

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CLARA PELETEIRO TEIXEIRA

O TRATAMENTO COM ÓLEORRESINA E EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS DE *Copaifera multijuga* REDUZ O PARASITISMO EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (Linhagem BeWo) INFECTADAS POR *Trypanosoma*
cruzi

UBERLÂNDIA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CLARA PELETEIRO TEIXEIRA

O TRATAMENTO COM ÓLEORRESINA E EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS
FOLHAS DE *Copaifera multijuga* REDUZ O PARASITISMO EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS HUMANAS (Linhagem BeWo) INFECTADAS POR *Trypanosoma*
cruzi

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II)
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para a conclusão do Curso de Graduação
em Biomedicina.

Área de Concentração: Parasitologia
Orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas
Barbosa
Coorientador: Msc. Guilherme de Souza

UBERLÂNDIA

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

Clara Peleteiro Teixeira

O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico de *Copaifera multijuga* reduz o parasitismo em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II) apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Biomedicina.

Área de Concentração: Parasitologia
Orientadora: Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
Coorientador: Msc. Guilherme de Souza

Data: 30/06/2023

Banca examinadora

Orientadora: Dra. Bellisa de Freitas Barbosa

Membro titular: Dra. Priscila Silva Franco (UFU)

Membro titular: Dra. Ester Cristina Borges Araújo (UFU)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Ciências Biomédicas, ICBIM)

DEDICATÓRIA

Após 4 anos e meio uma das etapas mais importantes da minha vida chega ao fim. A conclusão desse trabalho não seria possível sem o apoio de toda a minha família, obrigada por acreditarem em mim e me dar todo o suporte necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Dedico esse trabalho aos meus irmãos, Diego, Alice e Isabela, meus apoiadores e companheiros de vida. E, em especial, aos meus pais Carla e Yuri, por terem me permitido voar para longe e estarem presentes durante todo o percurso mesmo com tantos quilômetros de distância. Obrigada por sempre me incentivarem a estudar e por todas as vezes que abdicaram de suas vontades próprias para apoiar meus sonhos, confiando na educação e valores que me foram ensinados. Devo tudo a vocês e nunca conseguirei agradecer em palavras por todo o amor me dão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha orientadora, Dra. Bellisa de Freitas Barbosa, que ministrou a disciplina de Seminários I e me encantou ao falar da sua linha de pesquisa. Obrigada por me receber desde o primeiro semestre da minha graduação no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução e confiar no meu potencial para que eu pudesse continuar aprendendo ainda mais com uma Iniciação Científica. Você é um grande exemplo de ser humano, professora, orientadora e pesquisadora. Serei eternamente grata por essa oportunidade.

Agradeço ao meu coorientador, Msc. Guilherme de Souza, por toda a paciência e disponibilidade em me ensinar, antes mesmo de se tornar meu coorientador. Agradeço por entender meus horários corridos no final da graduação, por todos os feriados e finais de semana que precisamos fazer os experimentos e por me ensinar tudo em relação à organização no laboratório, sobre a cultura, experimentos, análises estatísticas e etc. Saiba que te admiro muito e vou levar seus ensinamentos e conselhos sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre iluminar meu caminho e me dar forças nos momentos em que precisei para que eu pudesse concluir essa trajetória.

Agradeço à Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório.

Não poderia deixar de agradecer a todos os pesquisadores Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução. Obrigada por me ensinarem tanto e por tornarem o laboratório um lugar tão bom de se trabalhar. Em especial, Aryani, Joed, Alessandra, Luana, Guilherme Faria, Samuel e Marina, vocês foram essenciais em minha trajetória, obrigada por toda a ajuda, ensinamentos, acolhimento e risadas. Foi um prazer compartilhar tantos momentos com vocês!

Agradeço a todos os professores que tive durante a graduação e que contribuíram para a minha formação. Em especial, professora Paula Cristina Batista de Faria Gontijo, que confiou em mim para ser monitora da disciplina de Genética e por quem tenho muita admiração. Obrigada pelos ótimos momentos partilhados na Liga Acadêmica de Genética Médica, pelos ensinamentos e pela confiança.

Agradeço à ENACTUS, por todos os ensinamentos que pude ter e, principalmente, pelas pessoas que pude conhecer e amigos que levarei para sempre comigo.

Agradeço aos meus amigos de curso, nossos momentos de risada e desabafos no RU e após as aulas foram essenciais para trazer leveza à rotina cansativa. E a todos os amigos que fiz e aos que mantive durante esses anos, o apoio, compreensão e incentivo de vocês desempenharam um papel significativo no meu crescimento.

A minha psicóloga, Thais, por todos os momentos de suporte e desenvolvimento psicológico compartilhados durante momentos tão importantes desse caminho.

À Universidade Federal de Uberlândia, que me recebeu e foi tão importante para meu conhecimento e crescimento, e da qual tenho um imenso orgulho.

Agradeço a CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que passaram pela minha vida e direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada!

Meus agradecimentos finais à uma pessoa especial, que foi crucial para que eu pudesse chegar até aqui: Gustavo Marques, por todo o apoio diário, por me ouvir sempre com atenção, pela paciência em momentos estressantes, por acreditar em mim quando achei que não seria capaz e por estar presente em todos os momentos.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário intracelular obrigatório causador da Doença de Chagas. A forma congênita da doença é representada pela passagem do parasito pela barreira placentária, caracterizando a doença de Chagas congênita (DCC) que pode levar a sequelas graves no feto em desenvolvimento. O tratamento atual é feito com nifurtimox ou benznidazol, mas apresenta desvantagens por não serem totalmente eficazes e causarem efeitos colaterais, sendo necessário a busca por novas estratégias terapêuticas. Nesse sentido, muitos estudos têm demonstrado o potencial de diferentes compostos do gênero *Copaifera* no controle de doenças parasitárias, no entanto, não existem estudos que demonstrem sua atividade antiparasitária contra *T. cruzi* na interface materno-fetal humana. Assim, esse trabalho teve como objetivo principal avaliar a ação *in vitro* da óleoresina (OR) e extrato hidroalcoólico das folhas (EH) de *Copaifera multijuga* na infecção por *Trypanosoma cruzi* em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo). Nós observamos que a OR e o EH diminuíram a viabilidade das células e dos tripomastigotas de *T. cruzi* apenas nas maiores concentrações. Em adição, o tratamento com ambos os compostos em concentrações não citotóxicas reduziu a proliferação e liberação de tripomastigotas no sobrenadante. Além disso, observamos que o pré-tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* foi capaz de alterar a morfologia do parasito, comprometendo sua capacidade de invadir e proliferar em células BeWo. Observamos também que o tratamento com OR diminuiu a produção de ROS em células BeWo infectadas, enquanto que o EH induziu um aumento. Assim, concluímos que a OR e o EH de *C. multijuga* foram eficazes no controle da invasão, proliferação e disseminação de *T. cruzi* em célula BeWo, destacando o possível potencial terapêutico desses compostos para o tratamento da DCC.

Palavras chave: Tratamento fitoterápico, Copaíba, Placenta, Doença de Chagas congênita.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is an obligate intracellular protozoan that causes Chagas disease. The congenital form of the disease is represented by the passage of the parasite through the placental barrier, characterizing congenital Chagas disease (CCD), which can lead to fetal abnormalities and miscarriage. The current treatment is carried out with nifurtimox or benznidazole, but they are not fully effective and cause side effects, being necessary to find out new therapeutic strategies. In this sense, many studies have shown the potential of *Copaifera* spp. in the treatment of parasitic diseases, however, there are no studies that demonstrate their antiparasitic activity against *T. cruzi* at the human maternal-fetal interface. Thus, we aimed to evaluate the effect of oleoresin (OR) and leaf hydroalcoholic extract (EH) from *Copaifera multijuga* on *Trypanosoma cruzi* infection in human villous trophoblast cells (BeWo lineage). We observed that the OR and the EH reduced BeWo cells and *T. cruzi* trypomastigotes viability only at the highest concentrations. In addition, treatment with both compounds at non-cytotoxic concentrations reduced the *T. cruzi* proliferation and trypomastigotes release in the supernatant. Furthermore, we observed that the pre-treatment of *T. cruzi* trypomastigotes was able to cause changes in the parasite's morphology, compromising its ability to invade and proliferate in BeWo cells. We also observed that treatment with OR downmodulated ROS production in infected BeWo cells, while EH upregulated ROS production. Thus, we conclude that the OR and the EH from *C. multijuga* were effective in controlling the invasion, proliferation and dissemination of *T. cruzi* in BeWo cells, highlighting the therapeutic potential of these compounds for the treatment of CCD.

Key-words: Herbal treatment, Copaiba, Placenta, Congenital Chagas disease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : características gerais.....	12
1.2. Doença de Chagas	14
1.4. Resposta imunológica.....	17
1.5. Diagnóstico.....	18
1.6. Tratamento.....	19
1.7. Plantas medicinais com ação antiparasitária	20
1.8. <i>Copaifera multijuga</i>	21
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. Coleta da óleoresina e do extrato hidroalcoólico de <i>C. multijuga</i>	27
4.2. Cultivo de células e parasito.....	27
4.3. Ensaio de viabilidade celular.....	28
4.4. Ensaio de viabilidade de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
4.5. Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. cruzi</i> e liberação de tripomastigotas no sobrenadante	29
4.6. Ensaio de invasão e proliferação de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> pré-tratados com óleoresina e extrato hidroalcoólico de <i>C. multijuga</i>	30
4.7. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio	31
4.8. Análise da morfologia de tripomastigotas tratados com OR e EH de <i>C. multijuga</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	32
5. RESULTADOS	33

5.1. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* foram tóxicos para as células BeWo e tripomastigotas de *T. cruzi* apenas nas maiores concentrações

33

5.2. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* reduziram a proliferação intracelular de *T. cruzi* em células BeWo..... 34

5.3. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* reduziram a liberação de tripomastigotas no sobrenadante de células BeWo 36

5.4. O pré-tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* altera a morfologia do parasito, comprometendo sua capacidade de invadir e proliferar em células BeWo..... 37

5.5. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* modularam a produção de ROS em células BeWo..... 39

6. DISCUSSÃO 40

7. CONCLUSÃO..... 44

REFERÊNCIAS 45

ANEXOS 54

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*: características gerais

Trypanosoma cruzi é um protozoário intracelular obrigatório hemoflagelado que pertence à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014), descoberto em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, que descreveu o vetor do parasito (insetos triatomíneos), também conhecido popularmente na América Latina como barbeiro, e o ciclo de vida da doença, sendo posteriormente nomeada como doença de Chagas (DC) em sua homenagem (CHAGAS, 1909; BONNEY, 2014).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxênico, ou seja, envolve um hospedeiro intermediário (insetos triatomíneos), e um hospedeiro definitivo, os mamíferos, como os humanos e mais de 120 espécies, tanto domésticos quanto selvagens (cães, gatos, roedores e tatus) (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). O parasito possui três formas evolutivas, uma em cada fase do ciclo: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (KEMMERLING *et al.*, 2019; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

A transmissão de *T. cruzi* pode ocorrer através do barbeiro, que ao sugar o sangue de um hospedeiro pode liberar fezes contaminadas com o parasito no local da picada, possibilitando a entrada de *T. cruzi* pela pele ou uma superfície mucosa (ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021). No entanto, outras formas de infecção podem ocorrer, como transfusão de sangue, transplante de órgão e medula óssea, acidentes de laboratório, consumo de alimentos e bebidas contaminados e transmissão congênita (RIOS *et al.*, 2020). A transmissão oral pode estar associada principalmente com o consumo de bebidas à base de frutas, água ou vegetais contaminados com fezes do barbeiro, com o parasito completo ou secreções de mamíferos infectados ou ainda pelo consumo de carne mal cozida de animais infectados, ou sangue de alguns reservatórios do parasito, como o tatu (*Dasypus* spp.) (RUEDA, 2014).

No hospedeiro intermediário, *T. cruzi* se desenvolve no intestino em uma forma replicativa extracelular e não infecciosa, o epimastigota. Esses epimastigotas migram para a região do intestino posterior do triatomíneo e se diferenciam em tripomastigota metacíclico, que é a forma infecciosa e não replicativa do parasito liberada nas fezes do vetor. Quando esses tripomastigotas entram no organismo do hospedeiro mamífero através da ferida na pele ou mucosas, eles infectam as células (principalmente o fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, SNC e músculos esqueléticos e cardíacos) e se diferenciam em amastigotas, que é a forma replicativa intracelular. Esses amastigotas no citoplasma da célula multiplicam e se diferenciam

em tripomastigotas sanguíneos, sendo liberados para o meio extracelular e para a corrente sanguínea, se disseminando pelo corpo e infectando novas células (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

A membrana plasmática do *T. cruzi* é composta por uma bicamada lipídica, na qual várias proteínas estão "imersas". Seus principais componentes são proteínas que estão distribuídas irregularmente devido ao seu deslocamento pela bicamada lipídica, e fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina (mais prevalente), fosfatidiletanolamina, e fosfatidilinositol, e em menor quantidade esfingomiéline, fosfatidilserina, cardiolipina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol fosfato e fosfatidilinositol bifosfato (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2007).

Na superfície externa observa-se um revestimento celular desenvolvido, três vezes mais espesso nos tripomastigotas do que nos epimastigotas. A presença de ácido siálico associado a glicopeptídeos desempenha um papel importante na interação *T. cruzi*/macrófago (MARTINEZ-DIAZ *et al.*, 2001). No lado interno da membrana, observam-se muitos microtúbulos, estendendo-se de uma extremidade à outra do flagelo (DANTAS; BARBOSA; DE CASTRO, 2003).

