



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA  
MORTE CELULAR DE *Trypanosoma cruzi* INDUZIDO PELO  
EUPOMATENÓIDE-5**

DANIELLE LAZARIN BIDÓIA

MARINGÁ

2012

DANIELLE LAZARIN BIDÓIA

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA  
MORTE CELULAR DE *Trypanosoma cruzi* INDUZIDO PELO  
EUPOMATENÓIDE-5**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos.

## AGRADECIMENTOS

É com imenso carinho que escrevo estes agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono tornaram possível a realização deste trabalho, fizeram parte do meu dia a dia e significaram muito para minha formação.

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, não apenas pela sua orientação, mas por toda compreensão, dedicação, confiança e conhecimento transmitido durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pelo acolhimento, apoio e confiança depositada em mim.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Ueda Nakamura e Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, pela contribuição disponibilizada a minha formação acadêmica e científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela transmissão de seus conhecimentos.

A secretária Helena, pela atenção e dedicação.

Aos meus pais José Antonio e Neusa, que sempre acreditaram em mim.

Ao meu esposo, Carlos Cristiano, por toda paciência e apoio.

Ao meu filho, Alexandre, divino presente de Deus.

A minha sogra Dalva e meu sogro Carlos, pelo auxílio e incentivo.

As amigas Vânia, Nathielle e Erika, pelo apoio, convivência, amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos companheiros de laboratório Adriana, Ana Carolina, Andréa, Angelo, Cleyton, Eliana, Elizandra, Gean, Gislaine, Helena, Jean Henrique, Jéssica, Juliana, Karin, Ligia, Marco Antônio, Mirian, Patrícia, Raíssa, Renata, Rodrigo, Samara, Solange, Thalita e Viviane, pelo convívio, companheirismo, auxílio e amizade.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

E a todos que estiveram do meu lado durante essa caminhada e contribuíram para concretização deste sonho.

Muito Obrigado!

*“...Toda transformação começa sempre caótica e desconfortável.  
Os caminhos conhecidos são seguros e fáceis,  
mas só conduzem aos lugares onde já estamos  
e não desejamos ficar.*

*O caminho do novo é cheio de riscos, surpresas e cansaço  
mas sempre premia os que o escolhem  
com a chance de descobrirem e experimentarem  
a vida que imaginaram viver.”*

Geraldo Eustáquio de Souza

LAZARIN-BIDÓIA, D. **Avaliação de mecanismos de ação envolvidos na morte celular de *Trypanosoma cruzi* induzido pelo eupomatenóide-5.** 2012. 71 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá.

## RESUMO

A doença de Chagas causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas na América Latina. Atualmente, os fármacos disponíveis para tratamento desta infecção são muito tóxicos, com diversos efeitos colaterais e baixa eficácia na fase crônica. Assim, novas alternativas para o tratamento dessa doença se tornam necessárias e prioritárias e produtos naturais são candidatos promissores devido à diversidade de suas estruturas moleculares. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram a atividade de eupomatenóide-5, uma neolignana isolada das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*, contra as formas parasitárias de *T. cruzi*. Adicionalmente, os resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura evidenciaram alterações morfológicas e ultraestruturais sugerindo a possibilidade de que diferentes estruturas podem ser alvos do eupomatenóide-5. Assim, a proposta do presente trabalho foi avaliar algumas alterações bioquímicas induzidas pelo eupomatenóide-5 nas diferentes formas parasitárias de *T. cruzi* de forma a elucidar os mecanismos de ação envolvidos na morte celular deste parasito. Nossos resultados mostraram que o eupomatenóide-5 induziu alteração no potencial de membrana mitocondrial e na integridade da membrana celular; aumento da formação de ânion superóxido mitocondrial; peroxidação lipídica; fragmentação de DNA; diminuição do volume celular e formação de vacúolos autofágicos. Estes resultados sugerem que a ação tripanocida do eupomatenóide-5 está intimamente relacionada a disfunção mitocondrial seguido por um aumento da formação de ROS. Estes são eventos chaves para induzir a morte celular por caminhos diferentes, incluindo necrose, apoptose e autofagia.

**Palavras-chave:** doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; eupomatenóide-5 e morte celular.

LAZARIN-BIDÓIA, D. **Evaluation of mechanism of action involved in cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by eupomatenoid-5.** 2012. 71 pages. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) Universidade Estadual de Maringá.

### ABSTRACT

Chagas' disease caused by protozoan *Trypanosoma cruzi* affects approximately 10 million people in Latin America. Currently, the drugs available for the treatment of this infection are very toxic, with several side effects and low efficacy in the chronic phase. Thus, new alternatives for the treatment of this disease become necessary and priority and natural products are promising candidates due to the diversity of their molecular structures. Previous studies from our research group showed activity of eupomatenoid-5, a neolignan isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*, in *T. cruzi*. Additionally, the results obtained by transmission and scanning electron microscopy demonstrated morphological and ultrastructural alterations suggesting the possibility that different structures could be targets of eupomatenoid-5. Thus, the purpose of this study was to evaluate some biochemical changes induced by eupomatenoid-5 in all three forms of *T. cruzi* in attempt to elucidate the mechanisms involved in cell death of this parasite. Our results showed that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 induced change in mitochondrial membrane potential and cell membrane integrity; increased formation of mitochondrial superoxide anion; lipid peroxidation; DNA fragmentation; decreased cell volume and formation of autophagic vacuoles. These results suggest that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 is closely related with mitochondrial dysfunction followed by an increase of ROS formation. These are key events to induce cell death through different pathway including, apoptosis, necrosis and autophagy.

**Key-Words:** Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, eupomatenoid-5 and cell death.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do eupomatenóide-5 isolado de *Piper regnellii* var. *pallescens*.....16
- Figura 2.** Características morfológicas da apoptose e da necrose.....21

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
1.2 Doença de Chagas.....	11
1.3 Quimioterapia da doença de Chagas.....	14
1.4 Eupomatenóide-5 .....	15
1.5 Potenciais alvos da atividade tripanocida de fármacos .....	16
1.6 Mitocôndria: estrutura e função .....	18
1.7 Tipos de morte celular .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>ANEXO: Artigo a ser submetido</b> .....	37
Further evidences for the mechanism of action of eupomatenoid-5: confirmation of ROS involvement owing mitochondrial dysfunction in <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
<b>CONCLUSÕES</b> .....	71



## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada, considerada um grave problema de saúde pública que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas na América Latina, introduzindo cerca de 300.000 novos casos e 10.000 óbitos por ano (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009, WHO, 2010; CABALLERO et al., 2011).

Desde a sua descoberta em 1909 (CHAGAS, 1909), o tratamento desta infecção ainda é um desafio, pois se restringe a apenas dois compostos nitroderivados, benzonidazol e nifurtimox, que apresentam eficácia limitada, principalmente na fase crônica da doença, além de graves efeitos colaterais (BRENER, 1979). Neste contexto, há uma necessidade urgente na busca de novos compostos ativos menos tóxicos e mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas e, produtos naturais são possíveis alvos promissores para o tratamento desta infecção devido à diversidade de suas estruturas moleculares (IZUMI et al., 2008; PELIZZARO-ROCHA et al., 2010; IZUMI et al., 2011).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a atividade tripanocida do eupomatenóide-5, uma neolignana isolada das folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostraram alterações morfológicas e ultraestruturais, tais como células deformadas, intensa vacuolização do citoplasma, inchaço mitocondrial, aumento do retículo endoplasmático, descolamento da membrana plasmática e presença de vacúolos autofágicos nos parasitos tratados (LUIZE et al., 2006a; 2006b; PELIZZARO-ROCHA et al., 2011). As alterações induzidas pelo eupomatenóide-5 sugerem que diferentes componentes celulares podem ser alvos desta substância e que a mitocôndria e a membrana plasmática seriam as estruturas mais afetadas (PELIZZARO-ROCHA et al., 2011).

Assim, considerando a atividade tripanocida do eupomatenóide-5, este estudo teve como objetivo avaliar as alterações bioquímicas induzidas por este composto nas três formas parasitárias de *T. cruzi* para tentar elucidar os mecanismos de ação envolvidos na morte celular deste protozoário.

Os assuntos abordados nos subitens desta introdução proporcionam um melhor entendimento do nosso trabalho.

### 1.1 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasito uniflagelado da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, filo Sarcomastigophora e subfilo Mastigophora (BRENER, 1992). Apresenta diferentes formas ao longo de seu ciclo de vida, destacando-se a forma epimastigota - replicativa extracelular, não infectiva - presente no tubo digestivo do inseto vetor; a forma tripomastigota - não replicativa, infectiva - presente nas porções finais do intestino do inseto e na corrente sanguínea de mamíferos infectados; e a forma amastigota - replicativa intracelular, infectiva - presente no interior das células infectadas (DE SOUZA, 1984; DE SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

*Trypanosoma cruzi*, bem como todos os membros da família *Trypanosomatidae*, apresentam algumas características especiais, como a presença de uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo do protozoário. Nesta organela há uma grande quantidade de DNA que se organiza na forma de minicírculos e se concentra em uma determinada região, localizada logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura intramitocondrial, chamada de cinetoplasto. A concentração de DNA encontrada em um cinetoplasto pode representar cerca de 30% do DNA total da célula (DE SOUZA, 2000). Estudos citotômicos e bioquímicos descrevem ainda a presença de algumas enzimas mitocondriais em *T. cruzi* incluindo a citocromo oxidase, a succinato desidrogenase, a isocitrato desidrogenase, a NADPH diaforase, a alfa glicerolfosfato desidrogenase e a beta hidroxibutirato desidrogenase.

Outras características de *T. cruzi* incluem a presença de uma bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo e é um local de intensa endocitose; o acidocalcissoma, responsável pelo armazenamento de íons como cálcio, sódio, zinco, fósforo e magnésio para posterior utilização na célula (DOCAMPO, MORENO, 1999); o glicossomo que compartimentaliza em seu interior enzimas da via glicolítica (MICHELS et al., 2006); o reservossomo, que armazena lipídeos e proteínas, assim como algumas proteases, sendo a cruzipaina ou GP57/51 a proteína mais abundante da família das cisteínas proteases de *T. cruzi*. Esta protease participa na nutrição, diferenciação e interação do parasito com a célula hospedeira (CAZZULO, 2002; APARICIO et al., 2004; DIAS et al., 2009). E, descoberto recentemente, o vacúolo contrátil, que exerce sua função na osmoregulação celular (DE SOUZA, 2009).

O ciclo de vida deste protozoário é complexo, alternando entre um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um invertebrado (triatomíneo), caracterizando-se como heteroxênico (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor infectado defeca

imediatamente, depositando na pele do mamífero as excretas contendo as formas tripomastigotas metacíclicas. Através de uma ferida na pele ou diretamente na mucosa as formas tripomastigotas metacíclicas invadem diversas células, tais como fibroblastos, macrófagos residentes, células musculares lisas e estriadas e neurônios. No interior destas células ocorre à diferenciação para amastigotas, que se multiplicam no citoplasma e novamente se diferenciam para tripomastigotas. Este processo ocasiona rompimento da célula hospedeira e liberação dos parasitos na corrente sanguínea. Estes podem infectar novas células ou serem ingeridos por outro triatomíneo no momento do repasto sanguíneo. No hospedeiro invertebrado, as formas tripomastigotas migram para o intestino do inseto vetor, diferenciam-se em epimastigotas e multiplicam-se. Posteriormente, essas formas migram para a parte posterior do tubo digestivo atingindo o reto, diferenciam-se para tripomastigotas metacíclicos, que, num novo repasto sanguíneo, são eliminados juntamente com a urina e fezes do triatomíneo. Ao entrar em contato com um novo hospedeiro vertebrado e estabelecer um novo processo de infecção nas células, o ciclo se fecha (COURA; CASTRO, 2002; MAYA et al., 2007).

## **1.2 Doença de Chagas**

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, descoberta e descrita por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). É uma doença negligenciada, endêmica das Américas, principalmente América Latina, onde acomete milhões de pessoas (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; WHO, 2010; CABALLERO et al., 2011). No Brasil estima-se que em torno de 2 milhões de pessoas são portadoras da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010). A doença de Chagas é um grave problema de saúde pública da América Latina, sendo considerada a segunda enfermidade (após a malária) associada a vetor, em prevalência e mortalidade. A população afetada por esta infecção é geralmente de baixa renda e escolaridade, que habitam regiões rurais ou comunidades isoladas, com pouco ou nenhum acesso a saneamento básico e serviços de saúde (LIESE, SCHUBERT, 2009).

A doença de Chagas pode ser transmitida através da via vetorial, que depende de alguns fatores relacionados tanto ao triatomíneo quanto ao parasito, como grau de antropofilia, tempo entre a picada e a defecação, número e quantidade de evacuações, percentual de formas infectantes nas fezes ou urina, capacidade de penetração do protozoário

e a intensidade do prurido causado pela picada (COURA, 2007). Os insetos vetores pertencem à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (NEVES, 2005). Atualmente, mais de 140 espécies, pertencentes a 3 gêneros – *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, já foram identificadas como transmissores da doença (PATTERSON; BARBOSA; FELICIANGELI, 2009; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009), sendo que algumas espécies têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. braziliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (SILVEIRA, 1983). São popularmente conhecidos como “bicho barbeiro”, possuem hábito noturno e só são capazes de evoluir e procriar realizando a hematofagia, em todos os estágios de vida (NEVES, 2005). O Brasil, em 2006, recebeu o certificado pela Organização Pan Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (Opas/OMS) de eliminação da transmissão pelo principal vetor, o *T. infestans* (WHO, 2007). Entretanto, apesar dos avanços no controle da transmissão vetorial, algumas regiões da América Latina ainda apresentam níveis significativos desta transmissão. Mesmo nas áreas onde esta via foi declarada nula, existe o risco de retorno em consequência da precoce interrupção nos programas de vigilância (DIAS, SILVEIRA, SCHOFIELD, 2002), aumentando a possibilidade de uma nova adaptação destes vetores às condições humanas.

