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; E SILVA, M. L. A.; DONATE, P. M.; MATOS, A. L. S.; CARVALHO, J. C. T. BASTOS, J. K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v. 15, p. 1033-1039, 2005.

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

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. Acritical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chaga's disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 395-398, 1993.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v.83, p.141-52, 1996.

SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v.62, p.45-52, 1993.

SOUZA, V. A.; SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G. H .B.; FILHO, A. A. S.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Tripanocidal activity of (-)- cubebin derivatives against free amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, England, v.15, p.303–307, 2005.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of natural products**, United States, v.61, p. 1053-1071, 1998.

SULSEN, V.P.; FRANK, F. M.; CAZORLA, S. I.; ANESINI, C. A.; MALCHIODI, E. L.; FREIXA, B.; VILA, R.; MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia*

tenuifolia Sprengel (Asteraceae). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v. 52, p. 2415-2419, 2008.

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

TARLETON, R. L.; ZHANG, L.; DOWNS, M. O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasitespecific response to infected host tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 94, p. 3932–3937, 1997.

TIBAYRENC, M.; ECHALAR, L.; DUJARDIN, P.; POCH, O.; DESJEUX, P. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia: New isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v.78, p.519-525, 1984.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.83, p.115-119, 1986.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.87, p.2414-2418, 1990.

THOMAS, S. M., MCPHEE, D. G. Crystal violet: a direct- acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. **Mutation research**, Netherlands, v. 140, p. 165-167, 1984.

TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L. ALVES, C. F.; MARTINS, H. R.; CRUZ, R. E.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, England, v. 53, p. 1045-53, 2004.

USIA, T.; WATABE, T.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. Metabolitecytochrome P450 complex formation by methylenedioxyphenyl lignans of *Piper cubeba*: mechanism-based inhibition. **Basic life sciences**, United States, v.76, p. 2381–2391. 2005.

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

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas” (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v.3, p.276-293, 1911.

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

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSONS, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. **International journal for parasitology**, England, v.28, p.105-112, 1998.

WHO. Chagas disease intervention development and implementation research: transfer to the WHO regional Office for Américas. I:TDRnews, n.66, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>> Acesso em: 12 janeiro de 2009.

YANG, LI-MING; LIN, SHWU-JIUAN; YANG, TSANG-HSIUNG; LEE, KUO-HSIUNG. Synthesis and anti-HIV activity of dibenzylbutirolactone lignans. **Bioorganic & Medicinal Letters**, England, v. 6, p. 941-944, 1996.

YOSHITAKE, O.; MAKOTO, I.; JUNICHI, N. Treating and preventing agent for liver disease. Patent number: JP1180824 (A), 1989.