O citoplasma do *T. cruzi* apresenta diferentes organelas (DIAS; COURA, 1997; DE SOUZA, 2008), dentre elas, a mitocôndria tubular única, que apresenta paredes e cristas irregulares, com aspecto que depende do estágio evolutivo analisado, tendo como elemento limitante uma dupla membrana mitocondrial. A mitocôndria apresenta íntima relação com o cinetoplasto, sendo na verdade considerados como a mesma estrutura, havendo continuidade entre as paredes de ambas as organelas. O cinetoplasto, estrutura peculiar à ordem Kinetoplastida, contém altas concentrações do DNA extranuclear do parasito, conhecido como cinetoplástico ou k-DNA. Ao contrário de outras ordens de eucariotos, que apresentam cerca de 1% do DNA celular na mitocôndria, o *T. cruzi* pode concentrar entre 16 a 30% de seu DNA total no genoma mitocondrial (COURA, 2013).

Embora a reprodução do *T. cruzi* seja principalmente clonal (não sexual), o parasito apresenta uma ampla diversidade genética e bioquímica (ZINGALES *et al.*, 2009). Um dos esquemas de classificação utilizados atualmente são as unidades de tipagem discretas (DTUs), baseadas em genotipagem multilocus, as quais foram denominadas TcI - TcVI. Ademais, há alguns anos, isolados de *T. cruzi* de morcegos brasileiros não agrupados em nenhuma das seis DTUs foram descobertos, sendo então adicionado o genótipo Tcbat (MARCILI *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2015). Diferenças comportamentais e de virulência entre DTUs são atribuídas à interação entre o ambiente, o hospedeiro e o vetor (DE FUENTES *et al.*, 2019). Sendo assim, foi visto que TcI é a mais abundante e amplamente dispersa na Amazônia, nas Américas (a

infecção humana por TcI é concentrada no norte da América do Sul e Central), podendo ser encontrada em toda a distribuição do vetor triatomíneo e também relacionada às espécies silvestres e ciclos domésticos, além de estar associada à cardiomiopatia chagásica em humanos e meningoencefalite em pacientes imunocomprometidos (ZINGALES *et al.*, 2012; ZINGALES *et al.*, 2018). Já TcII predomina no Leste e centro do Brasil (ZINGALES *et al.*, 2012); associada principalmente com ciclos de transmissão domésticos, e presentes nos vetores *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*. Frequentemente causa cardiomiopatia e mega síndromes digestivas (megaesôfago e megacólón) (MESSENGER *et al.*, 2015).

1.2. Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma zoonose originalmente localizada na América do Sul e Central, mas devido à migração de pessoas infectadas, atualmente é considerada uma doença mundial e um importante problema de saúde pública também nos Estados Unidos, Canadá, Japão e Europa (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RAMÍREZ-TOLOZA *et al.*, 2020; RIOS *et al.*, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, e quase 100 milhões estão em risco de infecção, registrando a maioria dos casos em regiões endêmicas de 21 países da América Latina (OMS, 2020).

Em 2005, a OMS reconheceu a doença de Chagas como uma doença tropical negligenciada, o que levou a um maior reconhecimento da doença como um problema de saúde pública internacionalmente. Desde o início da década de 1990, as medidas mais eficazes para o controle da doença de Chagas na América Latina tem sido programas de controle de vetores e teste compulsório em bancos de sangue (OMS, 2002). Na década de 1980 foi quando se observou um pico da DC e estima-se que o número de mortes anuais caiu de 45.000 em 1990 para 2.000 mortes por ano atualmente, evidenciando que a DC permanece sendo um grave problema público de saúde, apesar da significativa diminuição ao longo dos anos (OMS, 2002; DIAS; PRATA; CORREIA, 2008; MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Com as medidas de controle da doença, a prevalência diminuiu consideravelmente e a transmissão vetorial foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e em grande parte do Brasil em 2000 (OMS, 2002; SALVATELLA *et al.*, 2014). No entanto, a frequência de transmissão oral aumentou em regiões como a bacia amazônica (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A DC apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda é marcada por alta parasitemia e dura de 2-3 meses, sendo assintomática na maioria dos casos. No entanto, 10-30% dos indivíduos infectados podem manifestar sintomas inespecíficos durante a fase aguda,

incluindo febre moderada, mal-estar, cefaleia, anorexia, diarreia, mialgia, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, edema generalizado ou local (nos membros ou face), erupção cutânea, manifestações hemorrágicas, icterícia, miocardite, taquicardia, arritmias, bloqueio atrioventricular e, em pequena porcentagem, meningoencefalite (BOCCHI *et al.*, 2017).

Em geral, se a transmissão foi vetorial, no local onde o barbeiro picou o hospedeiro, um chagoma aparece, chamado “sinal de Romana” se estiver localizado nas mucosas oculares. Nesta fase, o parasito assume a forma tripomastigota e invade o fígado, intestino, baço, gânglios linfáticos, sistema nervoso central e músculos esqueléticos e cardíacos. Durante a fase aguda da doença, o acometimento miocárdico é causado principalmente pela invasão do parasito no tecido cardíaco, que desencadeia uma resposta imune e inflamatória grave (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). Além disso, há uma teoria que diz que a resposta inflamatória associada a persistência da baixa parasitemia leva a uma resposta autoimune ao tecido do coração, estabelecendo uma estimulação antigênica contínua ou imitando as proteínas do hospedeiro cardíaco (FERNANDES *et al.*, 2017). A taxa de mortalidade da doença de Chagas aguda é de 5 a 10%, geralmente devido a miocardite aguda ou meningoencefalite, com a maioria das mortes ocorrendo em crianças pequenas (BONNEY, 2014).

Nos casos em que alguns parasitos não são eliminados pelo sistema imune, o indivíduo assume a forma crônica da doença, que permanece no indivíduo até o fim da vida. A maioria segue assintomático por décadas, mas cerca de 40% dos infectados desenvolvem patologias cardíacas e/ou do trato digestivo (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; DA COSTA *et al.*, 2018).

Alguns sinais e sintomas de envolvimento cardíaco incluem anormalidades do movimento da parede, bloqueio do ramo direito e/ou bloqueio fascicular anterior esquerdo, bradicardia sinusal, arritmias atriais e ventriculares, distúrbios da condução atrioventricular e intraventricular, como bloqueio de ramo direito e/ou bloqueio do fascículo anterior esquerdo (ROJAS *et al.*, 2018). A presença de batimentos ventriculares prematuros também é um achado comum, que pode identificar populações de alto risco. As alterações digestivas são causadas pela desnervação dos plexos autônomos do trato digestivo, que levam a distúrbios na absorção, motilidade e secreção, afetando conseqüentemente a coordenação motora e a dilatação, resultando na formação de mega vísceras, principalmente megacólon e megaesôfago (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ECHEVERRIA; MORILLO, 2019).

Ademais, uma série de fatores, incluindo a genética do hospedeiro e do parasito, dose infecciosa, via de transmissão, número de reinfecções, resposta imune inicial e tardia do hospedeiro afetam o início, a gravidade e a apresentação dos sintomas (AYO *et al.*, 2013).

1.3. Doença de Chagas congênita

A transmissão materno-fetal de *T. cruzi* caracteriza a DC congênita, que pode ocorrer quando o parasito atravessa a barreira placentária e atinge o feto em desenvolvimento. Na América Latina, ocorrem mais de 15.000 casos de transmissão congênita da doença de Chagas por ano (CARLIER *et al.*, 2012).

O principal determinante biológico da transmissão congênita é a parasitemia materna, que pode chegar a 31% quando o *T. cruzi* é detectável por PCR, contudo, a transmissão também é possível quando o PCR do sangue materno é negativo (BUA *et al.*, 2012; MURCIA *et al.*, 2013). Ademais, um resultado positivo de qPCR em gestantes infectadas com DC está associado a uma maior probabilidade de transmissão e a níveis mais altos de subclasses de anticorpos, levantando a hipótese de que a qPCR materna positiva para *T. cruzi* (indicativa da presença de parasitos no sangue) pode levar a níveis mais altos de anticorpos IgG (ROCA *et al.*, 2021).

A maioria das mulheres em idade reprodutiva são cronicamente infectadas, sendo que cerca de 5% transmitem, nascendo por ano aproximadamente 9.000 bebês infectados (ANTINORI *et al.*, 2017), além de ser possível em qualquer fase da infecção materna (aguda ou crônica), em cada gravidez de uma mulher infectada e até em gerações sucessivas (CARLIER; TRUYENS, 2011).

Apesar de 60% dos recém-nascidos nascerem assintomáticos, quando comparados com os não infectados, eles apresentam baixo peso ao nascer, prematuridade e pontuações de Apgar (análise da respiração, frequência cardíaca, irritabilidade reflexa, tônus muscular e cor da pele) mais baixas. Em casos mais graves, pode ocorrer aborto, hepatoesplenomegalia, desconforto respiratório, anemia, miocardite, meningoencefalite e mega vísceras. Além disso, alguns recém-nascidos infectados apresentam sintomas graves que podem rapidamente levar a morte e correm o risco de desenvolverem doenças crônicas incapacitantes e com risco ao longo da vida (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ANTINORI *et al.*, 2017; KEMMERLING *et al.*, 2019). Os graus de gravidade podem estar relacionados com a fase da gravidez em que ocorre a transmissão, inclusive durante o parto, com maior probabilidade de aborto espontâneo nas transmissões precoces durante as primeiras semanas de gestação (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011).

1.4. Resposta imunológica

A DC causa alterações no sistema imune do hospedeiro, principalmente durante a fase aguda, mas pode se estender caso haja persistência do parasito na fase crônica. Na fase aguda, a ativação policlonal das células B e T é inibida por processos de imunossupressão mediados pela infecção parasitária (DE BONA *et al.*, 2018). Durante essa fase, a resposta imune inata é crucial para controlar a infecção parasitária e os receptores do tipo Toll (TLRs) são os principais mediadores da resposta. Eles são proteínas transmembranas que fazem parte de um grupo de moléculas que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses receptores reconhecem âncoras de glicoproteínas semelhantes à mucina (GPI) na superfície do patógeno (reconhecidos pelo TLR2, que atua como imunorregulador) e no DNA do parasito (reconhecido por TLR9, sendo crucial para estabelecer a resposta do tipo Th1), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . Além disso, o parasito secreta também glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), reconhecidos pelo TLR4. Ademais, foi visto que camundongos que não expressam TLRs desenvolvem altos níveis de parasitemia e mortalidade, além de uma baixa produção de citocinas (ZAMORA *et al.*, 2017; CRISTÓVÃO-SILVA *et al.*, 2021).

Além disso, estudos recentes forneceram evidências experimentais sobre a participação do sistema inflamassoma atuando em sinergia com os citados TLR, para detectar o dano intracelular causado pelo parasito, fortalecendo a ativação da resposta imune contra o patógeno. Este mecanismo depende de moléculas adaptadoras que se ligam à caspase-1, produzindo ativação de IL-1 β e IL-18 (SILVA *et al.*, 2013; DEY *et al.*, 2014).

O sistema complemento faz parte da imunidade inata atuando na primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e é composto por mais de 35 proteínas, podendo ser ativado por três vias: lectina, clássica e alternativa (LIDANI *et al.*, 2017). Assim que os tripomastigotas atingem a corrente sanguínea do hospedeiro, a via da lectina e a via alternativa são ativadas, uma vez que ambas não dependem de respostas específicas de anticorpos (CESTARI *et al.*, 2013).

Foi descrito que a DC leva a uma diminuição da resposta proliferativa em linfócitos de pacientes na fase crônica, que é atribuída a fatores imunossupressores capazes de reduzir a produção de interleucina-2 (IL-2). Da mesma forma, foram descritas proteínas parasitárias que modulam a atividade do sistema complemento, inibindo a C3 convertase. Outras hipóteses sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* pode induzir moléculas imunomoduladoras, como IL-10 e fator transformador de crescimento- β (TGF- β), que levam à falha na maturação de células apresentadoras de antígenos, uma diminuição na apresentação de antígenos e, portanto,

respostas celulares adaptativas (ZAMORA *et al.*, 2017), desequilíbrio entre células T efetoras e reguladoras, e, finalmente, alteração na expressão de moléculas estimuladoras e citocinas.

Uma associação entre algumas DTUs e taxas mais baixas de transmissão congênita (por exemplo, TcII comparado com TcV no Brasil) também tem sido sugerida (LUQUETTI *et al.*, 2015). Por outro lado, uma resposta imune celular efetiva ao *T. cruzi* parece ter papel relevante nas infecções congênitas. A exposição ao vetor está associada à diminuição da parasitemia e transmissão congênita, provavelmente porque a exposição frequente a vetores infectados induz uma resposta imune Th1, que supera a polarização de Th2 induzida pela gravidez, que é menos eficaz (KAPLINSKI *et al.*, 2015).

1.5. Diagnóstico

Durante a fase aguda e na DC congênita, como a parasitemia é alta, é possível que o diagnóstico seja feito pela detecção microscópica de tripomastigotas no sangue e em outros fluidos corporais, como o líquido cefalorraquidiano (OMS, 2002; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ZINGALES, 2018). Essa detecção no sangue é feita através de métodos parasitológicos diretos, como a da gota fresca (é examinada ao microscópio uma gota de sangue do paciente), gota espessa (aplicar movimentos circulares na gota usando o canto da outra lâmina para desfibriná-la) ou esfregaço (a gota se espalha ao longo da lâmina e é corada pelo método de Giemsa). Técnicas de concentração de sangue também são usadas, como testes de micro hematócrito ou Strout (MANDAL, 2014; SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 2016; CALLEJAS *et al.*, 2022).