Além da transmissão vetorial da doença, outras formas de transmissão incluem a via congênita, via oral e transfusão sanguínea (PRATA, 2001; CARLIER, 2007, DIAS, 2006, DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). A transmissão congênita pode causar aborto, prematuridade, retardo de crescimento intra-uterino, nati e neomortalidade (BITTENCOURT, 2000; GÜRTLER; SEGURA; COHEN, 2003; CARLIER et al., 2011). A transmissão por via oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados. Nos últimos anos, tem aumentado os casos de transmissão por esta via, principalmente na região amazônica (COURA, 2006). Em 2005, um surto relacionado à ingestão de caldo de cana ocorreu em Navegantes, Santa Catarina. Posteriormente, em Iguarapé da Fortaleza, Amapá, 26 pessoas foram infectadas devido à ingestão de suco de açaí contaminado (IANNI; MADY, 2005). Recentemente, em 2011, outro surto ocorreu em Belém, Pará, devido o consumo de açaí contaminado (SESPA, 2011). A transmissão transfusional constitui um mecanismo de importância epidemiológica na disseminação da doença de Chagas, principalmente nas grandes cidades, onde a prevalência da infecção é mais elevada (NEVES, 2005).

Mecanismos menos comuns de transmissão envolvem transplante de órgãos (CAMPOS et al., 2008), acidentes médico-laboratoriais, manejo de animais infectados (HERWALDT, 2001) e pelo leite materno (DIAS, 2006).

A doença de Chagas apresenta curso clínico variável, desenvolvendo fase aguda (inicial, rápida, com elevada parasitemia) e crônica (tardia, de lenta evolução e com baixa parasitemia), que variam de acordo com as características do hospedeiro e da cepa infectante (DIAS, 2000).

A fase aguda corresponde à infecção e disseminação do parasito no organismo. Pode ser assintomática ou apresentar alguns sinais e sintomas, que variam em frequência e intensidade. Após a infecção, observa-se principalmente o chagoma de inoculação, edema que surge no local de entrada do parasito ou pelo sinal de Romana, edema bipalpebral unilateral, que ocorre com a entrada do parasito na conjuntiva ocular. Outros sintomas nesta fase incluem febre, diarreia, vômito, cefaléia, mialgia, insuficiência cardíaca, mal estar (DIAS, 1997; PRATA, 2001). Neste período, os parasitos presentes na corrente sanguínea se disseminam amplamente pelo organismo do hospedeiro através da replicação dentro de uma variedade de células nucleadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2005). A duração da fase aguda varia geralmente entre 4 e 12 semanas, ao fim das quais o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer. Em paralelo, decrescem também os níveis de anticorpos IgM e sobem os níveis de IgG. Esses elementos praticamente definem a transição para a fase crônica da doença de Chagas (DIAS, 2000).

Na fase crônica, a maioria dos pacientes se mantém assintomáticos, caracterizando a forma indeterminada da doença. Esta fase é comprovada pela presença da infecção (revelada por sorologia e/ou métodos parasitológicos indiretos), associada à ausência de alterações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo (DIAS, 2000; PRATA, 2001; RASSI JÚNIOR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). A sintomatologia da fase crônica acomete aproximadamente 30% dos pacientes, normalmente por um período de 10 a 30 anos após a infecção. Esta fase geralmente é manifestada por comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal. Estas alterações estão agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva, que resultam em significativa morbidade e em aproximadamente 10 mil mortes anuais (HIGUCHI et al., 2003; DANTAS et al., 2006; WHO, 2010; RASSI JÚNIOR, RASSI, MARIN-NETO, 2010). Os sintomas dessa fase provêm da presença de ninhos de amastigotas, que levam a disfunção das células infectadas e causam reações inflamatórias, resultando em inchaço e diminuição da função do órgão

comprometido. Nesta fase, em geral, não se observa a presença do parasito na corrente sanguínea (PRATA, 2001; MONCAYO, SILVEIRA, 2009).

### 1.3 Quimioterapia da doença de Chagas

A quimioterapia para o tratamento da doença de Chagas ainda constitui um desafio. Atualmente existem apenas dois medicamentos eficazes, os nitroderivados benznidazol (Rochagan®, Radanil®) e o nifurtimox (Lampit®), ambos desenvolvidos nos anos 70 pelas indústrias farmacêuticas Roche e Bayer, respectivamente (COURA, 2009). Entretanto, no Brasil, após a proibição do uso do nifurtimox nos anos 80, o benznidazol é o único fármaco utilizado para o tratamento desta doença (PEDROSA et al., 2001; COURA; CASTRO, 2002). O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é o atual produtor deste fármaco, e cabe ao governo brasileiro a responsabilidade de distribuí-lo aos demais países da América Latina.

O mecanismo de ação do nifurtimox baseia-se na geração de radicais livres, tais como ânions superóxido e peróxido de hidrogênio. O benznidazol parece atuar via diferentes mecanismos, que envolve uma diminuição da síntese de proteínas, redução de incorporação dos precursores de RNA e diminuição da incorporação de timidina em DNA (BRENER, 2000). Ambos os fármacos atuam sobre o genoma do *T. cruzi*, inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas e aceleram a degradação dessas macromoléculas (STOPPANI, 1999).

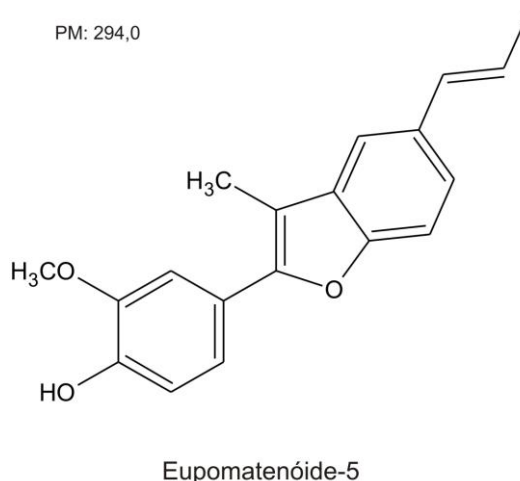
Estes fármacos são eficazes para o tratamento da fase aguda (PRATA, 2001), com uma taxa de cura de cerca de 80% dos infectados, entretanto em indivíduos cronicamente infectados a eficácia é reduzida para cerca de 20% (GALVÃO et al., 1993, COURA; CASTRO, 2002, COURA, 2009). Além disto, esses compostos podem causar toxicidade sistêmica com sérios efeitos colaterais, sendo a hipersensibilidade (*rash*, febre, edema generalizado, linfadenopatia, dores articulares e musculares), depressão da medula óssea (neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica) e polineuropatia periférica os mais importantes (MAYA et al., 2007). Devido a estes efeitos adversos, muitos pacientes acabam abandonando o tratamento (SILVA JÚNIOR et al., 2008).

Nos últimos anos, o interesse pela busca de novos compostos ativos menos tóxicos e mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas tem aumentado. O Brasil é privilegiado, pois a sua biodiversidade é bastante rica e extensa, sobretudo em algumas regiões, como a Floresta Amazônica, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Caatinga (CALIXTO, 2000;

YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001; BARREIRO; BOLZANI, 2009). Diversos produtos naturais, semi-sintéticos e sintéticos têm mostrado atividade tripanocida. Exemplos disto incluem o extrato aquoso de *Camellia sinensis* (PAVETO et al., 2004), óleos essenciais obtidos de *Syzygium aromaticum*, *Achillea millefolium* e *Ocimum basilicum* (SANTORO et al., 2007),  $\beta$ -lapachonas semi-sintéticas (MENNA-BARRETO et al., 2005), risedronato bifosfonato (GARZONI et al., 2004) e L-leucina-metil éster (ADADE et al., 2007). Entretanto, apesar dos esforços já realizados, estas substâncias ainda estão longe de se tornarem um fármaco (MAYA et al., 2007). Exemplos disso podem ser encontrados em uma revisão, onde cerca de 134 compostos já foram testados na última década contra *T. cruzi* (IZUMI et al., 2011).

#### **1.4 Eupomatenóide-5**

O gênero *Piper* pertencente à família *Piperaceae* (SANTOS et al., 2001) inclui um grande número de espécies que apresentam diversas atividades biológicas, tais como antifúngica (LOCHER et al., 1995; TRILLINI; VELASQUEZ; PELLEGRINO., 1996), antibacteriana e antiviral (CÁCERES et al., 1995; DEVEHAT et al., 2002). Dentre a diversas espécies deste gênero, *Piper regnellii* var. *pallescens*, popularmente conhecida como “pariparoba” ou “capeba” (CÔRREA, 1984) tem mostrado diversos efeitos biológicos: diurético, cicatrizante, desobstruente, emoliente, antibacteriano e antifúngico (BALBACH, 1974, HOLETZ et al., 2002; KOROISHI et al., 2008). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou a atividade do eupomatenóide-5, uma neolignana isolada de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens*, contra formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis* (VENDRAMETTO et al., 2010) e contra formas parasitárias de *T. cruzi* (LUIZE et al., 2006a; 2006b; PELIZZARO-ROCHA et al., 2011).



**Figura 1** – Estrutura química do eupomatenóide-5 [2-(4'-hydroxy-5'-methoxyphenyl)-3-methyl-5(E)-propenylbenzofuran] isolado de *Piper regnellii* var. *pallescens*.

Os parasitos de *L. amazonensis* tratados com este isolado apresentaram presença de vacúolos no citoplasma, figuras de mielina, extensão do retículo endoplasmático e inchaço mitocondrial (VENDRAMETTO et al., 2010). Em *T. cruzi*, resultados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura mostraram alterações morfológicas e ultra-estruturais, tais como células deformadas, intensa vacuolização do citoplasma, inchaço mitocondrial, aumento do retículo endoplasmático, descolamento da membrana plasmática e presença de vacúolos autofágicos nos parasitos tratados. Adicionalmente, eupomatenóide-5 provou ser mais seletivo ao parasito do que às células de mamíferos (LUIZE et al., 2006a; 2006b; PELIZZARO-ROCHA et al., 2011). As alterações induzidas pelo eupomatenóide-5 em *T. cruzi* sugerem a possibilidade de que diferentes componentes celulares podem ser alvos desta substância e que a mitocôndria e a membrana plasmática seriam as estruturas mais afetadas (PELIZZARO-ROCHA et al, 2011).

### 1.5 Potenciais alvos da atividade tripanocida de fármacos

Para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seletivos para o microrganismo, a seleção do alvo é de fundamental importância. Diante disso, muitos processos bioquímicos presentes em *T. cruzi*, mas ausentes nos hospedeiros mamíferos, vêm despertando o interesse de diversos pesquisadores a fim de produzir agentes que induzem a resposta terapêutica específica para o tratamento da doença de Chagas (BARRET et al., 2003; CROFT; BARRET; URBINA, 2005).



Os tripanossomatídeos, por serem eucariotos, apresentam processos metabólicos mais semelhantes aos das células dos hospedeiros mamíferos do que aqueles apresentados pelas bactérias. Entretanto, existem diferenças marcantes entre estas células que podem ser usadas como alvos para ação seletiva de substâncias químicas/fármacos contra *T. cruzi*. Por exemplo, em mamíferos o colesterol é o componente essencial das membranas celulares, já em *T. cruzi* o principal esterol presente em sua membrana é o ergosterol, também encontrado em fungos (DE SOUZA, 2000; MAYA et al., 2007; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009; URBINA, 2009; VAS et al., 2011).

Outro alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos com ação tripanocida é a mitocôndria, visto ser única em *T. cruzi*. Diversos alvos nesta organela já foram identificados, incluindo kDNA e topoisomerasas, cadeia transportadora de elétrons e síntese de ácidos graxos (WORTHEN; JENSEN; PARSONS, 2010; FIDALGO; GILLE, 2011).

Adicionalmente, os tripanossomatídeos são desprovidos de glutathione redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR), presentes em muitos organismos eucariotos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase de óxido-redução (redox) intracelular. Em substituição, os tripanossomatídeos possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona T(SH)<sub>2</sub>, responsável pela detoxificação de hidroperóxidos (ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 2001; TURRENS, 2004; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). A tripanotiona consiste de duas moléculas de glutathione (GSH) ligadas covalentemente por uma unidade de espermidina e é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TryR). Esta enzima exerce um papel central na proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mediante a reciclagem de tripanotiona oxidada (DUMAS et al., 1997; TOVAR et al., 1998; ROMÃO et al., 2006). Este sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* tem se mostrado muito sensível à ação de radicais livres (TURRENS, 2004) o que o torna um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas ações terapêuticas (DOCAMPO; MORENO, 1990; WILKINSON et al., 2002).

As proteases, enzimas responsáveis pela quebra de ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos, apresentam diversas funções em *T. cruzi*, envolvendo desde a invasão celular até o escape do parasito do sistema imune do hospedeiro (DIAS et al., 2009). Assim, algumas proteases têm sido apontadas como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como, cisteína proteases, serina proteases,

metaloproteínas e treonina proteases (SAJID; MCKERROW, 2002; SOEIRO; CASTRO, 2009).

As enzimas envolvidas na via glicolítica também têm sido bastante exploradas como alvos biológicos, pois a sua inibição levaria à redução da geração de energia, através da diminuição da produção de ATP no parasito. Dentre elas, destacam-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a hexoquinase e a fosfofrutoquinase (URBINA; CRESPO, 1984; SOUZA et al., 1998; SANZ-RODRIGUEZ et al., 2007; DIAS et al., 2009).