Também podem ser usados métodos parasitológicos indiretos, como hemocultura e xenodiagnóstico (uso de vetores mantidos em laboratório sob condições controladas de temperatura e umidade, livres de infecção parasitária, que são depositados em um frasco coberto com gaze e alimentado com o sangue do paciente com suspeita da doença durante 20 minutos) (ZINGALES, 2018).

O exame de PCR (reação em cadeia da polimerase) é um teste de estrutura molecular que se baseia na amplificação das sequências do DNA do *T. cruzi*. Contudo, sua sensibilidade para o diagnóstico da DC é menor, devido às variações na carga parasitária (MANDAL, 2014; SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 2016; CALLEJAS *et al.*, 2022). No entanto, este teste pode ser útil para confirmar o diagnóstico quando a sorologia é inconclusiva e para monitorar o tratamento (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010, BERN, 2015). Além disso, PCR é mais sensível do que hemocultura, xenodiagnóstico e as técnicas de concentração, e tem se mostrado muito útil no diagnóstico da transmissão vertical (BUA *et al.*, 2013; MURCIA *et al.*, 2013).

Em recém-nascidos, o diagnóstico da DC é crucial, porque eles têm 100% de chance de cura. Para o diagnóstico, os seguintes critérios devem ser atendidos: (1) ser filho de mãe soropositiva para *T. cruzi*; (2) PCR positivo ou detecção do parasito no sangue durante o parto/nos primeiros meses de vida, e (3) detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (IgG) a partir de nove meses, pois neste momento os anticorpos maternos já terão desaparecidos (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Durante a fase crônica da doença de Chagas, o diagnóstico pode ser feito sorologicamente por imunoensaio enzimático, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta ou imunocromatografia para testar a presença da imunoglobulina específica G de *T. cruzi* (IgG). Segundo a OMS, são necessários dois testes sorológicos positivos diferentes para confirmar um diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 2016), uma vez que se observou notável heterogeneidade entre os resultados obtidos por diferentes métodos de teste e porque existe um risco considerável de obtenção de resultados falso-positivos com testes individuais devido à reatividade cruzada de anticorpos anti-*T. cruzi* com antígenos de espécies estreitamente relacionadas de tripanossomatídeos (SOUZA; NETO, 2012; BONNEY, 2014).

Além dos testes específicos para cada fase da doença, em todos os casos é recomendado um eletrocardiograma, uma radiografia do tórax da projeção posteroanterior e um ecocardiograma transtorácica para a avaliação clínica (SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 2016; LIDANI *et al.*, 2019).

1.6. Tratamento

Em 1966, a Hoffmann - La Roche comercializou benzonidazol para tratar a doença de Chagas, e a Bayer fabricou o nifurtimox, em 1970. Entre 1970 e 1980, Zigman Brener relatou avanços na imunologia e imunopatologia da doença, e forneceu novos *insights* sobre a biologia do parasito, resposta do hospedeiro e medidas de profilaxia (CALLEJAS *et al.*, 2022).

Atualmente o tratamento de pessoas infectadas com *T. cruzi*, incluindo recém-nascidos, continua sendo feito com esses dois medicamentos: o benzonidazol (que funciona danificando o DNA mitocondrial do parasito) e o nifurtimox (que induz o estresse oxidativo, inibindo o crescimento de parasitos) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010, ECHEVERRIA; MORILLO, 2019). Após a confirmação da infecção por *T. cruzi*, um dos medicamentos deve ser administrado imediatamente, sendo que a taxa de controle da infecção varia em torno de 60% na infecção aguda, mas não é tão eficaz na infecção crônica (10-20%) (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2019).

Além disso, ambos podem causar efeitos colaterais que incluem hipersensibilidade, depressão da medula óssea, toxicidade hepática, alterações psíquicas e complicações digestivas (MORILLA; ROMERO, 2015). Idealmente, o tratamento deve ser administrado por 60 dias, mas nos casos em que ocorrem reações adversas, o tratamento deve ser reduzido para 30 dias (SALAZAR-SCHETTINO *et al.*, 2016; ALONSO-PADILLA *et al.*, 2019). Em adição, os possíveis efeitos teratogênicos ainda não foram elucidados, por isso a utilização dessas drogas não é recomendada para gestantes (CARLIER *et al.*, 2011; OMS, 2020).

Nesse sentido, diante dos possíveis efeitos colaterais que os medicamentos atuais podem causar, faz-se necessário a busca de novas formas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas (DE MORAIS *et al.*, 2020).

1.7. Plantas medicinais com ação antiparasitária

As doenças parasitárias continuam sendo um importante problema de saúde pública, afetando centenas de milhões de pessoas, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento (TAGBOTO; TOWNSON, 2001). O poder de cura das plantas surgiu quando as primeiras civilizações perceberam que algumas tinham princípios ativos curativos que passaram a ser utilizados no combate às doenças (BADKE *et al.* 2011).

Nas últimas duas décadas, ocorreu um aumento no interesse por essas plantas e seus produtos juntamente com um intenso crescimento do mercado de plantas medicinais no Brasil. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. As condições de pobreza e a falta de acesso a medicamentos, associados à fácil obtenção e tradição do uso de plantas com fins medicinais foram uns dos diversos fatores que motivaram esse contexto (FIRMO *et al.*, 2012, ARAÚJO *et al.*, 2015).

No Brasil, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, mas não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa. Portanto, a investigação e comprovação das propriedades biológicas para garantir a eficácia, segurança e qualidade das plantas utilizadas é de suma importância (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

As plantas podem ser utilizadas como recursos terapêuticos de diversas formas: chás de ervas, remédios caseiros, como extratos brutos ou compostos isolados em preparações farmacêuticas e em medicamentos fitoterápicos (RATES, 2001). Segundo a Organização

Panamericana de Saúde, uma planta medicinal é (1) “qualquer planta usada para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou alterar processos fisiológicos e patológicos”, ou (2) “qualquer planta empregada como fonte de drogas ou seus precursores”. Uma preparação fitofarmacêutica ou medicamentos fitoterápicos é todo medicamento manufaturado obtido exclusivamente de plantas (partes aéreas e não aéreas, sucos, resinas e óleo), em estado bruto ou como produto farmacêutico (ARIAS, 1999). Estima-se que, em 1997, o mercado mundial de fitoterápicos fosse de US\$ 10 bilhões, com crescimento anual de 6,5% (RATES, 2001).

O fato de os parasitos serem eucariotos como os seus hospedeiros é uma limitação que sempre deve ser lembrada quando se discutem as inúmeras descobertas de que algum medicamento ou extrato de uma planta medicinal é ativo contra parasitos *in vitro*, pois para ser medicinalmente útil, a droga deve ter biodisponibilidade e não deve intoxicar o paciente (WINK, 2012).

Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado a ação antiparasitária de um grande número de plantas, como por exemplo extratos brutos de *Harungana madagascariensis*, *Quassia africana* e *Brucea javanica* e compostos puros individuais isolados de *Picrolemma spruce*, *Aspidosperma vargasi*, *Artemisia annua* e *Aspidosperma desmanthum* com ação antiplasmodial muito eficaz (LEMMA *et al.* 2017).

Um estudo realizado por Ibraim e colaboradores (2014) demonstrou que plantas medicinais africanas como *Khaya senegalensis*, *Anona senegalensis*, *Acacia nilotica* e *Azadirachta* possuem um grande potencial tripanocida. Em adição, um outro estudo revelou que o extrato bruto etanólico e frações de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) possui atividade antiparasitária e citotóxica contra epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. braziliensis* (FIGUEREDO *et al.*, 2014).

Portanto, de acordo com os aspectos acima levantados, é de extrema relevância considerar compostos derivados de plantas como uma fonte de novas substâncias bioativas para o tratamento de doenças parasitárias, incluindo a DC congênita.

1.8. *Copaifera multijuga*

O gênero *Copaifera* spp., também conhecido como copaíba, pau d'óleo, copaibeira, entre outros nomes, pertence à família Leguminosae e à subfamília Caesalpinadeae. Pode ser encontrado na África Ocidental, América tropical e no Brasil, desde a Floresta Amazônica até a Mata Atlântica. No Brasil, desde o século XVI, tribos indígenas perceberam suas propriedades anti-inflamatórias e começaram a utilizá-la para fins medicinais (ARRUDA *et al.*, 2019).

As espécies desse gênero podem ser arbustos ou árvores que chegam a atingir até 40 metros de altura, sendo possível extrair de seu tronco a óleorresina, a qual provém de canais secretores formados pela dilatação de espaços intercelulares, localizados em todas as partes da árvore. Ela pode ser obtida através da perfuração no tronco da copaíba, utilizando um trado, onde posteriormente insere-se um cano PVC no orifício e o óleo escoa. Essa óleorresina tem sido utilizada desde a época da chegada dos portugueses ao Brasil na medicina tradicional popular para diversas finalidades, e hoje é um dos mais importantes produtos naturais amazônicos comercializados, sendo também exportado para Estados Unidos, França, Alemanha e Inglaterra (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Já o extrato hidroalcoólico é obtido das folhas secas de *C. multijuga* ao ar (200g, 40 °C por 48 h), que foram moídas e depois extraídas exaustivamente por maceração com 1,2 L de etanol/H₂O (7:3) à temperatura ambiente por 48h para fornecer 50g de extrato hidroalcoólico de folhas de *C. multijuga* após liofilização (PIMENTA *et al.*, 2019).

O óleo de copaíba era utilizado para curar feridas de guerreiros após batalhas e para passar no cordão umbilical de recém-nascidos (MACIEL *et al.*, 2002; FRANCISCO, 2005). Pelo que se sabe, tal conhecimento vem da observação do comportamento de alguns animais feridos, que se esfregavam no tronco das árvores de copaíba, na busca da cicatrizar suas feridas (MACIEL *et al.*, 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; FRANCISCO, 2005).

A óleorresina de copaíba é uma substância natural composta de uma parte sólida resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos, responsável por 55 a 60% da sua constituição, a qual se encontra diluída em uma outra parte volátil, o óleo essencial, composto por sesquiterpenos, mas sua composição pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos de acordo com a espécie de copaíba (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; CASCON; GILBERTO, 2000; DA TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018; ARRUDA *et al.*, 2019).

IZUMI e colaboradores (2013) avaliaram a atividade de oito espécies da óleorresina de copaíba contra *T. cruzi* e observaram os efeitos citotóxicos em células de mamíferos e células de parasitos. Foi demonstrado que todas as óleorresinas de *Copaifera* exerceram efeitos em todas as fases de vida do parasito, principalmente contra as formas replicativas. KIAN e colaboradores (2018) mostraram a capacidade do óleo de copaíba e do ácido caurenóico em eliminar as formas de *T. cruzi* em macrófagos infectados, provavelmente devido a sua ação direta sobre os parasitos.

Em um estudo realizado por Teixeira e colaboradores (2020), os autores demonstraram que as óleorresinas de *C. reticulata*, *C. duckei*, *C. paupera* e *C. pubiflora* foram capazes de

controlar a infecção por *T. gondii* através de modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo*. Segundo os autores, a óleoresina mostrou eficiente atividade anti-*T. gondii*, através de uma ação direta sobre os parasitos e pela modulação da resposta imune do hospedeiro.

Essa espécie é encontrada na Amazônia e tem sido estudada por demonstrar grande potencial anti-inflamatório, além de propriedade anti-carcinogênica e antimicrobiana (PINHEIRO *et al.*, 2017). Estudos fitoquímicos mostraram que o óleo de *C. multijuga* é composto pelos seguintes ácidos graxos: ácido palmítico (24,9%); ácido oléico (35,3%); ácido linoleico (35,7%), ácido aráquico (1,1%); ácido beênico (3,0%) e cumarinas (0,2%) (CRAVEIRO *et al.*, 1978).

Sendo assim, considerando as informações apresentadas acima, é notável que espécies do gênero *Copaifera* apresentam elevado potencial biológico. Entretanto, não há nada na literatura científica até o momento sobre sua influência na infecção por *T. cruzi* em modelos de interface materno-fetal humana.

1.9. Linhagem de células trofoblásticas humana: BeWo

O trofoblasto é uma célula de origem fetal que possui uma diversidade de funções que propiciam o sucesso gestacional, sendo responsável pela adesão e invasão do blastocisto no endométrio, pela nutrição do embrião e por formar a porção fetal da placenta (FITZGERALD *et al.*, 2008).

Durante o processo de implantação, o trofoblasto se diferencia em duas subpopulações: o citotrofoblasto e o sinciotrofoblasto (CEBALLOS-POMARES *et al.*, 2017). O citotrofoblasto é formado por células individualizadas, com alta capacidade proliferativa, se dividindo em: trofoblasto viloso (importante para a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto) e extraviloso (responsável pela migração e invasão na decídua) (MIDGLEY *et al.*, 1963). Já o sinciotrofoblasto, é uma camada multinucleada que forma a superfície externa dos vilos placentários e entra em contato direto com o sangue materno, sendo formado a partir de células do citotrofoblasto (HUPPERTZ; GAUSTER, 2011; MAYHEW, 2014). Portanto, o trofoblasto é uma importante barreira física que precisa ser mantida intacta a fim de proteger o organismo contra o ataque de patógenos (LIEMPI *et al.*, 2014).

Diversos estudos *in vitro* são realizados utilizando linhagens celulares pré-estabelecidas para compreender melhor o papel do trofoblasto no ambiente materno-fetal. Um modelo celular de trofoblasto humano muito utilizado são as células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo), isoladas em 1968 por Pattillo e Gey, pois essas células mantêm muitas características

típicas de trofoblasto humano ao secretar hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), hormônio lactogênico placentário (hPL), progesterona e estradiol (WOLFE, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas congênita tem se tornado um grave problema de saúde pública mundial, uma vez que é a principal rota de novos casos em países não endêmicos para a doença. Sabe-se que o uso de medicamentos na fase crônica da doença, além de não ser tão eficaz (10-20%), pode causar efeitos colaterais para a mãe e os efeitos teratogênicos no feto ainda são pouco conhecidos. Portanto, faz-se necessário o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para diminuir a transmissão vertical e garantir um tratamento seguro para a mãe e o feto.

Nesse sentido, alguns estudos demonstram o potencial antiparasitário de *Copaifera* spp., no entanto, não existem estudos na literatura mostrando o potencial tripanocida de nenhuma espécie de *Copaifera* spp. no tratamento da doença de Chagas congênita.

Assim, levando em consideração que o gênero *Copaifera* spp. demonstrou em estudos prévios seu potencial antiparasitário, esse trabalho buscou avaliar o potencial terapêutico de *Copaifera multijuga* na infecção por *Trypanosoma cruzi* em células trofoblásticas humanas vilosas (BeWo), um modelo celular bem estabelecido e utilizado para estudos da interface materno-fetal humana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a ação *in vitro* da óleorresina e extrato hidroalcoólico de *C. multijuga* na infecção por *Trypanosoma cruzi* em células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da óleorresina e do extrato hidroalcoólico de *C. multijuga* em células BeWo e nos tripomastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a proliferação intracelular de amastigotas de *T. cruzi* em células BeWo tratadas ou não com óleorresina ou extrato hidroalcoólico de *C. multijuga*;
- Avaliar a liberação de tripomastigotas de *T. cruzi* no sobrenadante de células BeWo tratadas ou não com óleorresina ou extrato hidroalcoólico de *C. multijuga*;
- Avaliar a invasão, proliferação e morfologia de tripomastigotas pré-tratados ou não com óleorresina ou extrato hidroalcoólico de *C. multijuga* em células BeWo;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo infectadas ou não e tratadas ou não com óleorresina ou extrato hidroalcoólico de *C. multijuga*.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta da óleorresina e do extrato hidroalcoólico de *C. multijuga*

As amostras de óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* foram fornecidas pelo Professor Doutor Carlos Henrique Gomes Martins do Departamento de Microbiologia (DEMIC), Instituto de Ciências Biomédica (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A autorização para realizar estudos científicos com plantas de espécies da biodiversidade brasileira foram solicitadas ao Conselho de Autorização e Informação sobre Biodiversidade (SIBIO/ICMBio/MMA/BRASIL) e Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA/BRASIL).

A óleorresina e o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* foram coletados na região Norte do Brasil, no estado do Amazonas, cidade de Manacapuru. A óleorresina foi obtida através da perfuração dos troncos das árvores usando uma broca de 2", e os exsudatos retirados foram armazenados em garrafas de vidro. A amostra da óleorresina foi filtrada em filtro sintético de 25 µm e armazenada a 15 °C até sua utilização (SILVA *et al.*, 2017). O extrato hidroalcoólico foi obtido das folhas secas de *C. multijuga* ao ar (200g, 40 °C por 48 h), que foram moídas e depois extraídas exaustivamente por maceração com 1,2 L de etanol/H₂O (7:3) à temperatura ambiente por 48h para fornecer 50g de extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* após liofilização (PIMENTA *et al.*, 2019).

Todo o material vegetal coletado foi identificado por Silvane Tavares Rodrigues no Herbarium IAN (EMBRAPA, Amazônia Oriental), Milton Groppo Junior no SPFR Herbarium (Universidade de São Paulo) e Haroldo Cavalcante de Lima no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) por comparação direta com vales de herbário autênticos, de qual um certificado de identidade taxonômica está disponível mediante solicitação.

4.2. Cultivo de células e parasito

Células trofoblásticas humanas vilosas (linhagem BeWo) foram adquiridas do “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. De acordo com o Comunicado Nº13/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFU (CEP) declara que

projetos de pesquisa que envolvam células adquiridas comercialmente não necessitam de aprovação ética pelo comitê (Anexo I).

Formas tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT) da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidas em células VERO em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2% de SFB (Cultilab) e antibióticos (10.000 U/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina) (Sigma) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂.

4.3. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células BeWo frente aos tratamentos com óleorresina (OR) ou extrato hidroalcolico (EH) de *C. multijuga* foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo)], seguindo o protocolo descrito por Mosmann (1983).

Células BeWo ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio com 5% de SFB por 18 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com a óleorresina ou extrato hidroalcolico de *C. multijuga* em diferentes concentrações (4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI com 5% de SFB por 72 horas. As concentrações escolhidas foram baseadas em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (TEIXEIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2023). Além disso, as células foram tratadas com 0,38% de DMSO diluído em meio RPMI com 5% de SFB, a concentração de DMSO usada na maior concentração da OR e EH de *C. multijuga* (256 $\mu\text{g/mL}$). Em adição, as células foram tratadas com Benzonidazol (50 μM) como controle positivo, sendo a concentração escolhida baseada em estudos prévios (VILLARREAL *et al.*, 2005; MEJÍA-JARAMILLO *et al.*, 2011). Como controle negativo, as células foram tratadas somente com meio RPMI com 5% de SFB.

Após 72 horas de tratamento, os sobrenadantes foram descartados e as células foram incubadas com 10 μl de MTT (5 mg/mL) acrescido de 90 μL de meio RPMI com 10% de SFB em estufa durante 4 horas. Em seguida, foi acrescentado 100 μl de solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e N, N-dimetil formamida a 50% para solubilização dos cristais de formazan e deixado overnight (MOSMANN, 1983). A densidade óptica (DO) foi obtida a 570 nm em leitora de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e os resultados foram expressos como % de células viáveis (viabilidade celular) em relação ao controle negativo (100% viável). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicadas.

4.4. Ensaio de viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi*

A viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* frente ao tratamento com óleorresina e extrato hidroalcolico de *C. multijuga* também foi verificada pelo ensaio de MTT como descrito anteriormente, com pequenas modificações.

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* ($1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$) foram adicionadas em placas de 96 poços em meio com 5% de SFB e em seguida foram tratados com OR ou EH de *C. multijuga* em diferentes concentrações (4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI com 5% de SFB por 72 horas. Em adição, os parasitos foram tratados com Benzonidazol (50 μM) como controle positivo. Como controle negativo, os parasitos foram tratados somente com meio RPMI com 5% de SFB.

Após 72 horas de tratamento, foram adicionados 10 μL de MTT (5 mg/mL) nas diferentes condições em estufa durante 4 horas. Em seguida, foi acrescentado 100 μL de SDS 10% e N, N-dimetil formamida a 50% para solubilização dos cristais de formazan e deixados *overnight*. A densidade óptica (DO) foi obtida a 570 nm em leitora de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e os resultados foram expressos como % de tripomastigotas viáveis em relação ao controle negativo (100% viável). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicadas.

4.5. Ensaio de proliferação intracelular de *T. cruzi* e liberação de tripomastigotas no sobrenadante

A proliferação intracelular de *T. cruzi* em células BeWo tratadas com óleorresina e extrato hidroalcolico de *C. multijuga* foi verificada através da coloração com Giemsa e análise ao microscópio de luz.

Células BeWo ($4 \times 10^4/500 \mu\text{L}$) foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro circulares (13 mm) em meio RPMI com 5% de SFB por 18 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 1,3 parasitos por célula (1,3:1) para o ensaio de proliferação, e 10 parasitos por célula (10:1) para o ensaio de liberação de tripomastigotas no sobrenadante, ambos em meio a 2% de SFB por 3 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x para a remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas com concentrações não tóxicas da OR (16 e 32 $\mu\text{g/mL}$) e EH (32 e 64 $\mu\text{g/mL}$) de *C. multijuga* em meio RPMI com 5% de SFB por 72 horas. Como controles, as células foram infectadas e tratadas com Benzonidazol (50 μM) ou apenas infectadas e tratadas com meio RPMI com 5% de SFB.

Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi descartado, as lamínulas foram lavadas 1x com PBS e então fixadas com metanol por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 1x com PBS, seguido da coloração com Giemsa (diluído em água destilada na proporção de 1:20) por 30 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram descoradas em cinco lavagens com PBS 1x, e após um tempo de secagem, as lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio de luz para determinar o índice de infecção (número de células infectadas a cada 200 células observadas aleatoriamente) e a proliferação intracelular de *T. cruzi* (número de amastigotas totais observados nas células infectadas) (KIAN *et al.*, 2018).

Paralelamente ao ensaio de proliferação de *T. cruzi*, foi realizada a análise de liberação de tripomastigotas no sobrenadante. Após 72 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto ao número de tripomastigotas, e na placa foi adicionado meio RPMI com 5% de SFB para análise da liberação de tripomastigotas nos três dias posteriores (96, 120 e 144 horas), sendo o meio repostado a cada 24 horas. Os sobrenadantes coletados foram centrifugados à 4000 rpm por 10 minutos, ressuspensos em 20 µl de meio e então contados em câmara de Neubauer a quantidade de tripomastigotas liberados no sobrenadante (KIAN *et al.*, 2018).

Para ambos os ensaios, foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

4.6. Ensaio de invasão e proliferação de tripomastigotas de *T. cruzi* pré-tratados com óleo-resina e extrato hidroalcolico de *C. multijuga*

A invasão e proliferação de *T. cruzi* pré-tratados com a óleo-resina de *C. multijuga* em células BeWo foi verificada através da coloração com Giemsa e análise no microscópio de luz.

Células BeWo (4×10^4 /500 µl) foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares (13 mm) em meio RPMI com 5% de SFB por 18 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas com tripomastigotas na proporção de 10 parasitos por célula (10:1) para o ensaio de invasão, e 1,3 parasitos por célula (1,3:1) para o ensaio de proliferação. Estes parasitos foram pré-tratados previamente por 1 hora com OR (16 e 32 µg/mL), EH (32 e 64 µg/mL), Benzonidazol (50 µM) ou meio com 2% de SFB. Após 3 horas de infecção, dois protocolos experimentais distintos foram analisados: (I) invasão: após as 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x para a remoção dos parasitos que não invadiram, e as células foram coradas com Giemsa; (II) proliferação: após as 3 horas, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x para a remoção dos parasitos extracelulares, e as células

foram tratadas com meio a 5% de SFB por 72 horas, e posteriormente corados com Giemsa, como já descrito anteriormente.

Para os ensaios de invasão e proliferação, as células foram analisadas em microscópio de luz para determinar o índice de infecção (número de células infectadas a cada 200 células observadas aleatoriamente) e a invasão/proliferação de *T. cruzi* (número de amastigotas totais observados nas células infectadas).

Para o ensaio de invasão, foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata, enquanto que para o ensaio de proliferação foi realizado um experimento em quadruplicata.

4.7. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células BeWo infectadas ou não com *T. cruzi* e tratadas ou não com OR e EH de *C. multijuga* foi verificado pela sonda 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCF-DA, Invitrogen, D399) que na presença de ROS forma o composto fluorescente 2',7' diclorofluoresceína (DCF), como descrito anteriormente (MARTÍNEZ *et al.*, 2023).

Células BeWo ($1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$) foram plaqueadas em placas escuras de 96 poços em meio com 5% de SFB por 18 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 1,3 parasitos por célula (1,3:1) em meio a 2% por 3 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x para a remoção dos parasitos extracelulares, e as células foram tratadas ou não com a OR (16 e 32 $\mu\text{g/mL}$) ou EH (32 e 64 $\mu\text{g/mL}$) de *C. multijuga*, e BZN (50 μM) por 72 horas. Como controles, as células foram infectadas ou não com *T. cruzi* e tratadas com meio a 5% de SFB.

Após o tempo de tratamento, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados 1x com PBS e então incubados com a sonda ROS (10 μM diluído em PBS 1x com 10% de SFB) por 45 min à 37 °C e 5% de CO₂ no escuro. Como controle positivo da reação, células BeWo foram tratadas previamente à incubação da sonda com 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, diluído em PBS 1x) por 30 minutos. Após o tempo, a sonda foi retirada, os poços foram lavados 1x com PBS, e foi adicionado 100 μl de PBS 1x nos poços para leitura. A intensidade média da fluorescência de DCF foi detectada em leitora de microplacas (GlomaMax Discover System, Promega, Madison, WI, USA) em comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 nm e 522 nm, respectivamente. Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

4.8. Análise da morfologia de tripomastigotas tratados com OR e EH de *C. multijuga* por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de tripomastigotas de *T. cruzi* tratados com OR ou EH de *C. multijuga* foi analisado por microscopia eletrônica de varredura, como descrito anteriormente (COGO *et al.*, 2012).

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* ($1 \times 10^7/1000$ mL) foram tratadas com OR (32 $\mu\text{g/mL}$) ou EH (64 $\mu\text{g/mL}$) de *C. multijuga*, BZN (50 μM) ou meio com 2% de SFB por 1 hora. Após o tempo, o tratamento foi retirado, os parasitos foram lavados 1x com PBS e então fixados em solução de Karnovsky contendo paraformaldeído a 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 2 horas. Após o tempo, os parasitos foram lavados 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós fixados com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% por 1 hora. Em seguida, os parasitos foram lavados 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1M, e 10 μL de parasito foi adicionado sobre lamínulas circulares e deixados *overnight* a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, as lamínulas com os parasitos foram desidratadas em álcoois com concentrações crescentes (50, 70, 80, 90, 95 e 100%, 5 minutos em cada), e então foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Tescan, VEJA 3 LMU).