Outro alvo é a enzima *trans*-sialidase, uma glicoproteína de superfície de *T. cruzi*. Esta enzima é responsável pela transferência do ácido siálico para moléculas de mucina, dando origem a ligações  $\alpha$ -2,3 com moléculas de  $\beta$ -galactose aceptoras na superfície do parasito (LEGUIZAMÓN et al., 1994). Enzimas DNA topoisomerases I e II, que exercem papel essencial na replicação do DNA de *T. cruzi* (TSE-DINH, 2007), também têm sido amplamente estudadas. Além disto, visto que *T. cruzi* é deficiente na biossíntese de purinas, outro alvo válido é a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HGPRT) (SOBRINHO et al., 2007).

## 1.6 Mitocôndria: estrutura e função

*Trypanosoma cruzi* bem como todos os outros membros da família *Trypanosomatidae* exibem uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo do parasito (PAULIN et al., 1975). É uma organela bem desenvolvida, que apresenta um grande número de cristas mitocondriais em todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Além disso, a mitocôndria dos tripanossomatídeos possui uma estrutura intramitocondrial denominada cinetoplasto, localizada abaixo do corpúsculo basal, onde há grande quantidade de DNA organizado na forma de minicírculos, e compreende cerca de 30% do DNA total da célula (DE SOUZA, 2000). O volume mitocondrial abrange aproximadamente cerca de 12% da célula, o que dificulta evitar alterações desta organela durante a ruptura dos parasitos. Por isso, a complexidade ultraestrutural e algumas propriedades básicas dos processos bioenergéticos que acontecem na mitocôndria não são totalmente conhecidas (DAS, 1993). Assim, as funções mitocondriais destes protozoários têm sido determinadas em células permeabilizadas com digitonina (VERCESI et al., 1991).

Esta organela é essencial nas células eucarióticas, pois estão envolvidas com a produção de energia para as atividades do organismo; atuam na morte celular por apoptose; na

produção de calor e na contribuição genética a partir do DNA mitocondrial (LIMA; DUARTE; SÁ, 2010). Nestes organismos, a mitocôndria apresenta duas membranas altamente especializadas, uma externa e outra interna. A membrana externa é lisa, encontra-se em contato com o citoplasma, envolve totalmente a organela e é permeável a várias moléculas. A membrana interna, impermeável, apresenta invaginações denominadas cristas, que lhe oferece uma grande área de superfície (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Possuem o espaço intermembranar e o espaço interno da matriz onde estão presentes o DNA mitocondrial, os ribossomos mitocondriais, os RNAs e várias enzimas que estão envolvidas no metabolismo produtor de energia (ALBERTS et al., 2004).

Na membrana mitocondrial interna localiza-se a cadeia respiratória composta por uma série de transportadores que transforma energia redutora em um potencial de prótons transmembrana. Os transportadores de elétrons são a ubiquinona, nucleotídeos como o NADH, estruturas proteicas como os citocromos, as flavoproteínas e as ferro-sulfoproteínas. Os transportadores estão organizados em quatro complexos respiratórios: complexo I (NADH:coenzima Q-oxidoreductase); complexo II (succinato:coenzima Q-oxidoreductase); complexo III (coenzima Q: citocromo c-oxidoreductase) e o complexo IV (citocromo c-oxidase). O complexo V ou ATP sintase é responsável pela síntese de ATP (ALBERTS et al., 2004).

O complexo I recebe os elétrons presentes no NADH e transferem para a coenzima Q e em seguida para o complexo III, citocromo *c* e complexo IV e finalmente para o oxigênio. O complexo II recebe os prótons e elétrons presentes no succinato através de FAD que se reduz a FADH<sub>2</sub> e desta para a coenzima Q. Deste ponto em diante, segue o mesmo caminho: complexo III, citocromo *c*, complexo IV e oxigênio (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Em tripanossomatídeos a existência do complexo I é assunto de extenso debate. Acredita-se que este complexo não está envolvido na transdução de energia e que sua principal função seja a regeneração do NAD<sup>+</sup> mitocondrial (OPPERDOES & MICHELS, 2008). Este complexo pode ainda estar servindo de arcabouço para sustentação de outros complexos, fazendo com que estes adquiram uma conformação que tornem mais eficiente a transferência de elétrons entre os complexos (CARRANZA et al., 2009).

A mitocôndria representa o principal local de produção de espécies reativas de oxigênio em condições fisiológicas, visto que diferentes componentes da cadeia respiratória podem converter o oxigênio a radicais ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) quando reduzidos (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979; SIPOS; TRETTER; ADAM-VIZI, 2003). Os principais geradores de

EROs da cadeia respiratória são os complexos I e III (TURRENS; BOVERIS, 1980; TURRENS, 2003). O radical superóxido pode ser rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pelas Superóxido dismutases (SOD), e este, na presença de  $Fe^{2+}$ , gera o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ). Adicionalmente, para evitar o dano celular causado por EROs, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidantes que eliminam estes radicais por redução para água ou alcoóis (PIÑEYRO et al., 2005). Entretanto, em uma situação de estresse oxidativo, onde a produção de EROs é excessiva, ocorre a oxidação de macromoléculas, principalmente lipídios, proteínas e DNA, podendo desencadear a morte celular (KIRKINEZOS; MORAES, 2001).

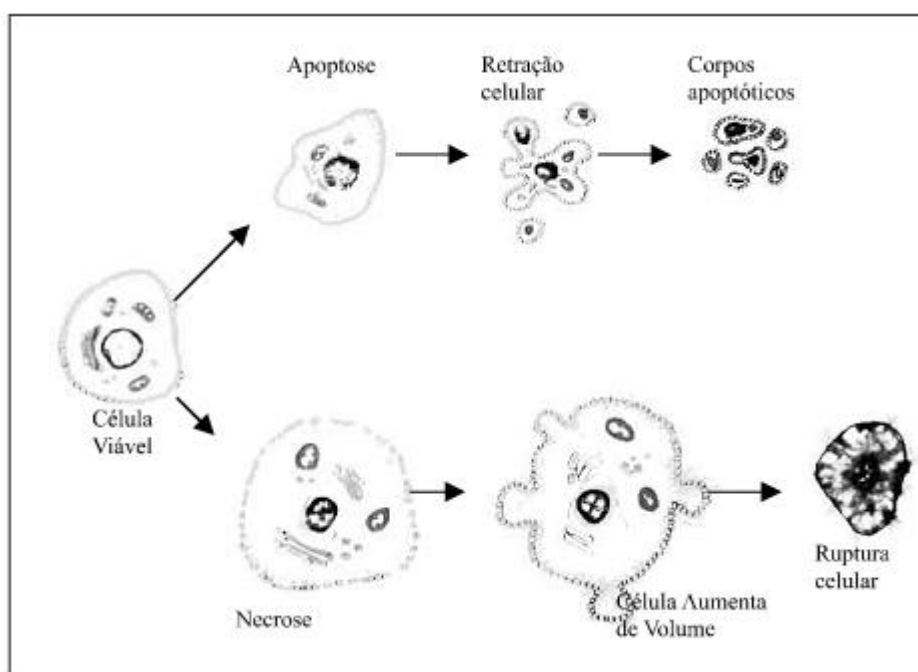
### 1.7 Tipos de morte celular

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com os aspectos funcionais (patológica, fisiológica, programada ou acidental), critérios enzimáticos (com envolvimento ou não de nucleases ou proteases), alterações morfológicas ou características imunológicas (imunogênica ou não-imunogênica). Dentre os tipos de morte celular destacam-se a apoptose, a necrose e a autofagia (KROEMER et al., 2009).

A apoptose representa um tipo de morte celular programada, desencadeada por fatores imunológicos, externos, tóxicos, infecciosos ou, ainda, pela própria necessidade de controle de crescimento e substituição celular (ANDRADE, 2003). É um processo essencial para a manutenção da homeostasia e desenvolvimento tecidual (JOZA et al., 2001; COSTA et al., 2009). A morte por apoptose é caracterizada por diversas alterações morfológicas (Figura 2) e bioquímicas, incluindo arredondamento da célula, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, pouca ou nenhuma alteração ultra-estrutural nas organelas, prolongamentos (*blebs*) na membrana celular, formação de corpos apoptóticos e externalização da fosfatidilserina (JIMENEZ et al., 2008; KROEMER et al., 2009; DE SOUZA et al., 2010; HORIKAWA; PEÑA, 2011). Estas alterações, independente do estímulo, são decorrentes da ativação de caspases que apresentam importância fundamental no processo de apoptose (PEREIRA, 2006).

A necrose, outro tipo de morte celular, tem como os principais contribuintes da sua propagação e execução o cálcio e as espécies reativas de oxigênio. Estes direta ou indiretamente causam diversos danos aos constituintes celulares, resultando em ruptura de organelas e afetando a integridade celular. A morte celular por necrose apresenta algumas

peculiaridades como aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e ruptura da célula (Figura 2) (RODRIGUES; SEABRA; DE SOUZA, 2006; KROEMER et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; HORIKAWA; PEÑA, 2011). Estas alterações, independente do estímulo, são decorrentes das alterações lisossomais, que perdem a capacidade de conter as hidrolases (proteases, lipases, glicosidases, nucleases) no seu interior. Estas enzimas livres no citosol são ativadas e iniciam o processo de autólise, degradando praticamente todos os substratos celulares (PEREIRA, 2006). Durante o processo necrótico ocorre liberação do conteúdo celular com consequentes danos às células vizinhas e reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006).



**Figura 2** – Características morfológicas da apoptose e da necrose: [http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao4.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf).

A autofagia é um processo celular catabólico que objetiva eliminar componentes citoplasmáticos em condições de estresse (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Este processo pode ser classificado em três tipos distintos. O tipo predominante é a macroautofagia, um processo não-seletivo, que isola o material a ser degradado em uma dupla membrana dando origem ao autofagossomo, ou vacúolo autofágico. Este posteriormente se fundirá ao lisossomo, formando o autolisossomo. Em seguida, o conteúdo do autofagossomo é degradado por hidrolases lisossomais (KELEKAR, 2005; HANNIGAN;

GORSKI, 2009; KIEL, 2010). A microautofagia consiste na degradação dos constituintes citoplasmáticos enviados diretamente para o lisossomo, internalizados por invaginação ou protusão da membrana lisossomal, formando o autolisossomo (KIEL, 2010; BRENNAND et al., 2011). O terceiro tipo de processo autofágico é mediado por chaperonas, onde proteínas malformadas reconhecidas por chaperonas são enviadas diretamente para o lisossomo (MASSEY; KIFFIN; CUERVO, 2004; KROEMER; JAATELA, 2005). A autofagia, ao contrário da apoptose e da necrose que são processos típicos de morte celular, é geralmente considerada um processo que promove a sobrevivência da célula através da degradação e remodelação celular. Porém, em situações na qual a degradação dos componentes citoplasmáticos é contínua, a autofagia pode resultar em morte celular (KROEMER et al., 2009; BRENNAND et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos envolvidos na morte celular de *Trypanosoma cruzi* provocada pela atividade tripanocida do eupomatenóide-5.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do eupomatenóide-5 sobre:
  - o potencial de membrana mitocondrial;
  - a integridade da membrana celular;
  - o DNA;
  - o volume celular;
  - a formação de ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mitocondrial;
  - a peroxidação lipídica;
  - a formação de vacúolos autofágicos.

## REFERÊNCIAS

ADADE, C. M., FIGUEIREDO, R. C., DE CASTRO, S. L. , SOARES, M. J. - Effect of L-leucine methyl ester on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 101, p. 69-79, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WLATER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed.; Porto Alegre: Artmed, 2004.

ANDRADE, S. G. Apoptose e sua importância no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 2, p. 163-173, 2003.

ANDREOLLO, N. A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 22, n. 4, p. 189-191. 2009.

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5892–5902, 2004.

ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, p. 189-198, 2001.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 3ª ed., São Paulo, 1974.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BITTENCOURT, A. L. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRENER, Z. Presents status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 7, p. 71-90, 1979.



BRENER, Z. In: Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. S. Wendel, Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.). **International Society for Blood Transfusion**, 1992.

BRENER, Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COPPENSC, I.; RIGDEND, D. J.; GINGERE, M. L.; MICHELS, P. A. M.; Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 177, p. 83-99, 2011.

CABALLERO, A. P.; MARÍN, C.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; BAREA, E.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; SALAS, J. M. *In vitro* and *in vivo* antiparasital activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7(4H)-one-based complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, p. 770-776, 2011.

CÁCERES, A.; MENENDEZ, H.; MENDEZ, E.; COHOBON, E.; SAMOYA, B. E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILHO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 85-88, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, V.; STRABELLI, T. M.; AMATO NETO, V.; SILVA, C. P.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; STOLF, N. A. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 27, p. 597-602, 2008.

CARLIER, Y. Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, v. 162, p. 409-416, 2007.

CARLIER, Y.; TORRICO, F.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G.; LUQUETTI, A.; FREILIJ, H.; VINAS, P. A. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **Public Library of Science**, v. 5, p. 1-13, 2011.

CARRANZA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; MENDONÇA, M. A.; DE OLIVEIRA, T. C.; GADELHA, F. R.; ZINGALES, B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered

in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 41, n. 3, p. 299-308, 2009.

CAZZULO, J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2;2, p. 1261–1271, 2002.

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

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, v. 5, p. 177-183, 1984.

COSTA, J. F.; WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. M. L; BARCISCKI, M. A.; BARRAL, A.; BORGES, V. M. Mimetismo apoptótico como possível mecanismo imunopatogênico da Leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 3, p. 40-44, 2009.

COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 39, p. 113-117, 2006.

COURA, J. R. Origem, determinants e morbidade da Doença de Chagas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud**. Universidad de Carabobo, v. 1, p. 62-66, 2007.

COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 508–512, 2005.

DANTAS, A. P., SALOMÃO, K., BARBOSA, H. S., CASTRO, S. L. The effect of *Bulgarian propolis* against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 207-211, 2006.