4.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad Prism Software* versão 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA (quando apropriado) com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni para os dados paramétricos ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn para dados não paramétricos. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. O tratamento com óleoresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* foram tóxicos para as células BeWo e tripomastigotas de *T. cruzi* apenas nas maiores concentrações

O ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar a possível citotoxicidade da óleoresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* em células BeWo e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Em células BeWo, nós observamos que o tratamento com a óleoresina diminuiu a viabilidade celular apenas nas concentrações de 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ em relação as células tratadas apenas com meio (meio) ($****P < 0,0001$) (**Figura 1A**), enquanto que o extrato hidroalcoólico das folhas diminuiu a viabilidade das células apenas nas concentrações de 128 ($***P = 0,0002$) e 256 $\mu\text{g/mL}$ ($****P < 0,0001$) em relação as células tratadas apenas com meio (meio) (**Figura 1B**). O tratamento com BZN não alterou a viabilidade celular se comparado às células tratadas apenas com meio (**Figuras 1A, B**).

Nos tripomastigotas, nós observamos que o tratamento com BZN ($*P = 0,0179$), bem como as concentrações de 64, 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ da óleoresina ($****P < 0,0001$) diminuíram a viabilidade em relação aos tripomastigotas tratados apenas com meio (meio) (**Figura 1C**). Além disso, nós observamos que as concentrações de 64 ($\#P = 0,0164$), 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ ($####P < 0,0001$) foram mais efetivas em diminuir a viabilidade em relação aos tripomastigotas tratados com BZN (**Figura 1C**). Em relação ao extrato hidroalcoólico das folhas, nós observamos que as concentrações de 64 ($***P = 0,0009$), 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ ($****P < 0,0001$), bem como BZN ($*P = 0,0125$) também diminuíram a viabilidade em relação aos tripomastigotas tratados apenas com meio (meio) (**Figura 1D**). Em adição, nós observamos que as concentrações de 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcoólico das folhas foram mais efetivas em diminuir a viabilidade em relação aos tripomastigotas tratados com BZN ($####P < 0,0001$) (**Figura 1D**).

Baseado nesses resultados, nós escolhemos duas concentrações não tóxicas para as células BeWo de cada composto para a realização dos experimentos posteriores. Para a OR,

foram escolhidas as concentrações de 16 e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto que para o EH as concentrações de 32 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram escolhidas.

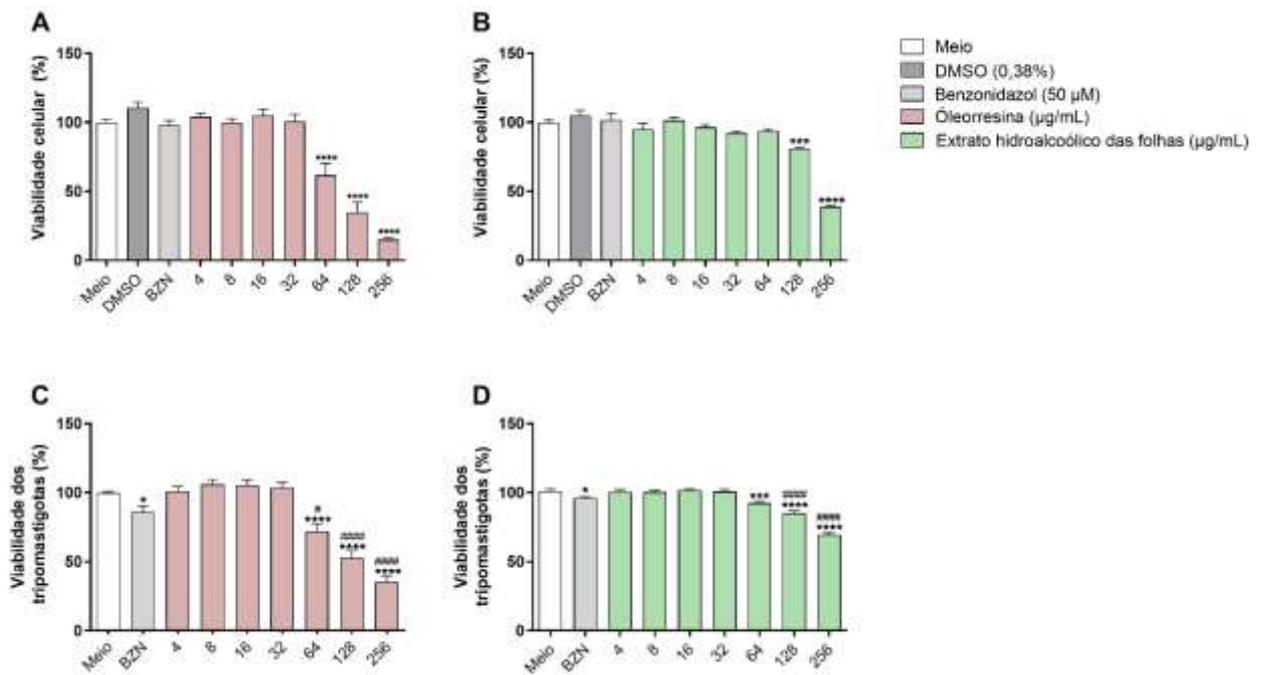


Figura 1: Viabilidade de células BeWo e tripomastigotas tratadas com OR ou EH de *C. multijuga*. Células BeWo e tripomastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com a óleorresina (A, C) ou extrato hidroalcoólico (B, D) de *C. multijuga* por 72 horas e então submetidas ao ensaio de MTT. Os dados foram apresentados como % de células/tripomastigotas viáveis (viabilidade celular) em relação às células/tripomastigotas não tratadas (meio, 100% de viabilidade). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células/tripomastigotas tratadas com meio (**P*) ou tratadas com Benzonidazol (#*P*). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

5.2. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* reduziram a proliferação intracelular de *T. cruzi* em células BeWo

Realizamos o ensaio de proliferação intracelular para avaliar o impacto do tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* em células BeWo infectadas com *T. cruzi*.

Nós observamos que o tratamento com a óleorresina nas concentrações de 16 (**P* = 0,0262) e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**P* = 0,0473), bem como o extrato hidroalcoólico nas concentrações de 32 (**P* = 0,0343) e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (***P* = 0,0031) diminuíram o número de células infectadas por *T. cruzi* em relação às células infectadas e não tratadas (Figura 2A). Em adição, nós observamos que o tratamento com a óleorresina nas concentrações de 16 (**P* = 0,0185) e 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (***P* = 0,0036), bem como o extrato hidroalcoólico nas concentrações de 32 (***P* = 0,0038) e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$

($***P = 0,0003$), além do BZN ($***P = 0,0008$) diminuíram o número de amastigotas nas células infectadas em relação às células infectadas e não tratadas (meio) (**Figura 2B**).

Fotomicrografias representativas de células BeWo (**Figuras 2C-H**) são mostradas, onde é possível observar um grande número de amastigotas no citoplasma de células BeWo infectadas e não tratadas (**C**) em relação às células infectadas e tratadas com BZN (**D**), OR 16 (**E**) e 32 $\mu\text{g/mL}$ (**F**), EH 32 (**G**) e 64 $\mu\text{g/mL}$ (**H**).

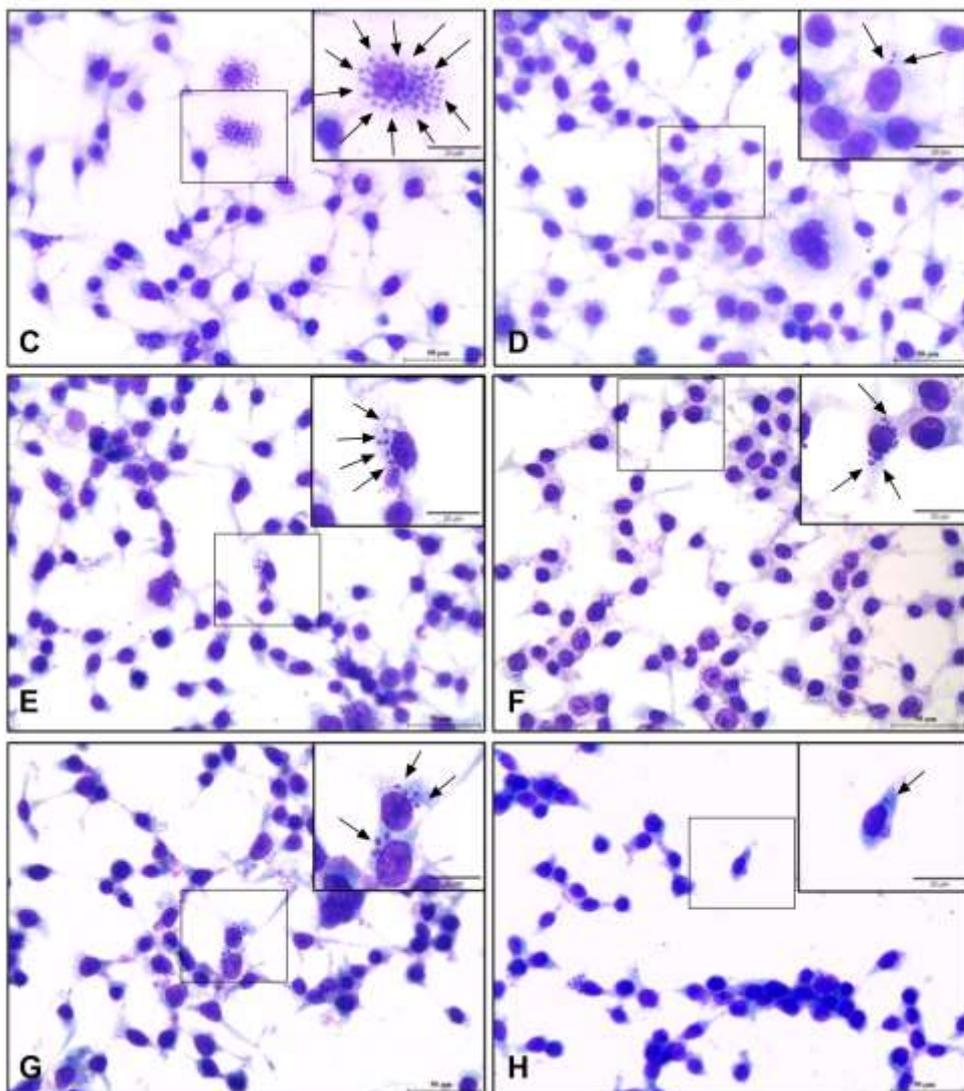
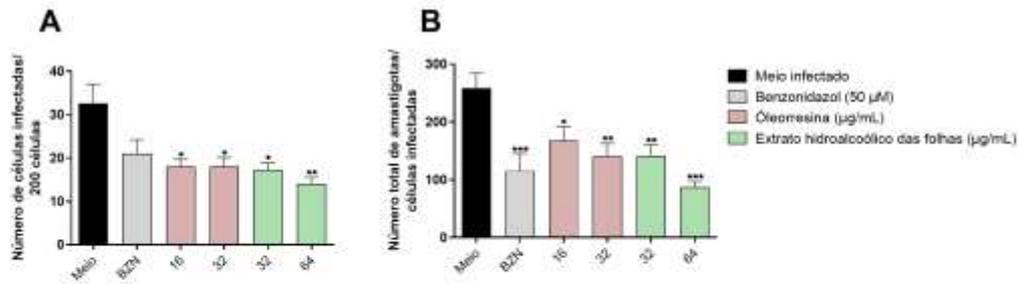


Figura 2: Ensaio de proliferação intracelular de *T. cruzi* em células BeWo tratadas com OR e EH de *C. multijuga*. Células BeWo foram infectadas por *T. cruzi* durante 3 horas e posteriormente tratadas por 72 horas com as concentrações não tóxicas da óleoresina (16 e 32 µg/mL) ou extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* (32 e 64 µg/mL). O número de células infectadas (**A**) foi analisado em microscópio de luz para determinar o índice de infecção (número de células infectadas a cada 200 células observadas aleatoriamente) e a proliferação intracelular de *T. cruzi* (**B**) (número de amastigotas totais observados nas células infectadas). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou teste Kruskal-Wallis com pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (meio) (**P*). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata. Fotomicrografias representativas de células BeWo infectadas com *T. cruzi* e não tratadas (**C**), tratadas com Benzonidazol (**D**), tratadas com óleoresina 16 µg/mL (**E**) e 32 µg/mL (**F**), ou extrato hidroalcoólico das folhas 32 µg/mL (**G**) e 64 µg/mL (**H**). As setas indicam amastigotas de *T. cruzi* no citoplasma de células BeWo. Barra de escala: 50 µm.

5.3. O tratamento com óleoresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* reduziram a liberação de tripomastigotas no sobrenadante de células BeWo

Para avaliar o impacto do tratamento com óleoresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* na liberação de tripomastigotas no sobrenadante, foi realizado a contagem de tripomastigotas de *T. cruzi* no sobrenadante nos tempos de 72, 96, 120 e 144 horas após a infecção.

Em relação à OR, nós observamos que ambos tratamentos e o BZN foram capazes de diminuir a liberação de tripomastigotas em todos os tempos em relação as células infectadas e não tratadas (meio), sendo estatisticamente diferente nos tempos de 96 (BZN: **P* = 0,0139; 16 µg/mL: **P* = 0,0166; 32 µg/mL: **P* = 0,0157) e 144 horas (BZN: ****P* = 0,0004; 16 µg/mL: **P* = 0,0388; 32 µg/mL: ***P* = 0,0072) (**Figura 3A**).

Em relação ao EH, nós observamos que ambas concentrações diminuíram a liberação de tripomastigotas também em todos os tempos em relação as células infectadas e não tratadas (meio), sendo estatisticamente diferente no tempo de 96 horas (32 µg/mL: ***P* = 0,0036; 64 µg/mL: ****P* = 0,0002), enquanto que o BZN diminuiu nos tempos de 96 (****P* = 0,0005) e 144 horas (****P* = 0,0003) (**Figura 3B**).

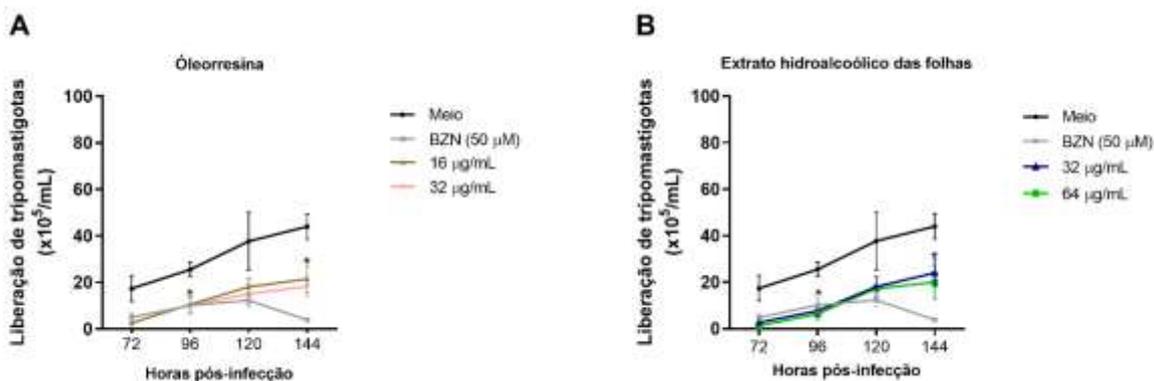


Figura 3: Contagem de tripomastigotas de *T. cruzi* no sobrenadante de células BeWo tratadas com OR e EH de *C. multijuga*. O sobrenadante de células BeWo infectadas e tratadas com óleo de resina (16 e 32 µg/mL) e extrato hidroalcoólico das folhas (32 e 64 µg/mL) de *C. multijuga* foram coletados após 72 horas de tratamento, bem como após 96, 120 e 144 horas após a infecção, e contados na câmara de Neubauer quanto ao número de tripomastigotas no sobrenadante. Os dados foram apresentados quanto ao número de tripomastigotas no sobrenadante $\times 10^5/\text{mL}$. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste Two-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células infectadas e não tratadas (meio) (**P*). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

5.4. O pré-tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* com óleo de resina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* altera a morfologia do parasito, comprometendo sua capacidade de invadir e proliferar em células BeWo

Para avaliar se o pré-tratamento com óleo de resina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* tem ação direta sobre os tripomastigotas de *T. cruzi*, realizamos o ensaio de invasão e de proliferação intracelular, bem como avaliamos a morfologia do parasito por microscopia eletrônica de varredura.

No ensaio de invasão, nós observamos que o pré-tratamento dos parasitos com ambas concentrações da OR (*****P* < 0,0001) e do EH (*****P* < 0,0001), bem como o BZN (***P* = 0,0002), diminuíram o número de células infectadas por *T. cruzi* em relação aos parasitos que não foram tratados (meio) (**Figura 4A**). Em adição, ambas concentrações da OR e EH, além do BZN, diminuíram o número de amastigotas em relação às células infectadas com parasitos não tratados (meio) (*****P* < 0,0001) (**Figura 4B**).

Em relação ao ensaio de proliferação, nós observamos que o pré-tratamento dos parasitos com ambas concentrações da OR (16 µg/mL: ****P* = 0,0002; 32 µg/mL: *****P* < 0,0001), do EH (*****P* < 0,0001), e BZN (*****P* < 0,0001) diminuíram o número de células infectadas por *T. cruzi* em relação aos parasitos que não foram tratados (meio) (**Figura 4C**). Além disso, ambas concentrações da OR e EH, bem como o BZN, também diminuíram o

número de amastigotas em relação às células infectadas com parasitos não tratados (meio) ($***P < 0,0001$) (**Figura 4D**).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas são mostradas (**Figuras 4E-H**), onde é possível observar parasitos não tratados com morfologia normal (**E**), tratados com BZN e apresentando um inchaço no corpo do parasito (**F**), tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ da OR e apresentando um arredondamento/diminuição no corpo do parasito e diminuição do flagelo (**G**), e tratados com 64 $\mu\text{g/mL}$ do EH e apresentando uma torção no corpo do parasito (**H**).

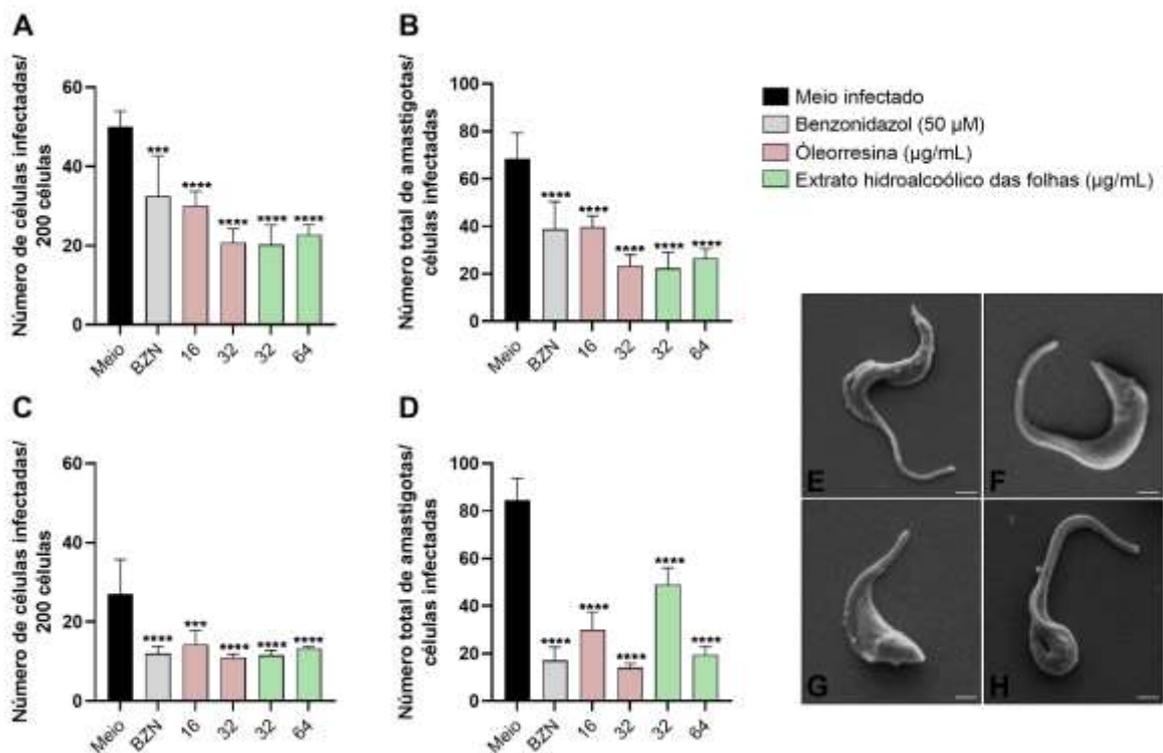


Figura 4: Invasão, proliferação e morfologia de tripomastigotas de *T. cruzi* pré-tratados com OR e EH de *C. multijuga*. Células BeWo foram infectadas por *T. cruzi* previamente pré-tratados por 1 hora com óleorresina (16 e 32 $\mu\text{g/mL}$) e extrato hidroalcoólico das folhas (32 e 64 $\mu\text{g/mL}$) de *C. multijuga* e analisados quanto a capacidade de *T. cruzi* invadir (**A, B**) e proliferar (**C, D**). A porcentagem de invasão/proliferação do parasito foi analisada em microscópio de luz para determinar o índice de infecção (número de células infectadas a cada 200 células observadas aleatoriamente) e a invasão/proliferação de *T. cruzi* (número de amastigotas totais observados nas células infectadas). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células infectadas com parasitos não tratados (meio) ($*P$). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata no ensaio de invasão e um experimento em quadruplicata no ensaio de proliferação. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* não tratadas (**E**), tratadas com BZN (**F**), tratadas com OR 32 $\mu\text{g/mL}$ (**G**), e tratadas com EH 64 $\mu\text{g/mL}$ (**H**). Barra de escala: 2 μm .

5.5. O tratamento com óleorresina e extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* modularam a produção de ROS em células BeWo

Após avaliarmos a diminuição da proliferação de *T. cruzi* em células BeWo tratadas com OR e EH de *C. multijuga*, nós avaliamos se esses dois compostos alterariam a produção de ROS em células infectadas ou não e tratadas.

Nas células não infectadas, nós observamos que a concentração de 32 µg/mL da OR ($###P = 0,0004$) e ambas concentrações do EH (32 µg/mL: $##P = 0,0078$; 64 µg/mL: $\#P = 0,0133$) apresentaram uma menor produção de ROS em relação às células tratadas com benzonidazol (Figura 5A).

Na presença de infecção, células BeWo apenas infectadas ($*P = 0,0232$) ou infectadas e tratadas com ambas concentrações do EH (32 µg/mL: $***P = 0,0006$; 64 µg/mL: $****P < 0,0001$) aumentaram a produção de ROS em relação às células não infectadas e não tratadas (meio não infectado) (Figura 5B). Em adição, células infectadas e tratadas com BZN ($\&P = 0,0258$) e OR 32 µg/mL ($\&P = 0,0276$) diminuíram a produção de ROS em relação às células apenas infectadas (meio infectado), enquanto que o EH 64 µg/mL induziu um aumento ($\&P = 0,0125$) (Figura 5B). Além disso, ambas concentrações do EH (32 µg/mL: $###P = 0,0006$; 64 µg/mL: $####P < 0,0001$) tiveram uma maior produção de ROS em relação às células infectadas e tratadas com BZN (Figura 5B).

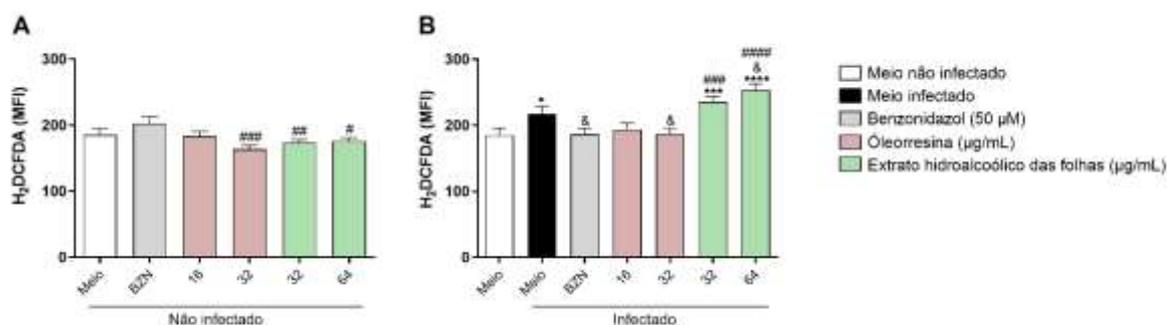


Figura 5 – Análise da produção de ROS em células BeWo. Células BeWo foram infectadas ou não por *T. cruzi* durante 3 horas e posteriormente tratadas ou não por 72 horas com as concentrações não tóxicas da óleorresina (16 e 32 µg/mL) ou extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* (32 e 64 µg/mL). As células foram incubadas com a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA) e a produção de ROS foi medida por fluorescência em leitora de placas e expressa como intensidade de fluorescência mediana (MFI). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças significativas em relação às células não infectadas (meio não infectado) ($*P$), células apenas infectadas ($\&P$), e células infectadas ou não e tratadas com BZN ($\#P$). Foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas.

6. DISCUSSÃO

A transmissão materno-fetal de *T. cruzi* caracteriza a Doença de Chagas Congênita (DCC), que ocorre quando o parasito atravessa a barreira placentária e atinge o feto em desenvolvimento, podendo causar, em casos graves, sintomas que podem rapidamente levar a morte e ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas incapacitantes e com risco ao longo da vida (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ANTINORI *et al.*, 2017; KEMMERLING *et al.*, 2019). Na América Latina, ocorrem mais de 15.000 casos de transmissão congênita da Doença de Chagas por ano (CARLIER *et al.*, 2012).

Em relação ao tratamento, após a confirmação da infecção por *T. cruzi*, benzonidazol ou nifurtimox devem ser administrados imediatamente, sendo que a taxa de controle da infecção varia em torno de 60% na infecção aguda, mas não é tão eficaz na infecção crônica (10-20%) (ALONSO-PADILLA *et al.*, 2019). Além disso, ambas as drogas podem causar uma série de efeitos colaterais para a gestante (MORILLA; ROMERO, 2015) e os possíveis efeitos teratogênicos ainda não foram elucidados, por isso a utilização dessas drogas é contraindicada para gestantes (CARLIER *et al.*, 2011; OMS, 2020). Nesse sentido, a busca por ferramentas terapêuticas alternativas que sejam eficazes e seguras para a mãe e o feto se faz necessária.