DAS, A. Studies on mitochondrial ATPase of *Leishmania donovani* using digitonina-permeabilized promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 60, p. 293-302, 1993.

DE SOUZA, E. M.; NEFERTITI, A. S. G.; BAILLY, C.; LANSIAUX, A.; SOEIRO, M. N. C. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 341, p. 173-180, 2010.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International review of cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89-100, 2009.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease**, v. 2009, p. 1-10, 2009.

DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

DEVEHAT, F. L.; BAKHTIAR, A.; BEZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 400-405, 2002.

DIAS, J. C. P. Cecílio Romãna, Romãna's sign and Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 407-413, 1997.

DIAS, J. C. P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DIAS, J. C. P. – The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 772-774, 2006.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A. Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas Disease Control in Latin America – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G. O.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The metabolism and mode of action of gentian violet. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 161-178, 1990.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v. 11, p. 443-448, 1999.

DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S.; OLIVER, M.; PAPADOPOULOU, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **Embo Journal**, v. 16, p. 2590-2598, 1997.

FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 1371-1387, 2006.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

GALVÃO, L. M., NUNES, R. M., CANÇADO, J. R., BRENER, Z., KRETTLI, A. U. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 87, p.220-223, 1993.

GARZONI, L. R., CALDERA, A., MEIRELLES, M. N., DE CASTRO, S. L., DOCAMPO, R., MEINTS, G. A., OLDFIELD, E., URBINA, J. A. - Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 273-285, 2004.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, p. 3-12, 2010.

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 29-32, 2003.

HANNIGAN, A. M.; GORSKI, S. M. Macroautophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 2, p. 140-151, 2009.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-668, 2001.

HIGUCHI, M. L. BENVENUTI, L. A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 96-107, 2003.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, 7, p.1027-1031, 2002.

HORIKAWA, M. M.; PEÑA, M. S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para um infecção bem sucedida. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 32-37, 2011.

IANNI, B. M.; MADY, C. Como era gostoso o meu caldo de cana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 6, p. 379-381, 2005.

IZUMI, E., MORELLO, L. G., UEDA-NAKAMURA, T., YAMADA-OGATTA, S. F., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P., MORGADO-DÍAZ, J. A., NAKAMURA, C. V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 324–330, 2008.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plants compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 809-823, 2011.

JIMENEZ, V.; PAREDES, R.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, p. 688–698, 2008.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasite & Vectors**, v. 3, n. 104, p. 1-15, 2010.

JOZA, N.; SUSIN, S. A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W. L.; CHO, S. K.; LI, S. Y. J.; SASAKI, T.; ELIA, A. J.; CHENG, H. Y. M.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K. F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, Y.; MAK, T. W.; ZUNIGA-PFLUCKER, J. C.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v.410, p. 549-554, 2001.

KELEKAR, A. Autophagy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, p. 259-271, 2005.

KIEL, J. Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, n. 1541, p. 819-830, 2010.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 449–457, 2001.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KOROISHI, A. M.; FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 270-277, 2008.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p.1236-1248, 2008.

KROEMER, G.; JAATTELA, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature**, v. 5, p. 886-897, 2005.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.;

GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY B.; MELINO, G. Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; GUILLEN, I.; GANZÁLEZ CAPPÀ, S. M., FRASCH, A. C. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infectious. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 6, p. 1570-1574, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed.; São Paulo: Sarvier, 1995.

LIESE, B. H.; SCHUBERT, L. Official development assistance for health – how neglected are neglected tropical diseases? An analysis of health financing. **International Health**, v. 1, p. 141-147, 2009.

LIMA, T. F. O.; DUARTE, D. A.; SÁ, A. L. B. Mitocôndria revisada. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 1, p. 94-107, 2010.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN, D. A. B.; VLIETINCK, A. J. Antimicrobial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32, 1995.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, p. 2126–2130, 2006a.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MORGADO-DIAZ, J. A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 31-37, 2006b.

MASSEY, A.; KIFFIN, R.; CUERVO, A. M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 2420-2434, 2004.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F., HENRIQUES-PONS, A., PINTO, A. V., MORGADO-DIAZ, J. A., SOARES, M. J., DE CASTRO, S. L. - Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1034-1041, 2005.

MICHELS, P. A. M.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1463-1477, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública, 2010. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Doença de Chagas Aguda – Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais de saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/10738/7137>.

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

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

OPPERDOES, F.; MICHELS, P. A. M. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 310-317, 2008.

PATTERSON, J. S.; BARBOSA, S. E.; FELICIANGELI, M. D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Tropica**, v. 110, p. 187-199, 2009.

PAULIN, J. The chondriome of selected trypanosomatidia. Three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 403-413, 1975.



PAVETO, C., GÜIDA, M. C., ESTEVA, M. I., MARTINO, V., COUSSIO, J., FLAWIÁ, M., TORRES, H. N. - Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 69-74, 2004.

PEDROSA, R. C.; BEM, A. F.; LOCATELLI, C.; PEDROSA, R. C.; GEREMIAS, R.; WILHELM FILHO, D. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PELIZZARO-ROCHA, K. J.; TIUMAN, T. S.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 36-39, 2010.

PELIZZARO-ROCHA, K. J.; VEIGA-SANTOS, P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; XIMENES, V. F.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1018-1024, 2011.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PIÑEYRO, M.; PIZARRO, J.; LEMA, F.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; BENTLEY, G.; ROBELLO, C. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Structural Biology**, v. 150, p. 11-22, 2005.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.

RASSI JÚNIOR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. – Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

RODRIGUES, J. C.; SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 87-98, 2006.

ROMÃO, P. R.; TOVAR, J.; FONSECA, S. G.; MORAES, R. H.; CRUZ, A. K.; HOTHERSALL, J. S.; NORONHA-DUTRA, A. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 355-363, 2006.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L. *Trypanosoma cruzi*: Activity of Essential Oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283-290, 2007.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

SANZ-RODRIGUEZ, C. E.; CONCEPCIÓN, J. L.; PEKERAR, S.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A. Bisphosphonates as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, 12377-12387, 2007.

SESPA. Secretaria de Estado de Saúde Pública. Sespa vai combater subnotificação dos casos de Chagas, 2011. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br>.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. C. F. R.; LOPES, F. A.; SIMONE, C. A.; ANDRADE, C. K. Z.; PINTO, A. V.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030-5038, 2008.

SILVEIRA, A. C. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. **Saúde Brasil**, v. 1, p. 212-218, 1983.

SIPOS, I.; TRETTER, L.; ADAM-VIZI, V. The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 1575-1581, 2003.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. M.; LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; NETO, P. J. R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SOEIRO, M. N. C.; CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.

SOUZA, D. H.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D.; MICHELS, P. A.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal

glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Problemática de la enfermedad de Chagas. **Simpósio Internacional Academia Nacional de Medicina**, Buenos Aires, v. 59, p. 147-165, 1999.

TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J. C.; FAIRLAMB, A. H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the *tryA* locus. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 653-660, 1998.

TRILLINI, B.; VELASQUEZ, E. R.; PELLEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Planta Medica**, v. 62, p. 372-373, 1996.

TSE-DINH, Y. C. Exploring DNA topoisomerases as targets of novel therapeutic agents in the treatment of infectious diseases. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 3-9, 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344, 2003.

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

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 191, p. 421-427, 1980.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.

URBINA, J. A.; CRESPO, A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, p. 225-239, 1984.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae – *Trypanosoma cruzi*/T. *Rangeli*: vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VAS, M. G.; PORTAL, P.; ALONSO, G. D.; SCHLESINGER, M.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N.; VILLAMIL, S. F.; PAVETO, C. The NADPH–cytochrome P450 reductase family in *Trypanosoma cruzi* is involved in the sterol biosynthesis pathway. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 99-108, 2011.

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

VERCESI, A.; BERNARDES, C.; HOFFMAN, M.; GADELHA, F.; DOCAMPO, R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14431-14434, 1991.

WHO - World Health Organization. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina, 2007.

WHO. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases, 2010.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17062–17071, 2002.

WORTHEN, C.; JENSEN, B. C.; PARSONS, M. Diverse Effects on Mitochondrial and Nuclear Functions Elicited by Drugs and Genetic Knockdowns in Bloodstream Stage *Trypanosoma brucei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 1-13, 2010.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da história de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-128, 2004.

**ANEXO: Artigo a ser submetido (Revista: Free Radical Biology & Medicine)**

**Further evidences for the mechanism of action of eupomatenoid-5: confirmation of ROS involvement owing mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi***

**Further evidences for the mechanism of action of eupomatenoid-5: confirmation of ROS involvement owing mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi***

Lazarin-Bidóia, D.<sup>1</sup>, Desoti, V. C.<sup>1</sup>, Ueda-Nakamura T.<sup>1,2</sup>, Dias Filho B. P.<sup>1,2</sup>, Nakamura C. V.<sup>1,2</sup>, Silva, S. O.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900, Maringá, Brasil.*

<sup>2</sup>*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900, Maringá, Brasil.*

\* Corresponding author: Sueli de Oliveira Silva, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Bloco I-90 CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44 3011-8989, Fax +55 44 3011-4860. E-mail: [lautenschlager@uem.br](mailto:lautenschlager@uem.br)

## **Abstract**

Since its discovery in 1909, the treatment for Chagas' disease has been restricted to two compounds which have limited efficacy and serious side effects. In this context, natural products are a promising option for the treatment of this infection. In a previous work, our group reported trypanocidal activity of eupomatenoid-5, a neolignan isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens* in the main three parasitic forms of *Trypanosoma cruzi*. Here, we sought to better assess the biochemical alterations induced by this compound in order to elucidate the mechanisms of action involved in the cell death of *T. cruzi*. Eupomatenoid-5 caused mitochondrial and plasma membrane alterations. Additionally, eupomatenoid-5 induced the increase of reactive oxygen species production, lipid peroxidation and DNA fragmentation. Our results suggest that the trypanocidal action of eupomatenoid-5 is closely related with mitochondrial dysfunction followed by an increase of ROS formation leading to an oxidative imbalance. These are key events to induce cell death through different pathways including, apoptosis, necrosis and autophagy. In addition, eupomatenoid-5 act as an effective compound mainly for trypomastigotes, the infective and non-replicative form of *T. cruzi*. Amastigotes, involved in the chronic phase of Chagas' disease, are also sensitive to eupomatenoid-5 treatment.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Eupomatenoid-5, ROS, mitochondria, cell death.

## Introduction

Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is considered a serious public health problem that affects approximately 10 million people in Latin America. The incidence of this disease has been estimated at 300,000 new cases per year and about 10,000 people die from this infection annually [1-3]. Since its discovery in 1909 [4], the treatment of this infection is still a challenge because it is restricted to only two nitro derivatives compounds, benznidazole and nifurtimox, which have limited efficacy, especially in the chronic phase, as well as result in serious side effects [5].

In this context, there is an urgent need for new active compounds that are less toxic and more effective for the treatment of Chagas' disease. An increasing number of studies have published a bunch of natural compounds with selective trypanocidal action [6]. In fact, natural products are promising for the treatment of infectious and non-infectious diseases due to the diversity of their molecular structures [6]. However, few studies have demonstrated trypanocidal compounds with an effective action on the three forms of *T. cruzi* [7,8]. This is reasonable considering the complex life cycle and the distinct morphological and functional forms of *T. cruzi* [9,10]. Another important issue is that few studies have demonstrated the likely mechanisms of action of these trypanocidal compounds.

Our group recently reported the trypanocidal activity of eupomatenoid-5, a neolignan isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens* in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* [11-13]. This compound induced ultrastructural alterations and proved to be more selective toward parasite than toward mammalian cells [12,13].

Considering the trypanocidal activity of eupomatenoid-5, this study sought to better assess the biochemical alterations induced by this compound in the three parasitic forms of *T. cruzi*. Our goal was to elucidate the mechanisms of action of eupomatenoid-5 involved in the cell death of *T. cruzi*. For this, based on our previous work [13], we directed our efforts to



study the plasma membrane disruption and mitochondrial dysfunction, induced by eupomatenoid-5. Our results provide further insight into the mechanisms of action of eupomatenoid-5 and strongly suggest eupomatenoid-5 as an effective compound to treat Chagas' disease with remarkable trypanocidal action in both forms relevant for mammalian infection, trypomastigotes and amastigotes.

## **Materials and methods**

### *Chemicals*

Actinomycin D, antimycin A, bovine serum albumin, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, digitonin, dimethylsulfoxide, monodansylcadaverine, rhodamine 123, thiobarbituric acid, and wortmannin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum was from Invitrogen (Grand Island, NY, USA); MitoSOX kit, propidium iodide, and TUNEL kit was from Invitrogen (Eugene, OR, USA) and protein assay kit was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

### *Isolation of eupomatenoid-5 from leaves of Piper regnellii var. pallescens*

Eupomatenoid-5 (Fig. 1) was isolated from leaves of *P. regnellii* collected in the Prof. Irenice Silva Garden of Medicinal Plants on the campus of the State University of Maringa (UEM) in Parana. A voucher specimen (No. HUM 8392) was deposited at the UEM Herbarium. The dry plant material was extracted by exhaustive maceration at room temperature in the dark in ethanol:water (90:10). The fractionation was performed from the ethyl-acetate crude extract to obtain the hexane fraction, and a dihydrobenzofuran neolignan, eupomatenoid-5, was isolated from this fraction, as described previously [11]. The compound

was purified by absorption-chromatographic methods and identified by spectral analyses of UV, IR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, COSY, HETCOR, gNOESY, HMBC, HETRL, and GC/MS. The data were compared with the literature [14].

Stock solutions of eupomatenoid-5 were prepared aseptically in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in culture medium so that the DMSO concentration did not exceed 1% in the experiments. The concentrations of eupomatenoid-5 used in the assays were based on the  $\text{IC}_{50}$  and  $\text{IC}_{90}$  values [11].