Neste contexto, muitos estudos têm demonstrado o potencial de diferentes compostos de plantas do gênero *Copaifera* no controle de doenças parasitárias (PIERI, 2012; ALVES *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ *et al.*, 2023). Assim sendo, este estudo busca avaliar o impacto da óleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* na infecção por *T. cruzi* em modelo de interface materno-fetal humana. Nós utilizamos células BeWo como modelo de células trofoblásticas humanas vilosas, a qual é considerada um excelente modelo experimental para o estudo de DCC *in vitro* (LIEMPI *et al.*, 2015, MEDINA *et al.*, 2018; TRIQUELL *et al.*, 2018).

Inicialmente, para avaliar o impacto da óleorresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga* em células BeWo, verificamos a viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações de ambos compostos. Nossos resultados mostraram que células BeWo tratadas com a óleorresina e extrato hidroalcoólico exibiram viabilidade celular reduzida apenas nas maiores concentrações. Em concordância com nossos resultados, um estudo de Alves e colaboradores (2017) buscou avaliar a genotoxicidade da óleorresina de *C. multijuga* em hepatócitos de camundongos, e foi visto que apenas na maior concentração ela causou algum dano. Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, a óleorresina e o extrato hidroalcoólico de *C. multijuga* também foram tóxicos para as células BeWo e HTR-8/SVneo apenas em maiores concentrações (MARTÍNEZ *et al.*, 2023).

Além disso, também avaliamos a viabilidade dos compostos de *C. multijuga* diretamente nos tripomastigotas de *T. cruzi* e observamos que, assim como para as células, ambos os compostos também foram tóxicos apenas nas maiores concentrações (OR: 16 e 32 µg/mL; EH: 32 e 64 µg/mL). É importante destacar que essa diminuição na viabilidade dos tripomastigotas foi maior que o tratamento com o benzonidazol, e apesar do tratamento convencional ser mais efetivo na fase aguda da doença (cerca de 60%) onde há a presença de tripomastigotas na corrente sanguínea, estudos demonstram que o parasito desenvolveu mecanismos de resistência a essa droga (CAMPOS *et al.*, 2014; VELA *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2023), destacando a importância por novas estratégias terapêuticas que sejam eficazes também na fase aguda da infecção.

Em seguida, para avaliar a proliferação intracelular do parasito, tratamos as células BeWo infectadas com *T. cruzi* por 72 horas com concentrações não tóxicas da óleoresina e do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. multijuga*. Nossos dados mostram que ambos os compostos foram capazes de diminuir a proliferação intracelular de *T. cruzi* em células BeWo. Corroborando com nossos dados, Izumi e colaboradores (2012) mostraram que terpenos presentes em óleorresinas de *Copaifera* spp. promoveram alterações no metabolismo oxidativo, induziram autofagia e diminuíram a proliferação de formas replicativas de *T. cruzi*, principalmente em amastigotas. Em outro trabalho, Izumi e colaboradores (2013) avaliaram o efeito da óleoresina de oito espécies de *Copaifera*, incluindo *C. multijuga*, contra todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, e observaram um efeito potente de inibição sobre todas as formas evolutivas do parasito. Outro estudo demonstrou que a óleoresina e o ácido caurenóico de *C. martii* diminuíram significativamente a taxa de infecção e proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais murinos e em células HeLa (KIAN *et al.*, 2018), destacando o potencial tripanocida desses compostos.

Uma vez dentro da célula, os amastigotas iniciam a replicação no citoplasma da célula hospedeira, se diferenciam novamente em tripomastigotas, e são posteriormente liberados para o meio extracelular, podendo infectar novas células e disseminar pelo organismo. Visto que o tratamento com a OR e EH diminuiu o número de amastigotas nas células BeWo, nos perguntamos se a diferenciação e conseqüentemente a liberação de tripomastigotas seria comprometida. Nossos dados mostram que, apesar de não haver diferença estatística nos tempos de 72 e 120 horas, houve uma tendência em diminuir a liberação de tripomastigotas no sobrenadante, sugerindo uma ação direta desses compostos no parasito que podem comprometer sua capacidade de infectar novas células e disseminar pelo organismo.

Para testar essa hipótese, nós realizamos ensaios de invasão e proliferação pré-tratando tripomastigotas por 1 hora. Nossos dados mostram que o parasito pré-tratado teve uma menor capacidade de invadir e proliferar em células BeWo. Um estudo recente mostrou que compostos naturais podem afetar diferentes estruturas em *T. cruzi* e *Leishmania* spp., e há a hipótese de que a mitocôndria seja um alvo estratégico para induzir a morte do parasito (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2022). Para avaliar se a OR e EH de *C. multijuga* poderia estar alterando a morfologia de *T. cruzi*, nós analisamos formas tripomastigotas pré-tratadas por 1 hora em microscópio eletrônico de varredura, e observamos que ambos compostos induziram alterações morfológicas no corpo do parasito, como encurtamento do corpo e do flagelo e torção do parasito, o que pode explicar sua dificuldade em invadir e proliferar dentro da célula. Na literatura é relatada a capacidade de *Copaifera* spp. em causar alterações estruturais em diferentes protozoários, como a fusão de membranas em *T. gondii* comprometendo sua capacidade replicativa (TEIXEIRA *et al.*, 2020), ruptura da membrana plasmática, retração do flagelo e arredondamento de *Leishmania* spp (SANTOS *et al.*, 2013; DE MORAES *et al.*, 2018), bem como ruptura da membrana plasmática e formação de vacúolos membranosos em *T. cruzi* (IZUMI *et al.*, 2012; IZUMI *et al.*, 2013). Esses achados são importantes para a descoberta de organelas e moléculas alvo do parasito para avaliar o possível uso terapêutico desses compostos, sendo necessários estudos mais aprofundados para descobrir quais moléculas presentes nesses compostos que possuem propriedades antiparasitárias.

Após demonstrarmos o efeito de *C. multijuga* diretamente sobre os tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, buscamos avaliar a ação da óleoresina e do extrato hidroalcoólico na modulação de espécies reativas de oxigênio em células BeWo, e se isso poderia estar contribuindo para o controle da proliferação de *T. cruzi*. Nós observamos que na presença da infecção há um aumento na produção dessa molécula em relação às células não infectadas, e sabe-se que ROS pode favorecer a infecção por *T. cruzi* na célula hospedeira e contribuir para a patologia da doença de Chagas, mas os mecanismos envolvidos nesse processo são pouco compreendidos (MALDONADO *et al.*, 2020; PAIVA; MEDEI; BOZZA, 2018). Por outro lado, o tratamento com BZN e a maior concentração da OR (32 µg/mL) diminuiu essa produção em relação às células infectadas, enquanto que a maior concentração do EH (64 µg/mL) aumentou em relação às células infectadas.

É conhecido que óleoresinas de *Copaifera* spp. possuem atividades anti-inflamatórias (DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018), então é plausível que atuem diminuindo a produção de ROS. Em concordância com esses achados, Teixeira e colaboradores (2020) observaram que quatro espécies de *Copaifera* reduziram a produção de ROS em células BeWo

infectadas por *T. gondii* e ainda sim foi capaz de controlar a proliferação do parasito. Em outro estudo, Kian e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com óleorresina de *C. martii* reduziu a produção de ROS em macrófagos infectados por *T. cruzi*, também sendo capaz de controlar a proliferação do parasito, destacando que um dos mecanismos antiparasitários promovidos por *Copaifera* spp. é através da indução de uma resposta anti-inflamatória, sendo importante para uma gestação bem-sucedida, uma vez que uma resposta inflamatória exacerbada pode causar desequilíbrio gestacional, levando ao aborto espontâneo. Em adição, no contexto da infecção por *T. cruzi*, essa diminuição de ROS pode contribuir para o controle da proliferação do parasito.

Por outro lado, o EH induziu um aumento na produção de ROS em relação às células apenas infectadas. Mesmo sendo compostos da mesma espécie, é plausível que possam gatilhar diferentes mecanismos intracelulares, uma vez que a composição química de cada composto varia entre espécies e mesmo dentro do mesmo espécime (ARRUDA *et al.*, 2019). Sabe-se que ROS são produzidas principalmente nas mitocôndrias e em níveis basais desempenham papéis essenciais para a fisiologia celular, porém em altas concentrações essas moléculas podem induzir estresse oxidativo, causando a oxidação de macromoléculas, principalmente lipídios, proteínas e DNA, podendo desencadear a morte celular (KIRKINEZOS; MORAES, 2001). Apesar de ROS contribuir com a proliferação de *T. cruzi*, Lazarin-Bidóia e colaboradores (2013) demonstraram que o eupomatenóide-5 (isolado das folhas de *Piper regnellii*) induziu um desequilíbrio oxidativo nas três formas evolutivas de *T. cruzi*, especialmente tripomastigotas, refletido por uma diminuição na atividade da tripanotona redutase e aumento na formação de ROS, sendo essas alterações eventos chave na indução da morte do parasito por várias vias, incluindo apoptose, necrose e autofagia. Assim, é possível sugerir que o aumento da produção de ROS induzido pelo EH pode contribuir parcialmente para o controle da proliferação de *T. cruzi* em células BeWo, mas o efeito tripanocida promovido pelo EH esteja mais relacionado com uma ação direta desse composto no parasito do que a modulação positiva de ROS.

7. CONCLUSÃO

Considerando nossos resultados, nós concluímos que a óleorresina e o extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera multijuga* foram eficazes no controle da invasão, proliferação e disseminação de *T. cruzi* em células BeWo, sendo esse fenômeno relacionado com uma ação direta no parasito, bem como a modulação da produção de ROS nas células BeWo, destacando o potencial desses compostos como estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento da doença de Chagas congênita. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para avaliar quais moléculas bioativas presentes nesses compostos apresentam atividade antiparasitária, além de avaliar as alterações ultraestruturais nas formas amastigotas e epimastigotas, modulação da resposta imune mediada por citocinas, bem como experimentos em modelo *ex vivo* da interface materno fetal humana.

REFERÊNCIAS

ALONSO-PADILLA, J. *et al.* Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. **Expert Rev Anti Infect Ther**, United Kingdom, v. 17, n. 3, p. 145-157, fev. 2019.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D. A. *et al.* Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. **Rev. Medica del Hosp. Gen. de Mex.**, Mexico, v. 81, n. 3, p. 154-164, set. 2018.

ALVES, J. M. *et al.* *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (–) - copalic acid: genotoxicity and chemoprevention study. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, Netherlands, v. 819, p. 26-30, jul. 2017.

ANTINORI, S. *et al.* Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **Eur J Intern Med**, Netherlands, v. 43, p. 6–15, maio 2017.

ARAÚJO, I. F. *et al.* O comércio de plantas com propriedades medicinais na cidade de Bacabal, Maranhão, Brasil. **Natureza on line**, Brasil, v. 13, n. 3, p. 111-116, jun. 2015.

ARIAS, T. D. **Glosario de Medicamentos: desarrollo, evaluacion y uso**. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud. Organizacion Mundial de La Salud, p. 171, 1999.

ARORA, N. *et al.* Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. **Cell Host Microbe**, United States, v. 21, n. 5, p. 561–567, maio 2017.

ARRUDA, C. *et al.* Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus - A review. **Biomed Pharmacother**, France, v. 109, p. 1–20, jan. 2019.

AYO, C. M. *et al.* Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes. **BioMed Res. Int.**, United States, v. 2013, ago. 2013.

BADKE, M.R. *et al.* Medicinal plants: the knowledge sustained by daily life practice. **Esc. Anna Nery**. [s.l.], v. 15, p. 132-139, 2011.

BERN, C. *et al.* Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. **Clin Infect Dis**, v. 49, p. 1667–1674, dez. 2009.

BERN, C.; MARTIN, D.L.; GILMAN, R.H. Chapter 2 - Acute and Congenital Chagas Disease. *In*: WEISS L. M.; TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V. (org.) **Advances in Parasitology**, United States: Elsevier, 2011. p. 19–47.

BERN, C. Chagas' Disease. **N. Engl J. Med.**, New england, v. 373, p. 456-466, jul. 2015.

BOCCHI E. A. *et al.* Chronic chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. **J Am Coll Cardiol**, United States, v. 70, n. 12, p. 1510–1524, set. 2017.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, France, v. 21, n. 11, mar. 2014.

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

BUA, J. *et al.* Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, United Kingdom, v. 106, n. 10, p. 623–628, out. 2012.

BUA, J. *et al.* How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. **PLoS. Negl. Trop.**, United States, v. 7, out. 2013.

CALLEJAS, G.P. *et al.* Enfermedad de Chagas biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. **Tip rev. espec. cienc. quím. biol.**, Mexico, v. 25, p. 1-19, 2022.

CAMPOS, M. C. *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Mol biochem parasitol**, [s.l.], v. 193, n. 1, p. 17-19, jan. 2014.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M (org.). **American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research**. 1. ed. Burlington: Elsevier insights, 2010. p. 539-581.

CARLIER, Y. *et al.* Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. **PLoS Negl Trop Dis**, United States, v. 5, n. 10, e1250, out. 2011.

CARLIER, Y. *et al.* Congenital parasitic infections: A review. **Acta Trop**, Netherlands, v. 121, n. 2, p. 55–70, fev. 2012.

CASCON, V.; GILBERTO, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 55, n. 7, p. 773-778, dez. 2000.

CEBALLOS-POMARES, J.C. *et al.* Immunología de la enfermedad de Chagas congénita. **Perinatol. Reprod. Hum.**, Mexico, v. 31, n. 3, p. 144–150, set. 2017.

CESTARI, I. *et al.* Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 328-334, abr. 2013.