#### *Parasites and cell cultures*

All experiments were performed with the Y strain of *T. cruzi*. Epimastigote forms were maintained axenically at 28 °C with weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at pH 7.4 [15].

Trypomastigote and amastigote forms were obtained from the supernatants of previously infected LLCMK<sub>2</sub> cells monolayer (epithelial cells of monkey kidney - *Macaca mulatta* – ATCC CCL-7, American Type Culture Collection, Rockville, MD) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 50 mg/L gentamicin and buffered with sodium bicarbonate in a 5% CO<sub>2</sub> air mixture at 37 °C.

#### *Mitochondrial membrane potential assay*

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) was evaluated during the exposure of epimastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 28 °C and trypomastigote and amastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 37 °C. After that, the parasites were washed and incubated with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of rhodamine 123 (Rh123) for 15 min to verify  $\Delta\Psi\text{m}$ . Carbonyl

cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) (100.0  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with the CellQuest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to the parasites. Alterations in the fluorescence of Rh123 were quantified using an index of variation (IV) obtained by the equation  $(\text{MT} - \text{MC}) / \text{MC}$ , where MT is the median of fluorescence for treated parasites and MC that of control parasites. Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane.

#### *Cell membrane integrity assay*

Cell membrane integrity was evaluated during the exposure of epimastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 28 °C and trypomastigote and amastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 37 °C. After that, the parasites were washed and incubated with 0.2  $\mu\text{g/mL}$  of propidium iodide (PI) for 10 min to verify cell membrane integrity. Digitonin (40.0  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer equipped with the CellQuest software. A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to the parasites. Alterations in the fluorescence of PI were quantified as the percent of altered cells to plasma membrane.

#### *Fluorimetric detection of mitochondrial-derived $\text{O}_2^{\cdot-}$*

Mitochondrial production of superoxide anion was evaluated during the exposure of epimastigote forms to 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5, and trypomastigote and

amastigote forms to 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5, using the fluorescent  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sensitive, mitochondrial-targeted probe MitoSOX [3,8-phenanthridinediamine, 5-(6-triphenylphosphoniumhexyl)-5,6-dihydro-6-phenyl]. Parasites ( $2 \times 10^7$  cells/mL) were loaded with 5  $\mu\text{M}$  MitoSOX for 10 min at 22  $^\circ\text{C}$  and then washed with the KH (Krebs-Henseleit) buffer (pH 7.3) containing 15 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 1.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Loaded cells were exposed to the stimuli, and after suitable times the fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (Victor X3 - PerkinElmer) at  $\lambda_{\text{ex}} = 510$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 580$  nm. The oxidized MitoSOX (oxMitoSOX), becomes highly fluorescent upon binding to nucleic acids. Cells were exposed to 10  $\mu\text{M}$  antimycin A (AA), a stimulus known to induce  $\text{O}_2^{\cdot-}$  production by mitochondria.

#### *Lipid peroxidation assay*

The extent of lipid peroxidation was determined as the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in terms of malondialdehyde (MDA). Epimastigote forms (12 mg/mL) were treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid- 5 for 3 h at 28  $^\circ\text{C}$ . Trypomastigote and amastigote forms (12 mg/mL) were treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 37  $^\circ\text{C}$ . After incubation, samples (0.5 mg protein) were heated in a solution containing 0.37% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, and 0.25 N HCl for 45 min at 95  $^\circ\text{C}$ . After cooling, the absorbance was read at 532 nm and the concentration of TBARS was calculated based on a  $\epsilon$  value of  $153\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16].

#### *DNA fragmentation*

The DNA double-strand ruptures was evaluated *in situ* by TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling). For this, epimastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 96 h at 28  $^\circ\text{C}$ .

Trypomastigote and amastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 24 h at 37 °C. After, the cells were fixed and subjected to the TUNEL assay according to the manufacturer's instructions. Actinomycin D (8.0  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. The nuclei were counterstained with PI which denotes condensation and margination of the chromatin. Cells that have undergone DNA double-strand ruptures should fluorescence brightly when viewed with filter sets appropriate, unlike the untreated cells. Fluorescence was observed in a fluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus<sup>®</sup>) and pictures were captured with a UC30 camera (Olympus<sup>®</sup>).

#### *Cell volume determination*

Epimastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid- 5 for 3 h at 28 °C and trypomastigote and amastigote forms treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 3 h at 37 °C, were collected by centrifugation, washed twice in PBS, resuspended in PBS and analyzed by fluorescence-activated cell sorting using a FACSCalibur flow cytometer. Actinomycin D (20.0 mM) was used as a positive control. A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to the parasites. Histograms and analysis were performed in CellQuest software, FSC-H which represents the cell volume.

#### *Evaluation of autophagic vacuoles*

The autophagic vacuoles were evaluated using monodansylcadaverine labeling (MDC) [17]. For this, epimastigote forms ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 96 h at 28 °C and trypomastigote and amastigote forms were treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  of eupomatenoid-5 for 24 h at 37 °C. Thus, the cells were incubated with 0.05 mM of MDC in PBS for 15 min. After incubation the cells were

washed twice in PBS. MDC stain was analyzed by fluorescence microscope Olympus BX51 and images were captured using a UC30 camera. In some experiments, before induction of autophagy, cells were pre-treated with wortmannin, a potent PI3- kinase inhibitor, an enzyme part of the signaling pathway involved in autophagy regulation [18].

### *Statistical analysis*

The data shown in the graphs are expressed as means  $\pm$  standard deviation of the mean (SEM) of independent preparations. Data were analyzed with one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), significant differences among means were identified by Tukey post-test.  $P \leq 0.05$  was adopted as the minimum criterion of significance. Statistical analyses were performed using the Statistica™ software package.

## **Results**

### *Effect of eupomatenoid-5 on mitochondrial membrane potential of Trypanosoma cruzi*

Previous work demonstrated, by electron microscopy, the effect of eupomatenoid-5 on mitochondria of *T. cruzi* [12]. Based on that, we decided to evaluate the  $\Delta\Psi_m$  in eupomatenoid-5-treated parasites by flow cytometry. Histograms show a marked decrease in fluorescence intensity total Rh 123 in the three parasitic forms, indicating mitochondrial depolarization (Fig. 2 and Table 1). This loss of  $\Delta\Psi_m$  was dose-dependent and significantly different in all concentrations tested, for the three parasitic forms, when compared to the control group. However, the loss of  $\Delta\Psi_m$  was noticeably more pronounced in trypomastigote and amastigote forms in which  $\Delta\Psi_m$  reductions higher than 70.0 % were observed in all tested concentrations. Additionally, a drop of over 90% in the fluorescence intensity was observed with the higher concentration of eupomatenoid-5 (170.0  $\mu\text{M}$ ) for the three parasitic

forms. The positive control CCCP in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes induced 82.2%, 84.6% e 84.7% change in mitochondrial membrane potential, respectively.

#### *Effect of eupomatenoid-5 on cell membrane integrity of Trypanosoma cruzi*

Our previous work also demonstrated that eupomatenoid-5 induced cell membrane disruption [13]. This prompted us to evaluate the cell membrane integrity in eupomatenoid-5-treated parasites by flow cytometry. Eupomatenoid-5, affect the membrane integrity of epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi* when compared to untreated cells (Fig. 3). The histograms show, mainly for trypomastigotes, an increase in the intensity of PI fluorescence (33-83% PI+ parasites) at all concentrations tested, indicating alterations of cell membrane integrity. In epimastigotes, in the higher concentrations, around 60% of parasites were PI+ were clearly more sensitive to eupomatenoid-5 treatment than amastigotes (PI+ up to 35%). The positive control digitonin in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes showed an increase in fluorescence of 99.04%, 55.45% and 98.70%, respectively.

#### *Detection of mitochondrial-derived $O_2^{\bullet-}$ of Trypanosoma cruzi*

Changes in  $\Delta\Psi_m$  can induce a range of mitochondrial disorders that seriously compromise mitochondrial function and consequently the cell viability. A classic example of disorders induced by  $\Delta\Psi_m$  alteration is the increase in the production of ROS through the electron transport chain [19]. Thus, based on our  $\Delta\Psi_m$  results we decided to evaluate the superoxide anion production ( $O_2^{\bullet-}$ ) in eupomatenoid-5-treated parasites. Figure 4 shows a significant increase in the production of mitochondrial  $O_2^{\bullet-}$  in all concentrations and time tested for the three parasitic forms, when compared to the control group. Once again, eupomatenoid-5 induced a pronounced effect on trypomastigote forms leading up to 3-fold increases in superoxide anion production after 3 h (Fig. 4B). After trypomastigotes,

epimastigotes was somewhat more sensitive to the production of superoxide anion than amastigotes. The positive control with AA also induced 2-, 3-, and 1-fold increases in mitochondrial  $O_2^{\bullet-}$  production in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes, respectively.

#### *Effect of eupomatenoid-5 on lipid peroxidation of Trypanosoma cruzi*

Our previous experiment demonstrated that eupomatenoid-5 induced an increase on the formation of mitochondrial ROS. Eupomatenoid-5 also induced alteration in the antioxidant enzyme activity of *T. cruzi* [13]. Taking these together, we expected that this eupomatenoid-5 was triggering an oxidative imbalance leading to molecular and structural alterations in the parasite. Strong evidence for this was the plasma membrane disruption results described above [20]. To ensure that, we measured the production of TBARS, which is frequently used to quantify lipoperoxidation of the cell membrane and is expressed by the production of MDA, in eupomatenoid-5-treated parasites [21]. According to the Fig. 5, the increase in MDA in the three parasitic forms was significantly different after 3 h when compared to the control group. This increase was dose-dependent, however more pronounced for trypomastigotes (up to 4.3-fold), followed by epimastigotes (up to 3.3-fold) and then amastigotes (up to 2.7-fold).

#### *Effect of eupomatenoid-5 on DNA fragmentation of Trypanosoma cruzi*

The oxidative imbalance induced by eupomatenoid-5 might also trigger destructive effects on DNA [20]. As shown in Figure 6, the three parasitic forms treated with different concentrations of eupomatenoid-5 and staining with TUNEL exhibited a bright fluorescence, indicative of DNA fragmentation when compared to the untreated parasites. Additionally, the counterstaining with PI in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes denotes that eupomatenoid-5 induced the condensation and margination of chromatin [22]. Bright



fluorescence was also observed with actinomycin D, a known apoptotic inducer (data not shown).

#### *Effect of eupomatenoid-5 on cell volume of Trypanosoma cruzi*

DNA fragmentation is a classic example of apoptosis. Thus, we next studied the effect of eupomatenoid-5 on apoptotic parasite death [23]. For this, we performed additional experiments to evaluate the cell shrinkage, also a hallmark of apoptotic death, in eupomatenoid-5-treated parasites. As shown in Figure 7, there was a significant decrease in cell volume in all concentrations tested, for the three parasitic forms, when compared to the control group. In addition, trypomastigotes were more sensitive to the effect of eupomatenoid-5 presenting a decrease in cell volume higher than 80.0 % in any tested concentration (Fig. 7B). Once again, eupomatenoid-5 induced an effect in epimastigotes and amastigotes smaller than for trypomastigotes. The positive control Actinomycin D, in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes, also induced a decrease in cell volume 28%, 71% and 41%, respectively.

#### *Effect of eupomatenoid-5 on formation of autophagic vacuoles in Trypanosoma cruzi*

Based on our previous TEM data [12] that showed an intense formation of autophagic vacuoles on *T. cruzi* treated with eupomatenoid-5, we decided to evaluate, through MDC staining, a fluorescent probe that accumulates in autophagic vacuoles [24], if autophagy could also be an alternative death pathway induced by eupomatenoid-5. As shown in Figure 8 the presence of fluorescence in rounded structures in the three parasitic forms, revealed the formation of autophagic vacuoles when compared to untreated parasites. This effect could be partially prevented in the parasites pre-treated with wortmannin.

## Discussion

A number of natural and synthetic compounds [6,25] to treat Chagas' disease have been studied over the 100 years since its discovery in 1909 [4]. Nevertheless, the treatment of this infection remains a problem, especially in the chronic phase of the disease when amastigotes are the predominant forms. Our previous studies have demonstrated the effective and selective action of eupomatenoid-5 in the main forms of *T. cruzi*. Additionally eupomatenoid-5 proved to induce important ultrastructural alterations in the three forms of *T. cruzi* evidenced by electronic microscopy [12,13]. In this context, we sought to further elucidate the mechanism of action of eupomatenoid-5 involved in the cell death of this protozoan.

Initially, we directed our studies investigating alterations in the mitochondria and plasma membrane through staining treated parasites with Rh 123 and PI. Considering the high sensitivity of these assays, the three parasitic forms, especially trypomastigotes, the infective and non replicative form of *T. cruzi*, noticeably presented  $\Delta\Psi_m$  reduction and plasma membrane permeability alterations. It is known that trypomastigotes, as a result of remodeling along *T. cruzi* life cycle, have a reduced  $\Delta\Psi_m$  [26]. These data strongly suggest that any compound, for example eupomatenoid-5, with mitochondria affinity would easily reduce the  $\Delta\Psi_m$ . Actually, an increasing number of papers have been published yearly describing trypanocidal compounds targeting *T. cruzi* mitochondria [19,27].

We showed that eupomatenoid-5 also induce, in the three parasitic forms, an oxidative imbalance evidenced by the increase of ROS formation, lipid peroxidation and DNA fragmentation. Surprisingly, all these alterations were more pronounced in trypomastigotes which exhibit increased levels of antioxidant enzymes and should be more efficient than the other forms in detoxifying [26,28]. This scenario made us believe that eupomatenoid-5 acts efficiently, not only increasing ROS formation, but also decreasing antioxidant enzymes

activities. In fact, trypanocidal compounds have been described targeting enzymes involved in the peroxide detoxification of *T. cruzi* [29,30].

In this context, a question arises, what came first, the decreasing in antioxidant enzymes activities or the increasing of ROS? More than that, should the increase of ROS formation induced by eupomatenoid-5 be considered as a cause of mitochondrial dysfunction or a consequence of mitochondrial dysfunction? In fact, besides the synthesis of ATP, mitochondria are also involved in the formation of ROS [31]. Mitochondrial ROS formation plays an important role on cellular redox balance and has been essential in many signaling processes [26,32]. However, the ROS generation is also strongly involved in degenerative process through macromolecules damage, mainly proteins, lipids and DNA [33,34]. Taking all these together, our hypothesis is that eupomatenoid-5 acts on mitochondria function reducing  $\Delta\Psi_m$  followed by the increase of mitochondrial ROS production through the electron transport chain (Fig. 9). This increase of ROS would act in any membrane of the parasite, including mitochondrial membrane, impairing even more mitochondria dysfunction, which might induce more ROS generation [35,36]. All these mean “ROS as a consequence of mitochondria dysfunction”. This phenomenon is conceivable and is well supported by the “Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS-release” (RIRR) process [37].

It is likely that eupomatenoid-5 might decrease antioxidant enzymes activities. However, our previous work pointed to the action of eupomatenoid-5 on the activities of enzymes that participate in the hydroperoxide detoxification, not reducing the enzyme activity, but as a result of the continuous oxidative stress induced by this compound [13].

The experiments presented here provide compelling evidences that eupomatenoid-5 induce biochemical alterations on *T. cruzi* leading to parasite death. According to DNA fragmentation and reduced parasite volume data reported here we strongly believe that apoptosis is a death pathway involved in eupomatenoid-5 trypanocidal action. Based on

plasma membrane disruption, necrosis could also be an alternative way of death induced by eupomatenoid-5. In addition to apoptosis and necrosis, the presence of autophagocytic vacuoles, evidenced by MDC labeling, suggest autophagocytic death. All these cell death pathways are well described for trypanosomatids and have a significant mitochondrial participation [23,38,39]. Classical features of how these parasites' mitochondria are involved in apoptosis, necrosis and autophagy include loss of membrane potential and increase of ROS formation [40-42]. Accumulating evidences show that the key event in the transition of the signaling pathway of apoptosis to necrosis or autophagy involves the excessive increase of mitochondrial ROS formation [36,40].

In conclusion, the data presented here provide further insight into the mechanisms of action underlying eupomatenoid-5. Additionally, our data strongly suggest eupomatenoid-5 as an effective compound to treat Chagas' disease with a remarkable trypanocidal action in the main three forms of *T. cruzi*, including trypomastigotes and amastigotes, the relevant forms for mammalian infection. Amastigotes are the reproductive forms in the vertebrate host involved in the chronic phase of Chagas' disease, thus eupomatenoid-5 might represent an effective compound for further *in vivo* analysis. We could not forget to highlight that all of our data point to trypomastigotes as the most sensitive form to the eupomatenoid-5 action. Trypomastigotes are the only non-replicative form of *T. cruzi* life cycle. The metacyclogenesis, a process by which *T. cruzi* different forms are transformed from non-infectious, replicative into infectious, non-proliferative, remains unclear. The literature only provided information regarding changes in the pattern of gene expression [43,44]. Therefore, our hypothesis is that eupomatenoid-5 might be taking advantage of this process thus triggering a more efficient action in trypomastigote forms of *T. cruzi*. Actually, drug resistance is well characterized between the different strains of *T. cruzi* because this parasite is

a heterogeneous group with morphological, physiological, biochemical and clinical diversity [45].

### **Acknowledgments**

This work was supported through grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, PRONEX/Fundação Araucária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá and Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa COMCAP – UEM.

### **Conflict of Interest**

The authors have no conflicts of interest.

### **References**

- [1] Andreollo, N. A.; Malafaia, O. Os 100 anos da doença de Chagas no Brasil. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* **22**:189-191; 2009.
- [2] World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 1-172: 2010.
- [3] Caballero, A. P.; Marín, C.; Rodríguez-Diéguez, A.; Ramírez-Macías, I.; Barea, E.; Sánchez-Moreno, M.; Salas, J. M. *In vitro* and *in vivo* antiparasital activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7(4H)-one-based complexes. *J. Inorg. Biochem.* **105**:770-776; 2011.
- [4] Chagas, C. Nova tripanossomíase 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.* **1**:159-218; 1909.

- [5] Brener, Z. Presents status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. *Pharm. Therap.* **7**:71-90; 1979.
- [6] Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Veiga Júnior, V. F.; Nakamura, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plants compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.* **28**:809-823; 2011.
- [7] Veiga-Santos, P.; Pelizzaro-Rocha, K. J.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Silva, S. O.; Sudatti, D. B.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V. *In vitro* anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology.* **137**:1661-1670; 2010.
- [8] Menna-Barreto, R. F. S.; Laranja, G. A. T.; Silva, M. C. C.; Coelho, M. G. P.; Paes, M. C.; Oliveira, M. M.; Castro, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seeds oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol. Res.* **103**:111-117; 2008.
- [9] Kollien, A.; Schaub, G. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today* **16**:381-387; 2000.
- [10] Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol.* **146**:601-620; 2007.
- [11] Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.* **10**:2126-2130; 2006.
- [12] Luize, P. S.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Morgado-Diaz, J. A.; De Souza, W.; Nakamura, C. V. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoide-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **100**:31-37; 2006.

- [13] Pelizzaro-Rocha, K. J.; Veiga-Santos, P.; Lazarin-Bidóia, D.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Ximenes, V. F.; Silva, S. O.; Nakamura, C. V. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* **13**:1018-1024; 2011.
- [14] Chauret, D. C.; Bernad, C. B.; Arnason, J. T.; Durst, T. Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*. *J. Nat. Prod.* **59**:152-155; 1996.
- [15] Camargo, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **6**:93-100; 1964.
- [16] Pompella, A.; Maellaro, E.; Casini, A. F.; Ferrali, M.; Ciccoli, L.; Comporti, M. Measurement of lipid peroxidation *in vivo*: a comparison of different procedures. *Lipids.* **22**:206-211; 1987.
- [17] Munafo, D. B.; Colombo, M. I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.* **114**:3619-3629; 2001.
- [18] Blommaert, E. F.; Krause, U.; Schellens, J. P.; Vreeling-Sindelárová, H.; Meijer, A. J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **243**:240-246; 1997.
- [19] Menna-Barreto, R. F. S.; Gonçalves, R. S. L.; Costa, E. M.; Silva, R. S. F.; Pinto, A. V.; Oliveira, M. F.; Castro, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:644-653; 2009.
- [20] Ba, X.; Gupta, D.; Davidson M.; Garg, N. J. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species – PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **285**:11596-11606; 2010.
- [21] Lima, E. S.; Abdalla, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cien. Farm.* **37**:293-303; 2001.

- [22] Kosec, G.; Alvarez, V. E.; Agüero, F.; Sánchez, D.; Dolinar, M.; Turk, B.; Turk, V.; Cazzulo, J. J. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**:18-28; 2006.
- [23] Jimenez, V.; Paredes, R.; Sosa, M. A.; Galanti, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *J. Cell. Biochem.* **105**:688–698; 2008.
- [24] Biederbick, A.; Kern, H. F.; Elsasser, H. P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell. Biol.* **66**:3-14; 1995.
- [25] Valdez, R. H., Tonin, L. T. D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Díaz, J. A. M., Sarragiotto, M. H., Nakamura, C. V. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **110**:7-14; 2009.
- [26] Gonçalves, R. L. S.; Menna-Barreto, R. F. S.; Polycarpo, C. R.; Gadelha, F. R.; Castro, S. L.; Oliveira, M. F. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **43**:651-661; 2011.
- [27] Fernandes, M. P.; Inada, N. M.; Chiaratti, M. R.; Araújo, F. F. B.; Meirelles, F. V.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Alves, M. J. M.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr.* **42**:69-78; 2010.
- [28] Irigoien, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, S. R.; Flohe, L.; Radi, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:733-742; 2008.
- [29] Giulivi, C.; Turrens, J. F.; Boveris, A. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**:243-252; 1988.



- [30] Li, Z.; Fennie, M. W.; Ganem, B.; Hancock, M. T.; Kobaslija, M.; Rattendi, D.; Bacchi, C. J.; O'Sullivan, M. C. Polyamines with *N*-(3-Phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**:251-254; 2001.
- [31] Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**:1-13; 2009.
- [32] Kowaltowski, A. J.; Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:333-343; 2009.
- [33] Smirlis, D.; Duszenko, M.; Jiménez-Ruiz, A.; Scoulica, E.; Bastien, P.; Fasel, N.; Soteriadou, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit. Vectors.* **3**:1-15; 2010.
- [34] Fonseca-Silva, F.; Inacio, J. D. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Almeida-Amaral, E. E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE.* **6**:1-7; 2011.
- [35] Rhoads, D. M.; Umbach, A. L.; Subbaiah, C. C.; Siedow, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant. Physiol.* **141**:357-366; 2006.
- [36] Gupta, S.; Bhatia, V.; Wen, J. J.; Wu, Y.; Huang, M. H.; Garg, N. J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:1414-1421; 2009.
- [37] Zoro, D. B.; Filburn, C. R.; Klotz, L. O.; Zweier, J. L.; Sollott, S. J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* **192**:1001-1014; 2000.

- [38] Menna-Barreto, R. F. S.; Salomão, K.; Dantas, A. P.; Santa-Rita, R. M.; Soares, M. J.; Barbosa, H. S.; Castro, S. L. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. **40**:157-168; 2009.
- [39] Kiel, J. A. K. W. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **365**:819–830; 2010.
- [40] Addabbo, F.; Montagnani, M.; Goligorsky, M. S. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension*. **53**:885–892; 2009.
- [41] Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Green, D. R.; Hengartner, M.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M. E.; Tschopp, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhivotovsky, B.; Melino, G. Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. **16**:3-11; 2009.
- [42] Souza, E. M.; Nefertiti, A. S. G.; Bailly, C.; Lansiaux, A.; Soeiro, M. N. C. Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells *in vitro*. *Cell Tissue Res*. **341**:173-180; 2010.
- [43] Krieger, M. A.; Ávila, A. R.; Ogatta, S. F. Y.; Plazanet-Menut, C.; Goldenberg, S. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **94**:165-168, 1999.
- [44] Cardoso, J.; Lima, C. P.; Leal, T.; Gradia, D. F.; Fragoso, S. P.; Goldenberg, S.; Sá, R. G.; Krieger, M. A. Analysis of proteasomal proteolysis during the *in vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi*. *PloS One*. **6**:e21027, 2011.
- [45] Camandaroba, E. L. P.; Reis, E. A. G.; Gonçalves, M. S.; Reis, M. G.; Andrade, S. G. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. **36**:201-209, 2003.

## Legends for Figures

**Figure 1.** Chemical structure of eupomatenoid-5, the neolignan isolated from *Piper regnellii* var. *pallescens*.

**Figure 2.** Flow cytometry analysis of parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for 3 h and stained with Rh 123. (A) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (B) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (C) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . Arrows correspond to concentrations tested. Control group (untreated cells) is also shown. Typical histograms of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant difference relative to the control group ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 3.** Flow cytometry analysis of parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for 3 h and stained with PI. (A) Untreated epimastigotes. (B, C, D) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (E) Untreated trypomastigotes. (F, G, H) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (I) Untreated amastigotes. (J, K, L) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . The numbers shows the percentage of PI-stained positive cells in upper right and left quadrant. Typical histograms of at least three independent experiments.

**Figure 4.** Mitochondrial  $\text{O}_2^{\bullet-}$  production in parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for up to 3 h. Mitochondrial  $\text{O}_2^{\bullet-}$  production was evaluated using the fluorescence probe MitoSOX. At the indicated times parasites were used to fluorimetrically measure oxMitoSOX. (A) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (B) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (C) Amastigotes treated with 34.0,

68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . Results are expressed as mean fluorescence (in arbitrary units)  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group (untreated cells) ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 5.** Determination of lipid peroxidation in parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for 3 h. The MDA concentration was measured by TBARS production. (A) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (B) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (C) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant difference relative to the control group (untreated cells) ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 6.** DNA fragmentation in parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5. (A-W) Differential interference contrast (DIC). (a-w) Fluorescence to the assay of TUNEL and PI. (A, a, B, b) Untreated epimastigotes. (C, c, E, e, G, g) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (D, d, F, f, H, h) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  and counterstaining with PI. (I, i, J, j) Untreated trypomastigotes. (K, k, M, m, O, o) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (L, l, N, n, P, p) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  and counterstaining with PI. (Q, q, R, r) Untreated amastigotes. (S, s, U, u, X, x) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (T, t, V, v, W, w) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  and counterstaining with PI. Green fluorescence indicates DNA fragmentation and red fluorescence indicates condensation and margination of chromatin. The images are representative of epimastigotes treated for 96 h and trypomastigotes and amastigotes treated for 24 h. Bars: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 7.** Flow cytometry analysis of parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for 3 h. (A) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (B) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (C) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . Forward light scatter (FSC-H) was considered as function of cell size. Arrows correspond to concentrations tested. Control group (untreated cells) is also shown. Typical histograms of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant difference relative to the control group ( $p \leq 0,05$ ).

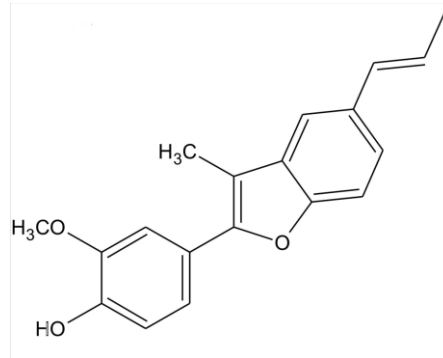
**Figure 8.** Evaluation of autophagic vacuoles in parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5. (A-W) DIC. (a-w) Fluorescence. (A, a, B, b) Untreated epimastigotes. (C, c, E, e, G, g) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (D, d, F, f, H, h) Epimastigotes treated with 23.8, 51.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$  WTM. (I, i, J, j) Untreated trypomastigotes. (K, k, M, m, O, o) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (L, l, N, n, P, p) Trypomastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$  WTM. (Q, q, R, r) Untreated amastigotes. (S, s, U, u, X, x) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$ . (T, t, V, v, W, w) Amastigotes treated with 34.0, 68.0 and 170.0  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$  WTM. The images are representative of epimastigotes treated for 96 h and trypomastigotes and amastigotes treated for 24 h. Bars: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 9.** Mechanistic assumptions about the trypanocidal action of eupomatenoid-5. Eupomatenoid-5 induces mitochondrial depolarization (loss of  $\Delta\Psi\text{m}$ ) followed by an increase of ROS production through the electron transport chain. This would induce oxidative damage leading to parasite death.

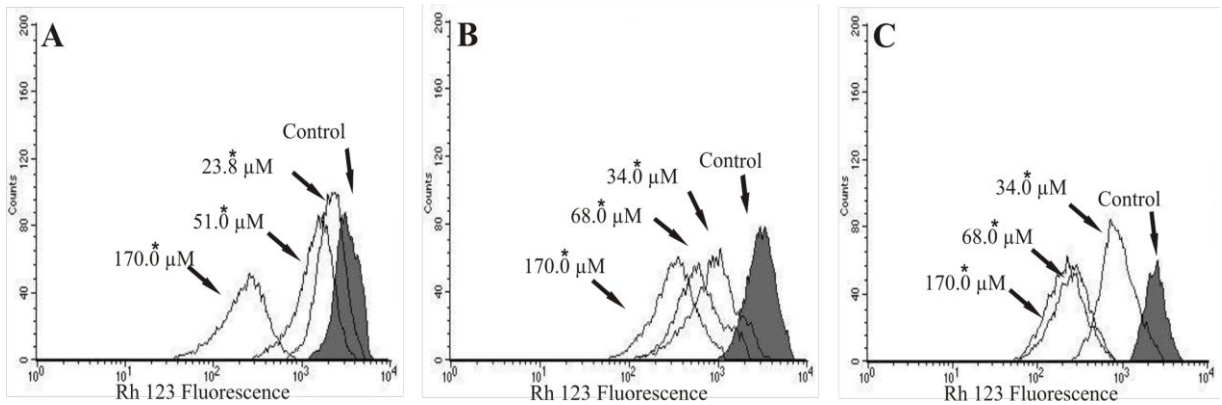
## Highlights

- Eupomatenoid-5 has trypanocidal activity in three parasitic forms of *T. cruzi*.
- Eupomatenoid-5 causes loss of  $\Delta\Psi_m$  in *T. cruzi* and an increase of ROS production.
- Eupomatenoid-5 induces an oxidative imbalance in *T. cruzi* followed by cell death.

**Figure 1**



**Figure 2**



**Table 1**

**Table 1** - Flow cytometry analysis of parasitic forms of *Trypanosoma cruzi* treated with eupomatenoid-5 for 3 h and stained with Rh 123.

Epimastigotes			Trypomastigotes			Amastigotes		
μM	Median	IV <sup>a</sup>	μM	Median	IV <sup>a</sup>	μM	Median	IV <sup>a</sup>
Control	3078.09	0.0	Control	2942.73	0.0	Control	2308.24	0.0
23.8	2072.08*	-0.3	34.0	89.65*	-0.6	34.0	820.47*	-0.6
51.0	1420.18*	-0.5	68.0	77.72*	-0.8	68.0	248.05*	-0.8
170.0	226.71*	-0.9	170.0	21.97*	-0.9	170.0	207.21*	-0.9

IV<sup>a</sup> =  $(M_T - M_C)/M_C$ , where  $M_T$  corresponds to the median of the fluorescence for treated parasites and  $M_C$  to that for control parasites.

**Figure 3**

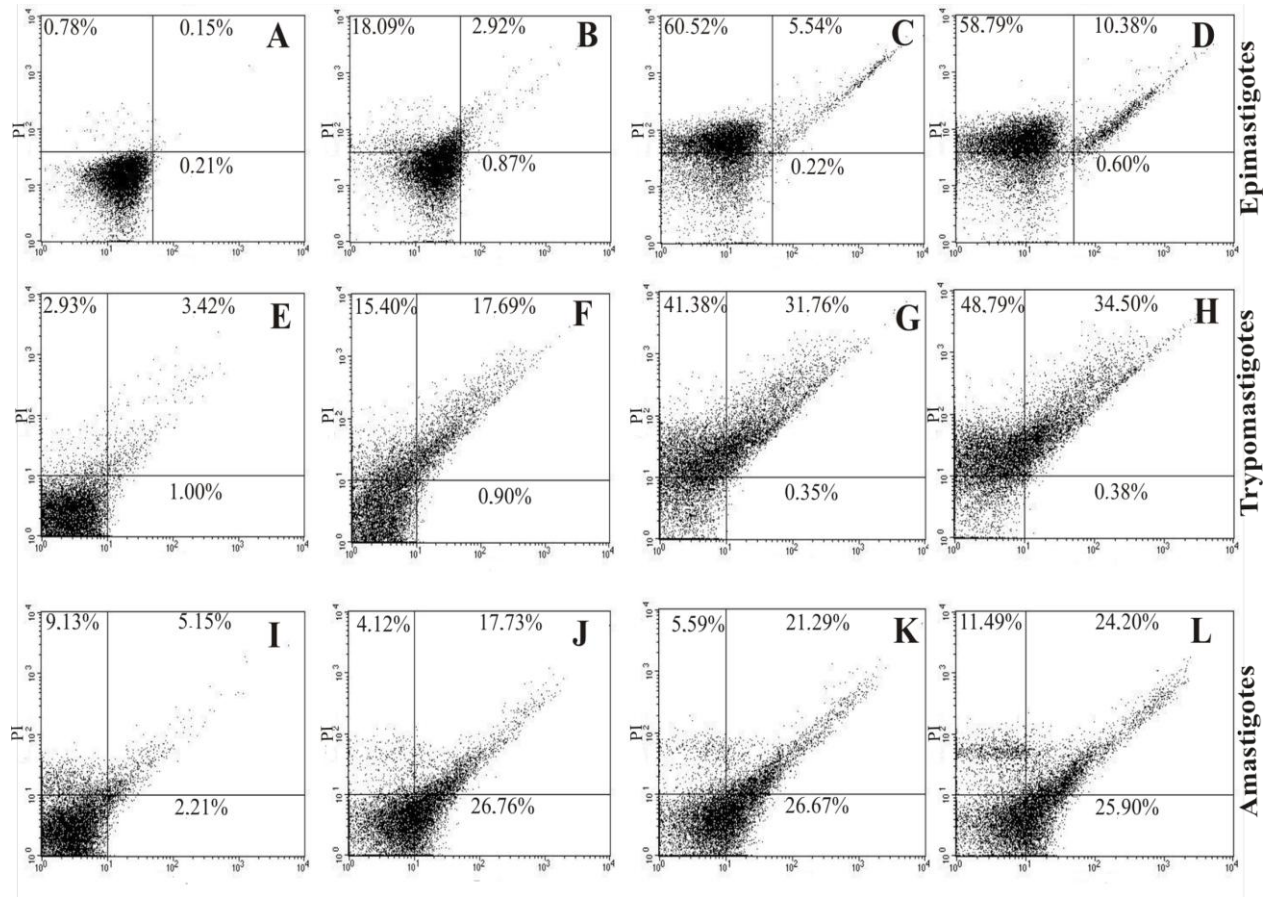
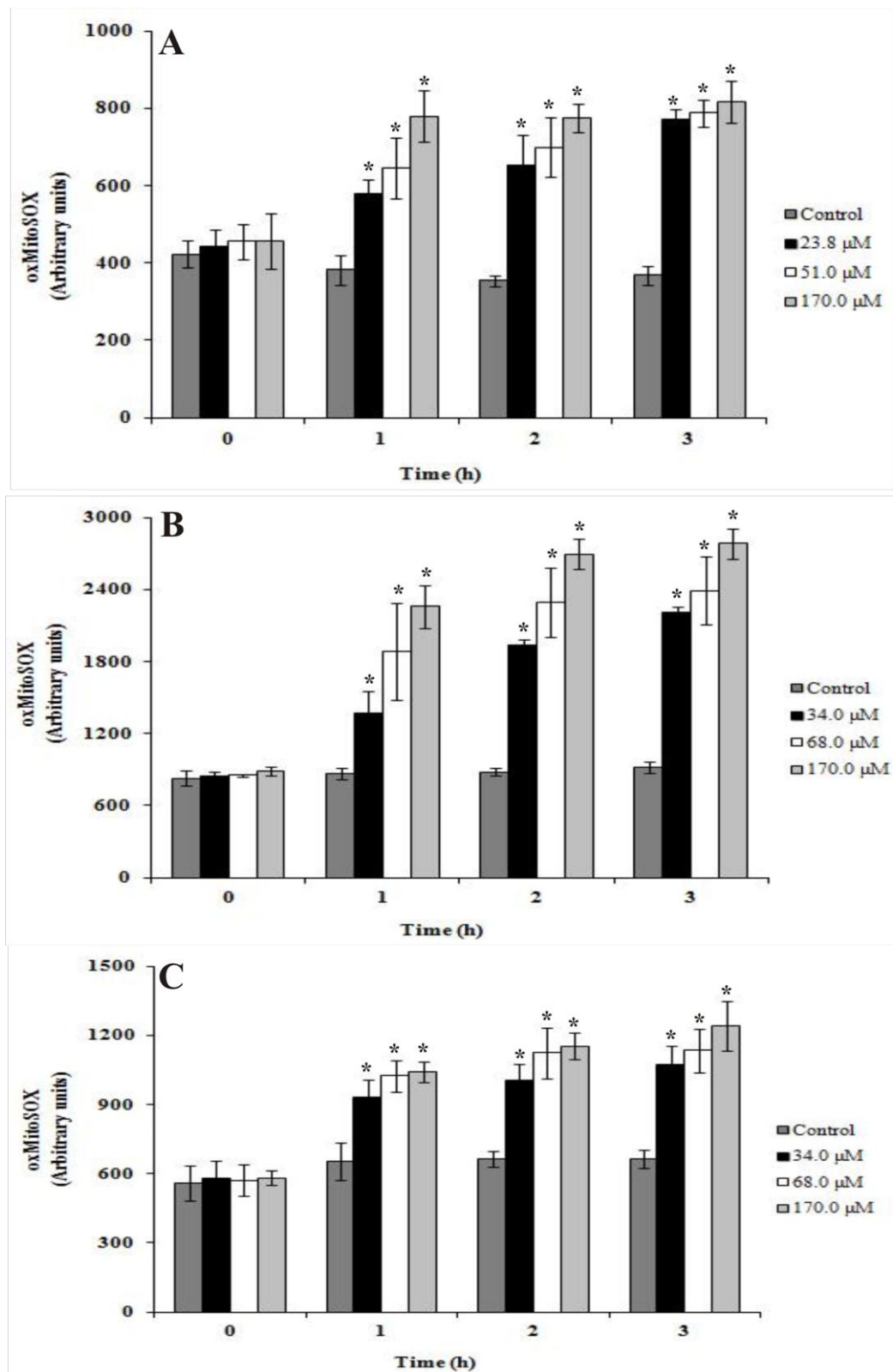




Figure 4



**Figure 5**

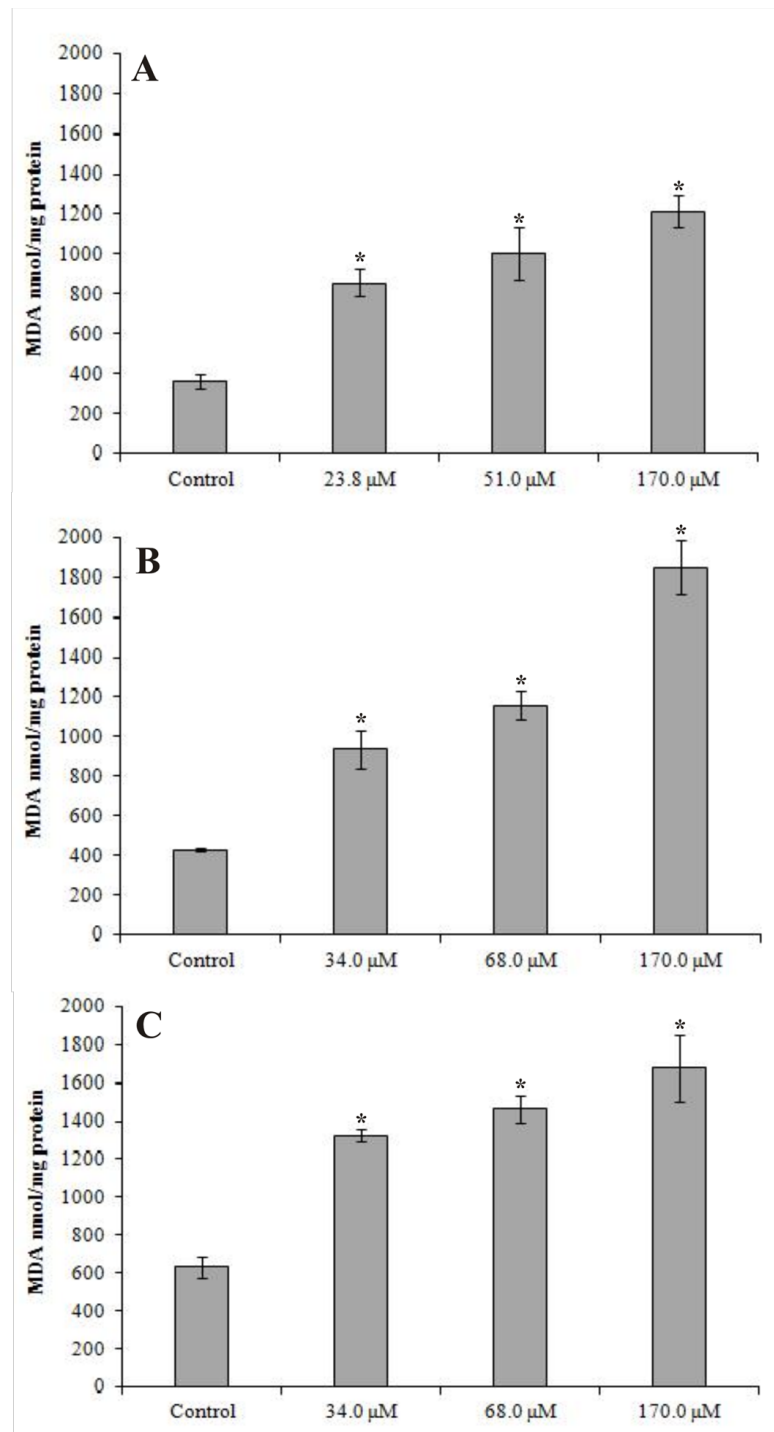
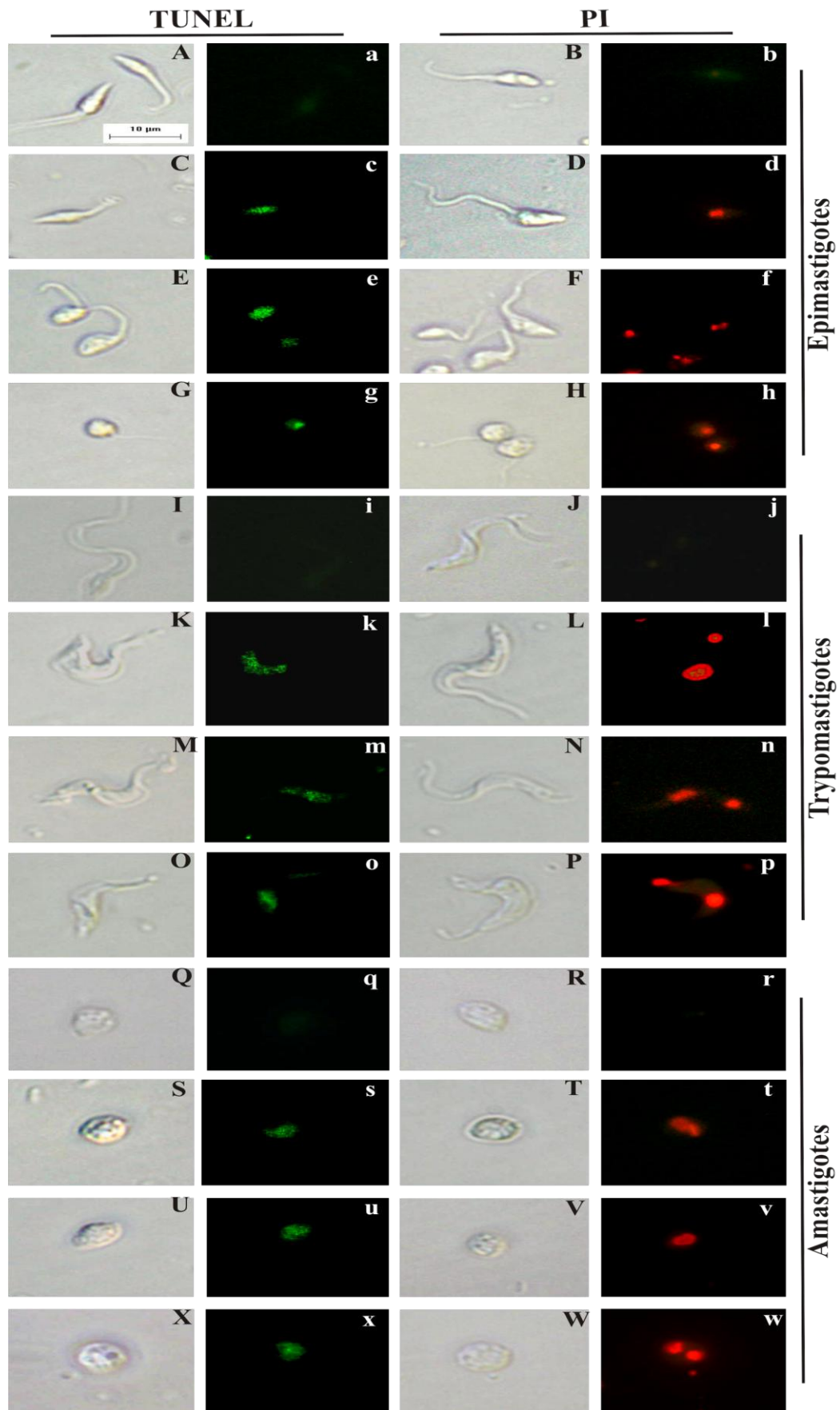


Figure 6



**Figure 7**

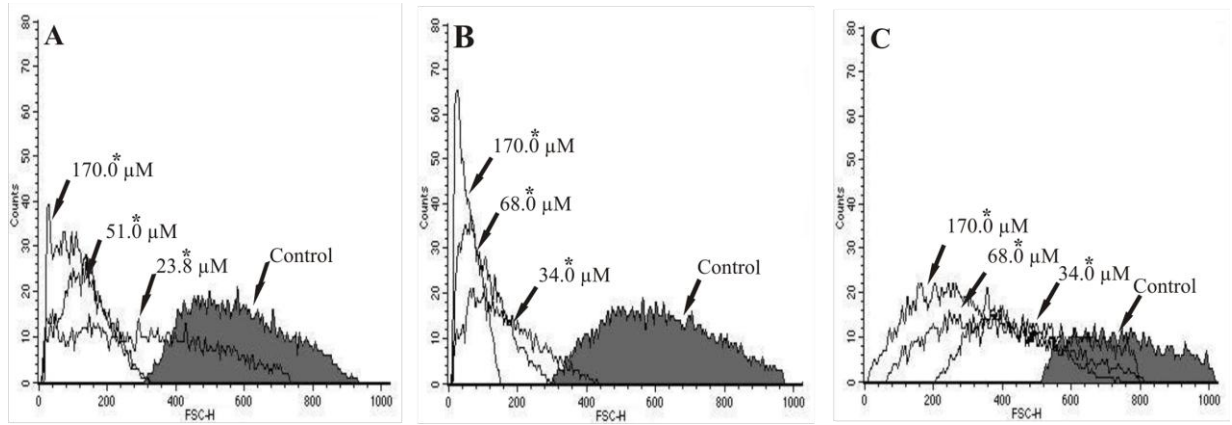


Figure 8

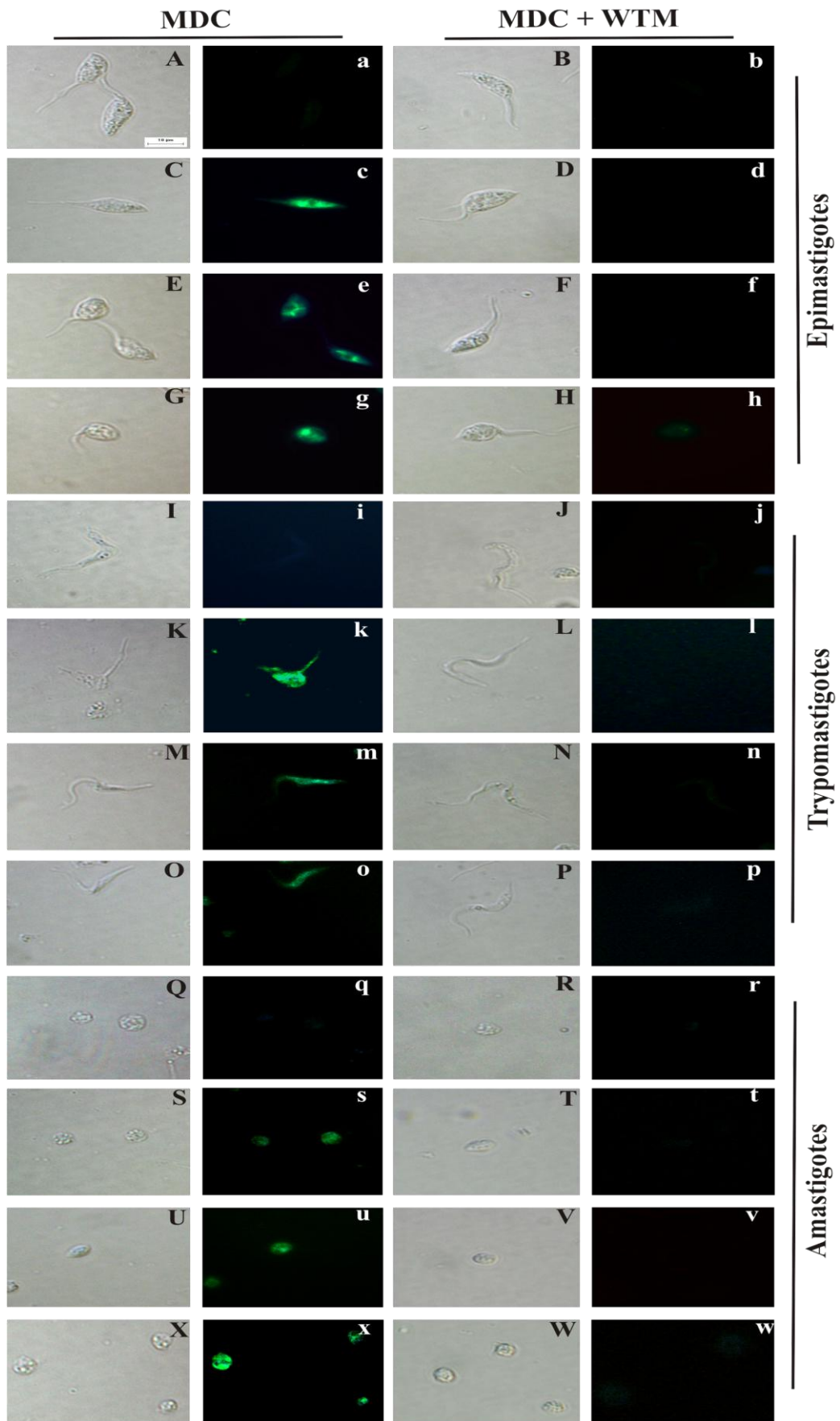
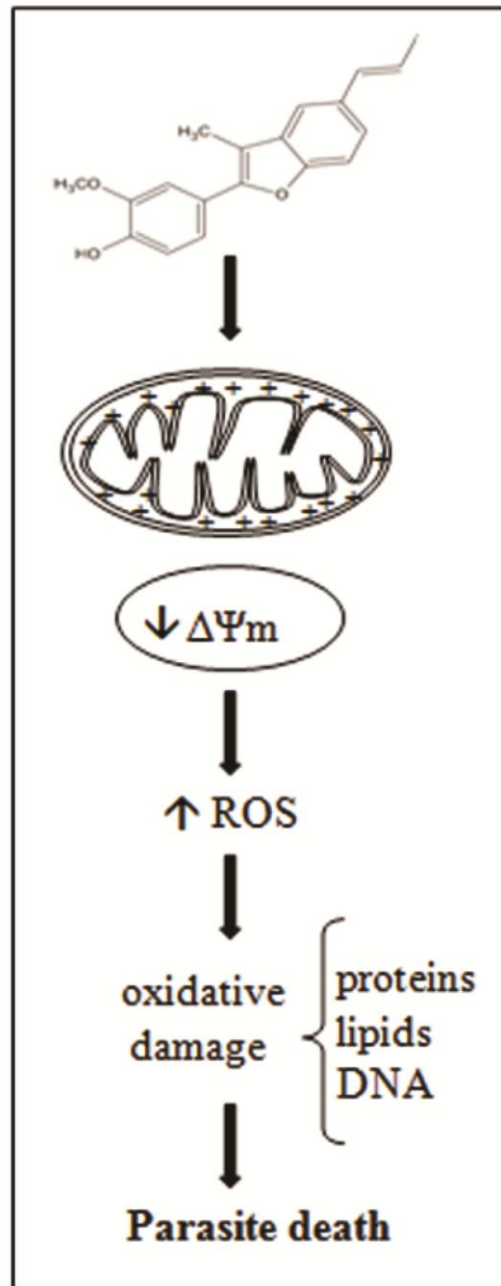


Figure 9



### 3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem propor um mecanismo onde a ação tripanocida do eupomatenóide-5 está intimamente relacionada à disfunção mitocondrial seguido do aumento da produção de EROs mitocondriais. Como consequência ocorreria reações de oxidação em macromoléculas essenciais para a viabilidade celular desencadeando a morte do parasito por caminhos distintos. Neste contexto a mitocôndria parece ser o alvo inicial do eupomatenóide-5. De fato a mitocôndria é um alvo bastante explorado para o desenvolvimento de novas drogas tripanocidas, visto ser única em *T. cruzi*.

De acordo com a fragmentação do DNA e diminuição do volume celular, apoptose é um caminho de morte envolvida na ação tripanocida do eupomatenóide-5. Com base na ruptura da membrana do plasma, necrose também poderia ser uma forma alternativa de morte induzida pelo eupomatenóide-5. Em adição à apoptose e necrose, a presença de vacúolos autofágicos, comprovados pela marcação com MDC, também sugerem a morte por autofagia.

Nesse contexto, nossos resultados sugerem que eupomatenóide-5 é um composto eficaz para o tratamento da doença de Chagas com uma notável ação tripanocida em todas as formas de *T. cruzi*.