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

COGO, J. *et al.* Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benznidazole. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 59-66, 2012.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Kooban, 2013.

CRAVEIRO, A. *et al.* Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e lácticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amaz.** [s. l.], v. 8, p. 705-706, 1978.

CRISTOVAO-SILVA, A. C. *et al.* Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. **Cytokine & Growth Factor Rev**, United Kingdom, v. 62, p. 15-22, dez. 2021.

DA COSTA, M. M. *et al.* Chagas disease: epidemiological trend by regions of Brazil. **Brazilian Journal of Health Review**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 252–259, nov. 2018.

DA TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **Int. J. Mol. Sci.**, Switzerland, v. 19, n. 5, p. 1511, maio 2018.

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. **J Submicrosc Cytol Pathol**, [s.l.], v. 35, p. 287-94, jul. 2003.

DE BONA, E. *et al.* Autoimmunity in chronic chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy? **Front Immunol**, Switzerland, v. 9, ago. 2018.

DE FUENTES-VICENTE, J. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. **Acta trop**, Netherlands, v. 195, p. 51-57, jul. 2019.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol. Res.**, Germany, v. 88, p. 1013-1025, dez. 2002.

DE MORAES, A. R. *et al.* Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental parasitology**, v. 187, p. 12-21, abr. 2018.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 313-325, jun. 2008.

DEY, N. *et al.* Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1beta-ROS-NF-kappaB pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3^{-/-} macrophages. **PloS one**, United States, v. 9, n. 11, nov. 2014.

DIAS, J. C.; PRATA, A.; CORREIA, D. Problemas e perspectivas para o controle da doença de Chagas: a busca de uma análise realística. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasil, v. 41, n. 2, p. 193–196, abr. 2008.

DIAS, J. C.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease), **Infect Dis Clin North Am**, United States, v. 33, n. 1, p. 119–134, mar. 2019.

FERNANDES, H. J. *et al.* Meningoencephalitis caused by reactivation of chagas disease in patient without known immunosuppression. **Am J Trop Med Hyg**, United States, v. 96, n. 2, p. 292–294, fev. 2017.

FIGUEREDO, F. G. *et al.* Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **J. Appl. Pharm. Sci.** [s. l.], v. 35, p. 149-154, jan. 2014.

FIRMO, W. C. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.** [s.l.], v. 18, p. 90-95, fev. 2012.

FITZGERALD, J. S. *et al.* Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Hum Reprod Update.** [s. l.], v. 14, p. 335-344, ago. 2008.

FRANCISCO, S. G. Uso do óleo de resina de copaíba (*Copaifera Officinalis* L) em inflamação ginecológica. **Femina**, Brasil, v. 22, n. 2, p. 89-93, 2005.

HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M. Trophoblast fusion. **Adv Exp Med Biol.**, [s.l.], v. 713, p. 81-95, 2011.

IBRAHIM, M.A. *et al.* Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: a review update. **J Ethnopharmacol**, Ireland, v. 154, n. 1, p. 26–54, maio 2014.

IZUMI, E. *et al.* Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. **J. Med. Chem.**, United States, v. 55, n. 7, p. 2994–3001, mar. 2012.

IZUMI, E. *et al.* Toxicity of Oleoresins from the Genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: A Comparative Study. **Planta Medica**, United States, v. 79, n. 11, p. 952–958, 2013.

KAPLINSKI, M. *et al.* Sustained domestic vector exposure is associated with increased Chagas cardiomyopathy risk but decreased parasitemia and congenital transmission risk among young women in Bolivia. **Clin Infect Dis**, United Kingdom, v. 61, n. 6, p. 918–926, set. 2015.

KEMMERLING, U. *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. **Front Microbiol**, Switzerland, v. 10, p. 1854, ago. 2019.

KIAN, D. *et al.* Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomed Pharmacother**, France, v. 103, p. 1294–1301, jul. 2018.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Semin. Cell Dev. Biol.**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 449-457, dez. 2001.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et al.* Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoïd-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic. Biol. Med.*, United States, v. 60, p. 17-28, jul. 2013.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et al.* Natural compounds based chemotherapeutic against Chagas disease and leishmaniasis: mitochondrion as a strategic target. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Brasil*, v. 117, mar. 2022.

LEMMA, M. T. *et al.* Medicinal plants for in vitro antiplasmodial activities: A systematic review of literature. *Parasitology International*, v. 66, n. 6, p. 713-720, dez. 2017.

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

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health*, Switzerland, v. 7, p. 1-13, jul. 2019.

LIEMPI, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta*, London, v. 35, n. 12, p. 1035-1042, dez. 2014.

LIEMPI, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in “in vitro” culture systems by automated cell counting. *Acta tropica*, Netherlands, v. 143, p. 47-50, mar. 2015.

LIMA, D. *et al.* Transcriptomic analysis of benznidazole-resistant and susceptible *Trypanosoma cruzi* populations. *Parasites & Vectors*, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 167, maio 2023.

LIMA, L. *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*, Netherlands, v. 151, p. 166–177, nov. 2015.

LUQUETTI, A. O. *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Brasil*, v. 110, n. 3, p. 369–376, maio 2015.

MACIEL, M. A. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. nova*, Brasil, v. 25, p. 429-438, maio 2002.

MANDAL, S. Epidemiological Aspects of Chagas Disease - a Review. *J. Infe. Dis. Prev. Med.*, United States, v. 2, p. 1-7, set. 2014.

MALDONADO, E. *et al.* Dual and opposite roles of reactive oxygen species (ROS) in Chagas disease: beneficial on the pathogen and harmful on the host. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2020, p. 1-17, dez. 2020.

MARCILI, A. *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitol.*, United Kingdom, v. 136, n. 6, p. 641-655, abr. 2009.

MARTÍNEZ, A. F. *et al.* Leaf hydroalcoholic extract and oleoresin from *Copaifera multijuga* control *Toxoplasma gondii* infection in human trophoblast cells and placental explants from third-trimester pregnancy, **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Switzerland, v. 13, p. 109, fev. 2023.

MARTINEZ-DIAZ, R. A. *et al.* Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 96, p. 53-59, jan. 2001.

MAYHEW, T. M. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? **Placenta**, United Kingdom, v. 35, n. 4, p. 229-240, abr. 2014.

MEDINA, L. *et al.* Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. **Acta tropica**, Netherlands, v. 186, p. 35-40, out. 2018.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. *et al.* Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. **Parasites Vectors**, [s.l.], v. 4, p. 169, set. 2011.

MESSENGER, L. A., MILES, M. A., BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert Rev Anti Infect Ther**, United Kingdom, v. 13, n. 8, p. 995-1029, jul. 2015.

MIDGLEY, A. R. *et al.* Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. **Science**, [s.l.], v. 141, n. 3578, p. 349-350, jul. 1963.

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

MORAIS, M. C. *et al.* Trypanocidal Essential Oils: A Review. **Molecules**, Brasil, v. 25, n. 19, out. 2020.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine England**, v. 10, n. 3, p. 465-481, fev. 2015.

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

MURCIA L, *et al.* Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. **Clin. Infect. Dis.**, United Kingdom, v. 56, n.4, p. 496-502, fev. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Controle da doença de Chagas: segundo relatório do comitê de especialistas da OMS. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Doença de Chagas (tripanosomíase americana), 2020.

- PAIVA, C. N.; MEDEI, E.; BOZZA, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: fuel to infection, poison to the heart. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006928, abr. 2018.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, United States, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.
- PIERI, F. A. Atividade sinérgica entre terpenos obtidos do gênero *Copaifera* sobre o agente etiológico da Doença de Chagas. **Rev Virtual de Química (doenças negligenciadas)**, Brasil, v. 4, n. 3, p. 343-346, jun. 2012.
- PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev Brasileira de Plantas Mediciniais**, Brasil, v. 11, p. 465-472, jan. 2009.
- PIMENTA, I. *et al.* Antibacterial profile of *Copaifera multijuga* oleoresin and hydroalcoholic extract of leaves against oral pathogens. **Curr. Dentistry**, v. 1, n.1, p. 53-60, 2019.
- PINHEIRO, J. G. *et al.* Inclusion Complexes of *Copaiba* (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti Inflammatory Activity. **Int J Mol Sci**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 2388, nov. 2017.
- RAMÍREZ-TOLOZA, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: Immune Evasion, Infectivity, and Tumorigenesis. **Trends Parasitol**, England, v. 36, n. 4, p. 368–381, abr. 2020.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, United States, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, abr. 2010.
- RASSI, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infect Dis Clin North Am**, United States, v. 26, n. 2, p. 275–291, jun. 2012.
- RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, United Kingdom, v. 39, n. 5, p. 603–613, maio 2001.
- RIOS, L. *et al.* Epidemiology and pathogenesis of maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* and a case for vaccine development against congenital Chagas disease. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, Netherlands, v. 1866, n. 3, mar. 2020.
- RODRIGUES, I. A. *et al.* Development of Nanoemulsions to Enhance the Antileishmanial Activity of *Copaifera paupera* Oleoresins. **BioMed Res Int.**, United States, p. 1-10, abr. 2018.
- RODRIGUES, J. C.; GODINHO, J. L.; DE SOUZA, W. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. **Subcell. Biochem.**, United States, v. 74, p. 1–42, out. 2014.
- ROJAS, L.Z. *et al.* Electrocardiographic abnormalities in Chagas disease in the general population: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, United States, v. 12, n. 6, jun. 2018.

- RUEDA K. *et al.* Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países sul-americanos. **Biomedica**, Colombia, v. 34, n. 4, p. 631–41, dez. 2014.
- SALAZAR-SCHETTINO, P.M. *et al.* Enfermedad de Chagas no México. **Rev. Fac. Med.**, Mexico, v. 59, n. 3, pág. 6-16, jun. 2016.
- SALVATELLA, R.; IRABEDRA, P.; CASTELLANOS, L. G. Interruption of vector transmission by native vectors and the art of the possible. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 109, p. 122–130, fev. 2014.
- SANTOS, A. O. *et al.* Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 59-64, fev. 2013.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, United Kingdom, v. 54, n. 6, p. 845–852, mar. 2012.
- SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J Nat Prod**, United States, v. 61, n. 8, p. 1053–1071, jul. 1998.
- SILVA, G.K. *et al.* Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, United States, v. 191, n. 6, p. 3373-3383, set. 2013.
- SILVA, J. J. *et al.* Development of a validated ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera oleoresins*. **J. Chromatogr. A.**, Netherlands, v. 1515, p. 81-90, set. 2017.
- SIQUEIRA-BATISTA, R. *et al.* **Moléstia de Chagas**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Rúbio; 2007.
- SOUZA, R. M.; AMATO, N. V. Discrepancies and consequences of indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and Elisa tests for the diagnosis of Chagas disease. **Rev Inst Med Trop**, Brasil, v. 54, n. 3, p. 141–143, jun. 2012.
- SOUZA, G. A. *et al.* *In vitro* and *in vivo* Antimalarial Potential of Oleoresin Obtained From *Copaifera reticulata*, *Duckei*, *Fabaceae* in the Brazilian Amazon Rainforest. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 24, p. 111-118, jan. 2017.
- TAGBOTO, S.; TOWNSON, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. **Adv Parasitol**, United States, v. 50, p. 199–295, 2001.
- TEIXEIRA, S. C. *et al.* *Copaifera* spp. oleoresins impair *Toxoplasma gondii* infection in both human trophoblastic cells and human placental explants. **Sci. Rep.**, United Kingdom, v. 10, n. 1, p. 15158–15158, set. 2020.
- TRIQUELL, M. F. *et al.* Nitric oxide synthase and oxidative-nitrosative stress play a key role in placental infection by *Trypanosoma cruzi*. American Journal of Reproductive Immunology, United Kingdom, **Am. J. Reprod. Immunol**, United States, v. 80, n. 1, mar. 2018.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Quím. nova**, Brasil, v. 25, p. 273-286, maio 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, jun. 2005.

VELA, A. *et al.* In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. e0009269, 2021.

VILLARREAL, D. *et al.* Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 2701-2709, jul. 2005.

WHARTON, J. *et al.* Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor. **Prox Natl Acad Sci.**, United States, v. 2, n. 90, p. 91-687, jan. 1993.

WHO Expert Committee. **Control of Chagas disease**: second report of the WHO expert Committee. Geneva: WHO technical report series, 2002. p. 1-109.

WINK, M. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. **Molecules**, [s.l.], v. 17, n. 11, pág. 12771-12791, out. 2012.

WOLFE, M. W. Culture and transfection of human choriocarcinoma cells. **Methods in Mol Med**, [s. l.], v. 121, p. 229-239, 2006.

YAMAGATA, Y., NAKAGAWA, J. Control of Chagas disease. **Adv Parasitol**, United States, v. 61, p. 129-65, 2006.

ZAMORA, Y *et al.* Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 15, n. 5, p. 367-376, abr. 2017.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, p. 1051-1054, nov. 2009.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infect. Genet. Evol.**, [s. l.], v. 12, p. 240–253, mar. 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica**, v. 184, p. 38-52, ago. 2018.

ZUMA, A. A.; DOS SANTOS BARRIAS, E.; DE SOUZA, W. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 27, n. 14, p. 1671–1732, abr. 2021.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG - CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@propp.ufu.br ; www.comissoes.propp.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS
COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS COMUNICA QUE AS PESQUISAS CUJOS DADOS SERÃO OBTIDOS EXCLUSIVAMENTE COM O USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE NÃO NECESSITAM DE ANÁLISE ÉTICA POR UM CEP.

EXEMPLOS DESSAS CÉLULAS: HeLa; BeWo; JEG-3; HTR-8; HFF; Caco-2.

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU