



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



VÂNIA CRISTINA DESOTI

**MECANISMOS DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ELATOL EM
TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

MARINGÁ

2012

VÂNIA CRISTINA DESOTI

**MECANISMOS DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ELATOL EM
TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager.

MARINGÁ
2012

VÂNIA CRISTINA DESOTI

**MECANISMOS DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ELATOL EM
TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ana Campa
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho e tornou tudo possível.

A minha orientadora e amiga Prof^ª. Dr^ª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, pela oportunidade, dedicação, confiança e apoio em todos os momentos, por ter participado do meu crescimento científico e pessoal. Seus conselhos me foram de grande valia.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pelo acolhimento e inestimável colaboração, sendo um exemplo de dedicação.

A Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Shioji Tiuman, pela amizade, confiança e incentivo, me acompanhando desde a graduação.

A Prof^ª. Dr^ª. Tânia Ueda Nakamura e Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, que contribuíram para minha formação e que, indubitavelmente, são exemplos de pesquisadores a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Renato Pereira Crespo e a Dr^ª. Daniela Bueno Sudatti, da Universidade Federal Fluminense, pelo isolamento do elatol e correções.

Ao Prof. Dr. Antonio Alonso, da Universidade Federal de Goiás, pela atenção e ajuda com os experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

A Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marques de Araújo e Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo, por estarem sempre prontos a ajudar.

A Prof^ª. Dr^ª. Emy Luiza Ishii Iwamoto, pelos ensinamentos valiosos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuírem em minha formação profissional.

A secretária Helena, pela atenção, carinho e dedicação.

A Danielle, Nathielle, Erika e Jaqueline, pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar. Compartilhamos ótimos momentos dividindo experiências mútuas.

Aos companheiros de laboratório Karin, Adriana, Jean, Marco, Solange, Elizandra, Angelo, Andréa, Cleyton, Eliana, Gislaine, Jesieli, Ligia, Patrícia, Phercyles, Raíssa, Rodrigo, Samara, Mirian, Talitha, Juliana, Gean, Viviane, Phercyles, Jéssica e Renata, pelo convívio, auxílio e amizade.

Ao meu amor Adriano, que sempre esteve ao meu lado, incentivando, acreditando e batalhando comigo para conclusão de mais uma importante etapa da minha vida.

Em especial, aos meus pais Guerino e Teresinha e meu irmão André, por tudo que fizeram e ainda tem feito por mim. Amo muito vocês!

A CAPES, CNPq, FINEP e PRONEX/Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos que estiveram do meu lado durante essa caminhada.

Obrigada!

“Quanto mais as pessoas acreditam em uma coisa, quanto mais se dedicam a ela, mais podem influenciar no seu acontecimento.”

DOV ÉDEN

RESUMO

A Doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta milhões de pessoas na América Latina. As drogas disponíveis para o tratamento desta infecção causam sérios efeitos colaterais e tem eficácia variável especialmente na fase crônica da doença. Neste contexto, produtos naturais têm mostrado bom potencial para a descoberta de novos quimioterápicos para o tratamento desta infecção. Recentemente, nosso grupo relatou a atividade do elatol, extraído da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, presente no litoral brasileiro, sob *T. cruzi*. Esta atividade tripanocida pode ser resultado de alterações morfológicas e ultra-estruturais reveladas por microscopia eletrônica. Assim, a proposta do presente trabalho foi estudar os possíveis mecanismos de ação e vias de morte celular envolvidas na atividade tripanocida do elatol. Nossos resultados mostraram que o tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* com elatol induziu alteração no potencial de membrana mitocondrial, alteração na integridade da membrana celular, aumento da formação de ânion superóxido mitocondrial, lipoperoxidação, fragmentação de DNA, diminuição do volume celular e formação de vacúolos autofágicos. Estes resultados sugerem que a ação tripanocida do elatol envolve múltiplos eventos que culminam com a morte de *T. cruzi*. Nossa hipótese é que a alteração mitocondrial seria um evento crucial que determinaria caminhos bioquímicos distintos induzindo tipos diferentes de morte celular.

Palavras-chave: Elatol, *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotas e morte celular.

ABSTRACT

Chagas' disease is an illness caused by *Trypanosoma cruzi* parasite, which affects millions of people on Latin America. The available drugs for treatment of this infection cause serious side effects and has variable efficacy especially in the chronic phase of the disease. In this context, natural products have shown good potential for the discovery of new chemotherapy for the treatment of this infection. Recently our group reported the activity of elatol, extracted from red macroalgae *Laurencia dendroidea*, present in brazilian coast, on *T. cruzi*. This trypanocidal activity might be a result of morphological and ultrastructural alterations revealed by electronic microscopy. Thus, the proposal of this work was to study the possible mechanisms of action and cell death pathways involved in the trypanocidal activity of elatol. Our results showed that treatment of trypomastigotes of *T. cruzi* with elatol induced changes in mitochondrial membrane potential, changes in cell membrane integrity, increase in the 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 elatol involves multiple events that culminate in the death of *T. cruzi*. Our hypothesis is that the mitochondrial changes would be a crucial event that determines distinct biochemical pathways by inducing different types of cell death.

Keywords: Elatol, *Trypanosoma cruzi*, trypomastigotes and cell death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *Laurencia dendroidea*..... 20
- Figura 2.** Possíveis mecanismos da atividade tripanocida do elatol. Indução de tipos diferentes de morte celular a partir da disfunção mitocondrial..... 63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Aspectos Gerais da Doença de Chagas.....	12
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	13
1.3. Drogas Utilizadas no Controle da Doença de Chagas	15
1.4. Alvos Potenciais da Atividade Tripanocida de Compostos.....	16
1.5. Tipos de Morte Celular	17
1.6. Gênero <i>Laurencia</i> e o Elatol.....	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. REFERÊNCIAS	22
ANEXO	30
ANEXO I	31
Trypanocidal action of elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction	31
4. CONCLUSÕES	63

1. INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, doença que constitui ainda hoje no Brasil, e entre outros países da América Latina, um problema médico e social grave. Acomete cronicamente cerca de 10 milhões de pessoas e são estimadas mais de 10 mil mortes por ano (WHO, 2010). No Brasil, estima-se que existam em torno de 2 milhões de indivíduos portadores da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010).

O tratamento da doença de Chagas ainda é um desafio. Apesar dos esforços investigativos nenhuma droga tornou-se disponível para o tratamento da doença, desde o final de 1960 e início de 1970, quando foram introduzidos dois fármacos no mercado, o nifurtimox (Lampiti[®]/Bayer) e o benzonidazol (Rochagan[®]/Roche) (COURA; CASTRO, 2002; CENCIG et al., 2011). Ambas as drogas são altamente tóxicas ao hospedeiro (COURA, 2009) e possuem atividade limitada, conforme a susceptibilidade de diferentes cepas de *T. cruzi* (VELOSO et al., 2001). Dessa forma, novas drogas, menos tóxicas e mais efetivas, são urgentemente necessárias para o tratamento da doença de Chagas.

Nos últimos anos, o uso de produtos naturais tem crescido em todo o mundo, inclusive no Brasil (CALIXTO, 2000). Recentemente foi demonstrada a atividade do elatol, um sesquiterpeno halogenado isolado da alga *Laurencia dendroidea*, contra *T. cruzi*. Este composto provocou alterações morfológicas e ultraestruturais importantes nas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (VEIGA-SANTOS et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) (VEIGA-SANTOS et al., 2010) a mitocôndria pode ser um alvo potencial para ação do elatol. De fato, a mitocôndria dos tripanossomatídeos apresenta estrutura e função característica, o que a difere das mitocôndrias dos mamíferos. Desta forma, esta organela tem sido apontada como um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas tripanocidas (MENNA-BARRETO et al., 2009a).

Com base no exposto, propusemos estudar possíveis mecanismos de ação e vias de morte celular envolvidas na atividade tripanocida do elatol sobre o *T. cruzi*. Considerando que a atividade do elatol envolve alterações morfológicas e mitocondriais, avaliamos algumas funções bioquímicas, principalmente as associadas com o desenvolvimento de estresse oxidativo nas tripomastigotas.

Os tópicos desta introdução detalham temas que subsidiam a compreensão do nosso trabalho.

1.1 Aspectos Gerais da Doença de Chagas

A doença de Chagas (tripanosomíase americana ou esquizotripanose) foi descrita pela primeira vez pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909, e tem por agente etiológico o *T. cruzi* (CHAGAS, 1909). Em sua descoberta, Chagas estabeleceu aspectos da biologia do parasito e epidemiologia da doença, descreveu a patologia e seu diagnóstico, e identificou reservatórios domésticos e silvestres.

A infecção chagásica, inicialmente uma parasitose enzoótica silvestre, foi transformada em uma antropozoonose, com a ocupação do homem durante o desmatamento, agricultura e pecuária. Nos últimos 200-300 anos, triatomíneos, que não puderam se alimentar, devido ao deslocamento de animais silvestres, começaram a colonizar áreas em torno e dentro de casas. Eles se adaptaram a este nicho, a alimentação de sangue de animais domésticos e humano, como uma zoonose (COURA, 2007).

Após isso, a doença estendeu-se por toda a América Latina (RODRÍGUEZ et al., 2009), e além de ser um problema médico e social grave, acomete milhões de pessoas (WHO, 2010; URBINA, 2010), sendo registradas de 50.000 a 200.000 novas infecções a cada ano (TARLETON et al., 2007). Nos últimos anos, diversos casos têm sido registrados no Brasil, com destaque na região amazônica (DIAS; PRATA; SCHOFIELD, 2002). Essa região tem registrado muitos casos da forma aguda da doença de Chagas, caracterizando essa doença como emergente nessa região (VALENTE et al., 2009).

Assim, a doença de Chagas é considerada um problema de saúde pública, encontrada em regiões rurais ou comunidades isoladas, de baixa escolaridade, com pouco ou nenhum acesso a serviços de saúde e saneamento básico. É considerada a segunda enfermidade (após a malária) associada a vetor, em prevalência e mortalidade. Fatores econômicos, sociais e políticos têm aumentado a migração de pessoas de países endêmicos para países não-endêmicos, onde estão sendo detectados casos de infecção humana, através de transfusões de sangue, transplantes de órgãos infectados e infecção congênita (SCHMUNIS, 2007a; MONCAYO; SILVEIRA, 2009), transformando a doença de Chagas de um problema rural da América Latina para um problema global (SCHMUNIS, 2007b).

1.2 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *T. cruzi* é um protozoário do filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Onde, o cinetoplasto é uma organela especializada, onde se concentra o DNA mitocondrial do parasito. Apresenta três formas evolutivas morfológicamente distintas pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e inserção do flagelo: tripomastigota, amastigota e epimastigota (BRENER, 1992).

O ciclo de vida de *T. cruzi* alterna entre mamíferos e insetos vetores, apresentando diferentes formas evolutivas: (i) epimastigota, forma responsável pela manutenção da infecção no inseto vetor; (ii) tripomastigota, forma infectante presente no sangue circulante do mamífero e nas fezes e/ou urina do inseto vetor; e (iii) amastigota, forma infectante de replicação intracelular, encontrada nos tecidos do mamífero. Resumidamente, no ciclo biológico as tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor se diferenciam em epimastigotas proliferativos, que por sua vez, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior do inseto. Durante o repasto sanguíneo as tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e/ou urina do inseto vetor. Através de solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra, as tripomastigotas metacíclicas invadem vários tipos de células e transformam-se em amastigotas, que se reproduzem por divisão binária, em seguida, sofrem novo processo de diferenciação em tripomastigotas, responsáveis pela disseminação da infecção (COURA; CASTRO, 2002; SILVA JÚNIOR et al., 2008).

Atualmente existem 140 espécies de triatomíneos descritos (PATTERSON; BARBOSA; FELICIANGELI, 2009; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009). Estes pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo que algumas espécies têm especial importância epidemiológica e são consideradas espécies primárias: *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. braziliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. As espécies *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *T. rubrovaria* e *T. vitticeps* são consideradas espécies secundárias (SILVEIRA, 1983). Possuem hábito noturno e são hematófagos, desde a primeira fase da vida até adultos, o que estabelece o estreito relacionamento desses insetos com animais, principalmente aves e mamíferos.

A maior parte dos casos de infecção humana, ou de outros vertebrados é causada pela via vetorial (PRATA, 2001; GODOY; MEIRA, 2007). Além da transmissão vetorial, podemos citar outros tipos de transmissão, como congênita (GÜRTLER; SEGURA; COHEN, 2003; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011; CARLIER et al., 2011), transfusão sanguínea, transmissão oral por ingestão de alimentos contaminados, transplantes de órgãos infectados e

acidentes laboratoriais (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000; DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011).

Com relação à transmissão vetorial, em 2006, o Brasil recebeu o certificado pela Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (Opas/OMS) de eliminação da transmissão pelo *T. infestans*, considerado o principal vetor.

Quanto à transmissão oral, em 2005, 25 pessoas foram infectadas oralmente ao consumirem caldo de cana infectado pelo *T. cruzi* em Navegantes, Santa Catarina. Pouco tempo depois foi relatada a infecção de 26 pessoas ao ingerirem suco de açaí contaminado em Igarapé da Fortaleza, Amapá (IANNI; MADY, 2005). Estes episódios têm sido frequentes, colocando a transmissão oral como a principal via de infecção na Amazônia Legal.

Além disso, a transmissão congênita pode afetar seriamente a sobrevivência do bebê, por conta dos efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis (GÜRTLER; SEGURA; COHEN, 2003; CARLIER et al., 2011).

Em relação às fases clínicas, a doença de Chagas pode ser dividida em aguda e crônica, sendo a crônica subdividida em indeterminada, cardíaca, digestiva e mista (cardíaca e digestiva) (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

O diagnóstico da fase aguda pode ser determinado em função do sinal de porta de entrada da infecção. A infecção chagásica se inicia através de um conjunto de manifestações, que pode ser variável em frequência e intensidade, porém, pode ser assintomática. Após a infecção, a mesma pode ser aparente, através do chagoma de inoculação, edema cutâneo que surge no local de entrada do parasito ou pelo sinal de Romaña, um edema bipalpebral unilateral, que ocorre com a entrada do parasito na conjuntiva ocular (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000). Outros sintomas nesta fase são febre, mal estar geral, dores abdominais, edema, insuficiência cardíaca, entre outros, que podem durar algumas semanas. Tais sintomas são decorrentes da multiplicação e disseminação do parasito, fase caracterizada também, pela maior parasitemia sanguínea (PRATA, 2001; MARCON et al., 2011).

A presença comprovada da doença, na ausência de alterações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo, compreende-se por forma indeterminada da doença de Chagas. Nestes casos ocorre baixo nível de parasitemia e alto teor de anticorpos. Após a fase aguda, aproximadamente 50% dos pacientes evoluem para a forma indeterminada, na qual, embora exista a infecção ativa, praticamente não há lesões e os órgãos e sistemas encontram-se preservados (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETO, 2000).

As manifestações da fase crônica ocorrem geralmente de 10 a 30 anos após a infecção (RIBEIRO et al., 2010). Tais sintomas provêm da presença de ninhos de amastigotas, que induzem a disfunção das células infectadas e causam reações inflamatórias, resultando em aumento de massa muscular e diminuição da função do órgão comprometido, podendo causar cardiopatia, danos no sistema nervoso e disfunção do sistema digestivo, que conduz ao megaesôfago e/ou megacólon (PRATA, 2001).

1.3 Drogas Utilizadas no Controle da Doença de Chagas

Apenas dois fármacos têm sido usados como as principais drogas antiparasitárias para a doença de Chagas, o benzonidazol e o nifurtimox (COURA, 2009; DE SOUZA et al., 2011). No Brasil, após a proibição do uso do nifurtimox nos anos 80, o benzonidazol, é o único fármaco com atividade tripanocida disponível no mercado (PEDROSA et al., 2001; COURA; CASTRO, 2002). Tais compostos podem encurtar a fase aguda e diminuir a mortalidade, porém, eles promovem a cura parasitológica em torno de 80% dos pacientes em fase aguda, e 20% na fase crônica da doença (COURA, 2009). A ação destes fármacos é afetada diretamente por algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, entre outros. Estes compostos podem causar toxicidade sistêmica (TONIN et al., 2010; IZUMI et al., 2011), onde os efeitos colaterais mais importantes são hipersensibilidade (febre, edema, linfadenopatia, exantema, dores musculares e nas articulações), depressão da medula óssea (púrpura trombocitopênica e neutropenia) e polineuropatia periférica. Estes efeitos secundários são dose-dependente (PRATA, 2001). Devido aos efeitos adversos, frequentemente o tratamento é abandonado (MENNA-BARRETO et al., 2009b). No entanto, o tratamento é recomendado para todos os casos agudos e congênitos da doença de Chagas, em infecções crônicas e em indivíduos com idade inferior a 18 anos (OLIVEIRA et al., 2008; SOSA-ESTANI; VIOTTI; SEGURA, 2009).

Contra a transmissão transfusional, a solução de cristal violeta foi utilizada como agente quimioprolático para esterilização do sangue nos Bancos de Sangue do Brasil (NUSSENZWEIG et al., 1953). No entanto, essa medida profilática apresenta restrições a sua utilização (THOMAS; MACPHEE, 1984), como por causar irritações nas mucosas, decréscimo do número de leucócitos, corar a pele dos pacientes transfundidos por algumas horas e apresentar potencial mutagênico e carcinogênico (DOCAMPO; MORENO, 1990).

Muitas substâncias de origem natural, sintética ou semi-sintética apresentam atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, mas estão longe de tornarem-se um fármaco (MAYA et al., 2007; LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010). Vários trabalhos têm relatado compostos com atividade tripanocida, exemplo disso pode ser encontrado em uma revisão recente, onde cerca de 136 compostos já foram testados na última década contra o *T. cruzi* (IZUMI et al., 2011).

1.4 Alvos Potenciais da Atividade Tripanocida de Compostos

Vias bioquímicas encontradas em tripanossomatídeos, mas ausentes em hospedeiros mamíferos tem sido consideradas como alvos de novos compostos (MAYA et al., 2007). Algumas vias de *T. cruzi* merecem destaque, como a síntese do ergosterol, o principal esterol presente nas membranas deste parasito, que é diferente do colesterol encontrado em mamíferos (MAYA et al., 2007; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009; URBINA, 2009; VAS et al., 2011).

Outros alvos direcionam-se às enzimas da via glicolítica, síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) (BARRETT et al., 2003) e sistema antioxidante, sendo que este último é um dos mais estudados na pesquisa de novas drogas (PIÑEYRO et al., 2008).

Enquanto em organismos eucariotos o sistema glutatona (GSH)/GR e tioredoxina (Trx)/TrxR mantém a homeostase redox intracelular, nos tripanossomatídeos o sistema tripanotiona é o responsável pela detoxificação de hidroperóxidos (TURRENS, 2004). Este sistema é fundamental para a sobrevivência deste parasito e ao mesmo tempo um alvo potencial para novas terapias (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Apesar de possuir defesas antioxidantes, o parasito tem se mostrado muito sensível à ação de radicais livres (TURRENS, 2004), sofrendo oxidações em macromoléculas essenciais como proteínas, lipídeos e DNA (BA et al., 2010).

T. cruzi apresenta apenas uma mitocôndria (CAMPOS et al., 2011), onde o mecanismo de obtenção de energia neste parasito é apontado como um dos alvos para o desenvolvimento de novas drogas tripanocidas (CARRANZA et al., 2009).

Além disso, o metabolismo das poliaminas, degradação protéica, acidocalcissomo, glicossomo, enzima transialidase, entre outros, também são considerados alvos potenciais de novos compostos (BARRETT et al., 2003).

1.5 Tipos de Morte celular

A apoptose, necrose e autofagia são tipos diferentes de morte celular (KROEMER et al., 2009). Dependendo de fatores que induzam alterações morfológicas, enzimáticas, funcionais ou imunológicas, um determinado tipo de morte celular pode predominar. No entanto, podem existir situações onde estímulos diversos induzam mais que um tipo de morte celular.

A morte apoptótica apresenta algumas peculiaridades como redução de volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, arredondamento celular e discreta ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas (KROEMER et al., 2009; DE SOUZA et al., 2010). Um conjunto de proteases conhecidas como caspases regulam a apoptose (KOSEC et al., 2006). As caspases são sintetizadas como precursores inativos e, diante de estímulos apoptóticos, sofrem ativação proteolítica. Algumas proteínas podem regular a ativação das caspases, uma série dessas proteínas tem localização ou interação mitocondrial. As mitocôndrias também possuem proteínas que inativam proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases. O citocromo c, geralmente encontrado no espaço intermembranas mitocondrial, quando liberado para o citosol, também participa do processo de apoptose. As mitocôndrias também possuem um conjunto de proteínas capazes de causar a condensação da cromatina nuclear e a fragmentação do DNA (RAVAGNAN; ROUMIER; KROEMER, 2002).

A necrose, uma outra forma de morte celular, durante muito tempo foi avaliada como um processo de morte acidental e descontrolado. Recentemente evidências têm mostrado que a execução de morte celular necrótica pode ser bem controlada e regulada (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006). Vários mediadores, organelas e processos celulares têm sido implicados na morte celular necrótica, que inclui dilatação de organelas citoplasmáticas (mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi), alterações nucleares e de membranas (KROEMER et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010), vacuolização citoplasmática (RODRIGUES; SEABRA; SOUZA, 2006), aumento na concentração de cálcio citosólico que resulta em sobrecarga mitocondrial e ativação de proteases não caspases (calpaínas e catepsinas). Tanto o cálcio como as espécies reativas de oxigênio (EROs) são causadores da propagação e execução da morte celular por necrose. Estes agentes podem atuar de forma direta ou indireta provocando vários danos as macromoléculas, culminado com ruptura de organelas e morte celular (ZONG; THOMPSON, 2006). Apesar do conhecimento dessas alterações, a caracterização de morte celular por

necrose é avaliada principalmente por permeabilização de membrana plasmática precoce (FERNANDES et al., 2010; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010).

Além desses processos, as células eucarióticas podem degradar seus próprios componentes, como proteínas citosólicas e organelas, usando hidrolases contidas em seus lisossomos. Esse processo de reciclagem é denominado autofagia, que facilita a remodelação metabólica em resposta a vários estímulos, como ambientais. Neste contexto, diferentes vias autofágicas ocorrem nas células, à forma mais comum é a macroautofagia, um processo não-seletivo, onde porções do citoplasma e constituintes citoplasmáticos são cercados por uma estrutura de membrana dupla, o fagócito. Esta estrutura desenvolve-se em uma vesícula de membrana dupla, o autofagossomo, em seguida, a membrana externa da vesícula se funde com a membrana lisossomal vacuolar, formando o autolisossomo. A vesícula presente no lúmen do lisossomo é chamada de corpo autofágico e, sua membrana é rompida por hidrolases lisossômicas e seu conteúdo degradado. Os produtos da degradação são transportados de volta para o citosol através da membrana lisossomal. Em alternativa, no processo conhecido por microautofagia, os constituintes citoplasmáticos são tomados pelo lisossomo como resultado da imersão pela membrana dessa organela, formando o autolisossomo (KIEL, 2010; BRENNAND et al., 2011).

Cada um dos processos citados acima, é caracterizado por uma seqüência de eventos morfológicos e bioquímicos. Apesar da necrose e apoptose serem processos típicos da morte celular programada (PCD), deve-se ressaltar que a autofagia é geralmente considerada como um processo que não tem primariamente a intenção de matar, mas sim, de sustentar a sobrevivência celular em condições de degradação e remodelação celular. Apenas quando a degradação é contínua a autofagia é desencadeada por mecanismos que resultam na morte da célula (BRENNAND et al., 2011).

1.6 Gênero *Laurencia* e o Elatol

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de novas substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental, tanto pelo valor dessa imensa riqueza biológica como pelo potencial de fonte de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). O estudo da biodiversidade marinha e os diferentes compostos extraídos, associados às suas atividades biológicas, têm atraído à atenção de diversos grupos de pesquisa. Atualmente, são conhecidas várias substâncias originadas de invertebrados e micro-organismos marinhos,

muitas com potente atividade farmacológica (CAVALCANTI et al., 2008; BARREIRO; BOLZANI, 2009). A exemplo, temos as algas vermelhas que são grandes produtoras de metabólitos secundários. Dentre essas, o gênero *Laurencia* destaca-se como fonte de novos produtos naturais (KLADI et al., 2008).

O Elatol foi isolado de *L. elata* pela primeira vez por Sims, Lin e Wing (1974). É isolado como componente majoritário da alga vermelha *L. microcladia* Kutz, coletada no Sul do Brasil (LHULLIER et al., 2009). Além do sesquiterpeno elatol, muitas espécies do gênero *Laurencia* produzem metabólitos halogenados (HAY; FENICAL, 1988; MACHADO et al., 2010). Alguns trabalhos descrevem atividades biológicas de vários compostos do gênero *Laurencia*, como antibacteriana (VAIRAPPAN et al., 2001a; VAIRAPPAN et al., 2001b; VAIRAPPAN, 2003; KLADI et al., 2008; MAYER et al., 2009), antimalárica (WRIGHT et al., 1996; TOPCU et al., 2003; MENDIOLA-MARTÍNEZ et al., 2005) antitricômonas (MOO-PUC; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2008), anti-helmíntica (MAYER et al., 2009), tripanocida (VEIGA-SANTOS et al., 2010) e leishmanicida (SANTOS et al., 2010). O elatol, por sua vez, apresenta atividades importantes, como inibição da herbivoria (PEREIRA et al., 2003), da incrustação (DA GAMA et al., 2003), atividade antibacteriana (PARADAS et al., 2010; VAIRAPPAN et al., 2001a; VAIRAPPAN, 2003), e também contra protozoários (VEIGA-SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

Recentemente, nosso grupo mostrou a atividade do elatol, isolado de *L. dendroidea* (Fig. 1), contra formas parasitárias de *T. cruzi* (VEIGA-SANTOS et al., 2010). Este composto apresentou maior atividade sobre tripomastigotas e amastigotas intracelulares, além disso, provocou alterações morfológicas e ultraestruturais importantes nessas formas, como: células arredondadas com intensa vacuolização citoplasmática, inchaço mitocondrial, alteração da integridade da membrana celular e figuras de mielina. Apresentou também menor toxicidade para células LLCMK₂ (células epiteliais do rim de *Macaca mulatta*) do que para tripomastigotas e amastigotas intracelulares.

Outro trabalho indicou que o elatol é um potente agente antiproliferativo contra as promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, onde os parasitos tratados com elatol apresentaram inchaço mitocondrial, aparecimento de estruturas membranosas dentro desta organela, alteração da membrana plasmática, vacúolos autofágicos e extensão do retículo endoplasmático (SANTOS et al., 2010).

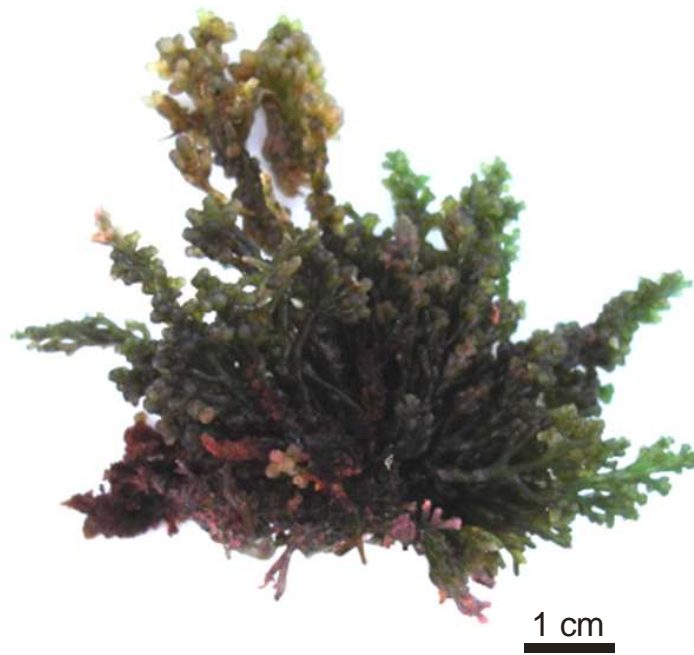


Figura 1. Espécime de *Laurencia dendroidea*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar possíveis mecanismos de ação e vias de morte celular envolvidas na atividade tripanocida do elatol em tripomastigotas de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do elatol sobre o potencial de membrana mitocondrial e alteração da integridade da membrana celular;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a fluidez da membrana;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a formação de ânion superóxido mitocondrial;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a peroxidação lipídica;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a fragmentação do DNA;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a diminuição do volume celular;
- Avaliar o efeito do elatol sobre a autofagia.

3. REFERÊNCIAS

BA, X.; GUPTA, S.; DAVIDSON, M.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11596-11606, 2010.

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.

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

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.

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.

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, P. C.; SILVA, V. G.; FURTADO, C.; MACHADO-SILVA, A.; DAROCHA, W. D.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; MEDEIROS, M. H.; LANA GDE, C.; CHEN, Y.; BARNES, R. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; MCCULLOCH, R.; MACHADO, C. R.; TEIXEIRA, S. M. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 176, n. 1, p. 8-16, 2011.

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. 1-3, 2011.

CARRANZA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; MENDONÇA, M. A. G.; 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, p. 299-308, 2009.

CAVALCANTI, B. C.; SOMBRA, C. M.; DE OLIVEIRA, J. H.; BERLINCK, R. G.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 409-415, 2008.

CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Parasitic Loads in Tissues of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* and Treated with AmBisome. **Public Library of Science**, v. 6, p. 1-8, 2011.

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.

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.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 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.

DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; SOARES, A. R.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 19, p. 161-169, 2003.

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, E. M.; SILVA, P. B.; NEFERTITI, A. S. G.; ISMAIL, M. A.; ARAFA, R. K.; TAO, B.; NIXON-SMITH, C. K.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. C. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 429-435, 2011.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypansomatid Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease**, v. 2009, p. 1-19, 2009.

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.; PRATA, A.; SCHOFIELD, C. J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 669-678, 2002.

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.

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. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, p. 69-78, 2010.

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.

GODOY, I.; MEIRA, D. A. Soroprevalência da infecção chagásica em moradores de municípios da região de Botucatu, Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 5, p. 516-520, 2007.

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.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defense. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 19, p. 111-145, 1988.

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

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

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

KLADI, M.; VAGIAS, C.; STAVRI, M.; RAHMAN, M. M.; GIBBONS, S.; ROUSSIS, V. C15 acetogenins with antistaphylococcal activity from the red alga *Laurencia glandulifera*. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 31-36, 2008.

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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, p. 18-28, 2006.

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.; 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.

LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J. A.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 254-259, 2009.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. D. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 167-171, 2010.

MACHADO, F. L. S.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S.; GESTINARI, L. M.; SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2010.

MARCON, G. E. B.; ALBUQUERQUE, D. M.; BATISTA, A. M.; ANDRADE, P. D.; ALMEIDA, E. A.; GUARIENTO, M. E.; TEIXEIRA, M. A. B.; COSTA, S. C. B. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 85-91, 2011.

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.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MENDIOLA-MARTÍNEZ, J.; HERNÁNDEZ, H.; ACUNÁ, D.; ESQUIVEL, M.; SCULL-LIZAMA, R.; ABREU-PAYROL, J. Inhibiting activity of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* of extracts from algae of genus *Laurencia*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, p. 192-195, 2005.

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 Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 644-653, 2009a.

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**, v. 40, p. 157-168, 2009b.

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

MONCAYO, Á.; 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, n. 1, p. 17-30, 2009.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 92-97, 2008.

NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; FREITAS, J. L. P.; AMATO NETO, V.; KLOETZEL, J. Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Emprego de violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. **Hospital**, v. 44, p. 731-744, 1953.

OLIVEIRA, M. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; SOUZA JÚNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; SUDATTI, D. B.; CRAPEZ, M. A. C.; FUJII, M. T.; COUTINHO, R.; PEREIRA, R. C.; AMADO-FILHO, G. M. Induction of halogenated vesicle transport in cells of the red seaweed *Laurencia obtusa*. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 26, p. 277-286, 2010.

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.

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.

PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Ecological roles of natural products from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 665-672, 2003.

PIÑEYRO, M. D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, v. 408, p. 45-50, 2008.

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

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the Killer Organelles and Their Weapons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, p. 131-137, 2002.

RIBEIRO, C. M.; BUDNI, P.; PEDROSA, R. C.; FARIAS, M. S.; PARISOTTO, E. B.; DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S.; OLIVEIRA-SILVA, D.; COLEPICCOLO, P.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benznidazole in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 145, p. 27-33, 2010.

RODRÍGUEZ, J.; ARÁN, V. J.; BOIANI, L.; OLEA-AZAR, C.; LAVAGGI, M. L.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MAYA, J. D.; CARRASCO-POZO, C.; COSOY, H. S. New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 8186-8196, 2009.

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

SANTOS, A.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, É. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. Effect of Elatol, Isolated from Red Seaweed *Laurencia dendroidea* on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v. 8, n. 11, p. 2733-2743, 2010.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007a.

SCHMUNIS, G. A. The globalization of Chagas disease. **ISBT Science Series**, v. 2, p. 6-11, 2007b.

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

SIMS, J. J.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M. Marine natural products: Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3487-3490, 1974.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 167-180, 2009.

TARLETON, R. L.; REITHINGER, R.; URBINA, J. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The Challenges of Chagas Disease-Grim Outlook or Glimmer of Hope? **Public Library of Science**, v. 4, n. 12, p. 1852-1857, 2007.

THOMAS, S. M.; MACPHEE, D. G. Crystal violet: a direct-acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. **Mutation Research**, v. 140, n. 4, p. 165-167, 1984.

TONIN, L. T. D.; PANICE, M. R.; NAKAMURA, C. V.; ROCHA, K. J. P.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; COSTA, W. F.; SARRAGIOTTO, M. H. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carbonile)-3-carboxamides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 386-389, 2010.

TOPCU, G.; ANYDOQMUS, Z.; IMRE, S.; GOREN, A. C.; PEZZUTO, J. M.; CLEMENT, J. A.; KINGSTON, D. G. I. Brominated Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1505-1508, 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.

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. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010.

VAIRAPPAN, C. S.; DAITOH, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. **Phytochemistry**, v. 58, p. 291-297, 2001a.

VAIRAPPAN, C. S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 255-259, 2003.

VAIRAPPAN, C. S.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. **Phytochemistry**, v. 58, p. 291-297, 2001b.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N.; CÉSAR, M. J. B.; SANTOS, M. P.; MIRANDA, C. O. S.; CUERVO, P.; FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 291-297, 2009.

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.

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 antitrypanosomal activity of Elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v. 137, p. 1661-1670, 2010.

VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J. O.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 1005-1011, 2001.

WHO - World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, p. 1-172, 2010.

WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M.; ANGERHOFER, C. K.; GREENIDGE, P.; LINDEN, A.; DESQUEYROUX-FAUNDEZ, R. Antimalarial Activity: The Search for Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 710-716, 1996.

ZONG, W.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, v. 20, p. 1-15, 2006.

ANEXO

ANEXO I

Trypanocidal action of elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction

1 **Trypanocidal action of elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria**
2 **dysfunction**

3

4 Desoti, V. C.¹, Lazarin-Bidóia, D.¹, Sudatti, D. B.³, Pereira, R. C.³, Alonso, A.⁴, Ueda-
5 Nakamura T.^{1,2}, Dias Filho B. P.^{1,2}, Nakamura C. V.^{1,2}, Silva, S. O.^{1,2*}

6

7 ¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de*
8 *Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Brazil.*

9 ² *Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av.*
10 *Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Brazil.*

11 ³ *Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Caixa Postal*
12 *100644, CEP 24001-970, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.*

13 ⁴ *Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, CEP 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil.*

14

15 * Corresponding author: Sueli de Oliveira Silva, Universidade Estadual de Maringá, Av.
16 Colombo 5790, Bloco I-90 CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil. Phone number: +55 44
17 3011-8989, Fax: +55 44 3011-5941. E-mail: lautenschlager@uem.br

18

19

20

21

22

23

24

25 **Objectives:** Natural compounds have shown good potential for the discovery of new
26 chemotherapy for the treatment of Chagas' disease. Recently our group reported trypanocidal
27 activity of elatol, extracted from red macroalgae *Laurencia dendroidea*, collected off the
28 Brazilian coast in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. This trypanocidal activity
29 might be a result of morphological and ultrastructural alterations revealed by electronic
30 microscopy. Thus, the proposal of this work was to study the trypanocidal activity of elatol on
31 trypomastigote forms of *T. cruzi* in an attempt to delineate the putative mechanism of action
32 of this compound.

33 **Methods:** For this, the effect of elatol on parasite death was evaluated by different
34 biochemical tests.

35 **Results:** Our results showed that elatol induced depolarization of mitochondrial membrane
36 loss of cell membrane and DNA integrity. Additionally, elatol induced an increase in the
37 formation of mitochondrial superoxide anion, a decrease in cell volume and the formation of
38 autophagic vacuoles.

39 **Conclusions:** All these together suggest that the trypanocidal action of elatol involves
40 multiple events and mitochondria might be the initial target organelle. Our hypothesis is that
41 the mitochondrial dysfunction leads to an increase of ROS production in the electron transport
42 chain which affects cell membrane and DNA integrity leading to different types of parasite
43 death.

44

45 **Keywords:** Elatol, *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, mitochondria.

46

47

48

49

50 **Introduction**

51 More than hundred years after the discovery of Chagas' disease there are only two
52 drugs available for the treatment of this infection. These two drugs, nifurtimox and
53 benznidazole have variable efficacy, especially in the chronic phase of the disease. Using
54 these drugs cause serious toxic side effects as well as expose the patient to prolonged
55 treatment. This infection is considered a serious health as well as social problem. Estimates
56 indicate that there are about 10 million cases worldwide¹ and around 50,000 to 200,000 new
57 infections occurring every year.² In addition, more than 10,000 deaths per year are the result
58 of Chagas' disease.¹

59 In this context, the search for new effective and less toxic chemotherapy agents for the
60 treatment of Chagas' disease is increasing.³ Although literature presents various studies
61 regarding extracts and pure compounds obtained from plants and macroalgae with good
62 potential for the treatment of this infection,⁴⁻⁸ little is known about their mechanisms of
63 action.

64 As an example of that, our group recently reported the trypanocidal activity of elatol
65 (Fig. 1), extracted from red macroalgae *Laurencia dendroidea*, present in Brazilian coast on
66 *Trypanosoma cruzi*.⁸ This compound proved to be about 20 times less toxic to the LLCMK₂
67 than to the trypomastigotes.⁸ However, nothing was described about the mechanism of action
68 of this compound, only hypothesis concerning its action on mitochondrial function.⁸ In fact,
69 the mitochondria of Trypanosomes exhibit unique characteristics that are distinct from
70 mammalian mitochondria, making this organelle a major target of chemotherapeutic agents.⁹

71 This prompted us to further investigate the involvement of mitochondrial dysfunction
72 on *T. cruzi* death induced by elatol. This hypothesis is strongly based on our previous work by
73 the transmission electron microscopy (TEM) data that evidenced ultrastructural alteration
74 such as swollen mitochondrial. The trypanocidal action of elatol was described for both

75 infective forms of *T. cruzi*, intracellular amastigotes and trypomastigotes. However, we
76 focused our efforts on trypomastigotes, the main form that disseminates the infection. Thus,
77 we evaluated some biochemical alterations on trypomastigote forms treated with elatol in a
78 way to better elucidate the relationship between mitochondrial dysfunction and the type of
79 cell death triggered.

80

81 **Methods**

82 *Isolation of elatol from Laurencia dendroidea*

83 Elatol was isolated of specimens of *L. dendroidea* collected by hand during low tide,
84 in the midlittoral zone on the rocky coast of Cabo Frio Island (22°59' S, 42°59' W), Rio de
85 Janeiro State, Brazil. The seaweed was stored in plastic bags and chilled on ice during
86 transport to the laboratory. The specimens of *L. dendroidea* used in this study were identified
87 by Dr. Mutue Toyota Fujii, and voucher specimens were deposited in the herbaria SP,
88 Instituto de Botânica, São Paulo State, Brazil (SP number: 399789). *L. dendroidea* was dried
89 in the dark at room temperature in order to avoid photolysis and thermal degradation.

90 The air-dried algal material (300.0 g) giving 50 mg of elatol was successive and
91 exhaustively extracted in *n*-hexane at room temperature for 15 days. The solvent was
92 eliminated in a rotary evaporator, at low temperature (<50 °C), yielding 3.64 g of a dark green
93 extract containing the sesquiterpene elatol, which was detected as brown spot on TLC plates
94 after spraying with a solution of ceric sulphate and sulfuric acid (2.1 g of Ce₂(SO₄)₃·4H₂O; 21
95 mL of H₂SO₄ and 300 mL of H₂O), followed by heating at 100 °C for 3 min. An aliquot of
96 HE (0.35 g) was submitted to preparative thin layer chromatography (PTLC) (Merck, silica
97 gel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm, mobile phase: *n*-hexane/ethyl acetate 8:2), to afford a yellowish oil
98 (50 mg) which was identified as the sesquiterpene elatol. The purity was confirmed by TLC

99 (Rf = 0.45), using *n*-hexane/AcOEt 8:2 as mobile phase, and by ¹H-NMR spectroscopy (300
100 MHz), and comparison with the literature.^{10,11}

101 Elatol stock solutions (1 mg/mL) were prepared in DMSO, stored at 4 °C. All groups
102 (including controls) were tested at final concentrations of less than 1% DMSO, a
103 concentration found not to affect trypomastigotes (data not shown). The tested concentrations
104 were based on effective concentration (EC₅₀).⁸

105

106 *Parasites and cells cultures*

107 *T. cruzi* trypomastigote forms (Y strain) (95% of purity) were obtained from the
108 supernatant of an infected LLCMK₂ cells monolayer (epithelial cell of monkey kidney -
109 *Macaca mulatta*) in DMEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-
110 inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 mg/L gentamicin, and buffered with sodium
111 bicarbonate in a 5% CO₂ air mixture at 37 °C. Sub-confluent cultures of LLCMK₂ cells were
112 infected with 5 × 10⁶ trypomastigotes. Extracellular parasites were removed after 24 h, the
113 cells washed, and these cultures were maintained in DMEM medium containing 10% FBS,
114 until trypomastigotes emerged from the infected cells.

115

116 *Cell membrane integrity and mitochondrial membrane potential assays*

117 Trypomastigotes (1 × 10⁷ cells/mL) treated or untreated with 1.5 and 3.0 μM of elatol,
118 for 2 and 3 h at 37 °C, were washed and incubated with 0.2 μg/mL of propidium iodide (PI)
119 for 10 min to verify possible alteration in cell membrane integrity, and 5 μg/mL of rhodamine
120 123 (Rh123) for 15 min to evaluate the mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m). The
121 compound antimycin A (AA) 2.0 μM was used as a positive control for measurement of
122 mitochondrial membrane potential and digitonin 40.0 μM for cell membrane integrity. Data
123 acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-

124 Dickinson, Rutherford, NJ, USA) equipped with the CellQuest software (Joseph Trotter,
125 Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired in the
126 region previously established as that corresponding to the parasites. Alterations in the
127 fluorescence of Rh123 were quantified as the percent of reduction of the fluorescence
128 compared with the control (untreated parasites).

129

130 *Spin labeling*

131 The spin label 5-doxyl stearic acid (5-DSA), having the nitroxide radical moiety
132 (doxyl) in the 5th carbon atom of the acyl chain (Fig. 2), was purchased from Sigma Chem.
133 Co. (St. Louis, MO). A small aliquot (3 μ L) of stock solution of spin label in ethanol (2
134 mg/mL) was transferred to an eppendorf tube. After that, the solvent was evaporated and
135 about 1×10^8 trypomastigotes/mL, suspended in 30 μ L of phosphate-buffered saline (PBS),
136 was added on the film of spin label and gentle agitation applied. After spin labeling, 1 or 3 μ L
137 of a stock solution of elatol in ethanol (300 mg/mL) was applied to the cell suspension and
138 gently mixed. The cells were then introduced into 1-mm I.D. capillary for electron
139 paramagnetic resonance (EPR) measurements, which were sealed by flame.

140

141 *EPR spectroscopy*

142 EPR spectroscopy was performed with a Bruker ESP 300 spectrometer (Rheinstetten,
143 Germany) equipped with an ER 4102 ST resonator. The instrument settings were: microwave
144 power of 10 mW; modulation frequency of 100 KHz; modulation amplitude of 1.0 G;
145 magnetic field scan of 100 G; sweep time of 168 s; and detector time constant of 41 ms. EPR
146 spectra simulations were performed using the NLLS program (nonlinear least-squares fitting
147 program) developed by Freed and coworkers.¹² In the spectral calculations, the NLLS
148 program includes the magnetic g- and A-tensors and the rotational diffusion tensor, R, which

149 are expressed in a system of Cartesian axes fixed in the spin-labeled molecule. To reduce the
150 number of parameters in the fittings and to simplify the simulation, the average rotational
151 diffusion rate, R_{bar} , was calculated by the fitting program using the relation $R_{\text{bar}} =$
152 $(R_{\text{per}}^2 \cdot R_{\text{par}})^{1/3}$, where R_{per} is the perpendicular and R_{par} is the parallel component of the
153 rotational diffusion.¹² R_{bar} was converted to the parameter rotational correlation time, τ_c ,
154 following the relationship $\tau_c = 1/6 R_{\text{bar}}$. In this work, the spectra were simulated with a model
155 of a single spectral component. Similar to previous studies,^{13,14} the magnetic parameters were
156 determined based on a global analysis of the overall spectra obtained in this work, and all of
157 the EPR spectra were simulated using the same predetermined parameters. Input parameters
158 of tensors g and A were: $g_{xx} = 2.0082$; $g_{yy} = 2.0060$; $g_{zz} = 2.0022$; $A_{xx} = 7.5$; $A_{yy} = 7.0$ G and
159 $A_{zz} = 31.5$ G.

160

161 *Fluorimetric detection of mitochondrial-derived $O_2^{\bullet-}$*

162 Mitochondrial production of superoxide anion was evaluated during the exposure of
163 trypomastigotes to elatol, 1.5, 3.0, 6.0, 15.0 and 30.0 μM using the fluorescent $O_2^{\bullet-}$ sensitive,
164 mitochondrial-targeted probe MitoSOX [3,8-phenanthridinediamine, 5-(6-
165 triphenylphosphoniumhexyl)-5,6-dihydro-6-phenyl] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).
166 Trypomastigotes (2×10^7 cells/mL) were loaded with 5 μM MitoSOX for 10 min at room
167 temperature (22 °C) and then washed with the KH (Krebs-Henseleit) buffer (pH 7.3)
168 containing 15 mM NaHCO_3 , 5 mM KCl, 120 mM NaCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 and 1.5 mM
169 NaH_2PO_4 before the assays. Loaded cells were exposed to the stimuli, and after different
170 times the fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader (Victor X3 -
171 PerkinElmer) at $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 580$ nm. In some of the experiments, cells were
172 exposed to 10 μM AA, a stimulus known to induce $O_2^{\bullet-}$ production by mitochondria.¹⁵

173

174 *Lipid peroxidation assay*

175 Trypomastigote forms (12 mg/mL) were incubated in the DMEM medium at 37 °C,
176 and elatol was added in concentrations of 1.5, 3.0, 6.0, 15.0 and 30.0 µM. Cells were
177 incubated at 37 °C for 3 h. The extent of lipid peroxidation was determined as the amount of
178 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in terms of malondialdehyde (MDA). After
179 incubation, samples (0.5 mg protein) were heated in a solution containing 0.37%
180 thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, and 0.25 N HCl at 95 °C for 45 min. After
181 cooling, the absorbance was read at 532 nm and the concentration of TBARS was calculated
182 based on a ϵ value of $153\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹⁶

183

184 *DNA fragmentation*

185 We analyzed DNA double-strand ruptures *in situ* by TUNEL (Terminal
186 Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling). For this, trypomastigotes (1×10^7
187 cells/mL) were treated with elatol at concentrations 1.5 and 3.0 µM for 24 h, after the cells
188 were subjected to the TUNEL assay according to the manufacturer's instructions (Molecular
189 Probes, Eugene, OR, USA). The compound actinomycin D 10 µg/mL was used as a positive
190 control. The nuclei were counterstained with propidium iodide. Cells that have undergone
191 DNA double-strand ruptures should fluorescence brightly, unlike the untreated cells.
192 Fluorescence was observed in a fluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus®) and
193 pictures were captured with a UC30 camera (Olympus®).

194

195 *Cell volume determination*

196 Trypomastigotes (1×10^7 cells/mL) treated with elatol at concentrations 1.5 and 3.0
197 µM for 3 h and 24 h, were collected by centrifugation, washed twice in PBS, resuspended in
198 PBS and analyzed by fluorescence-activated cell sorting using a FACSCalibur flow cytometer

199 (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA). The compound actinomycin D 20.0 mM was used
200 as a positive control. A total of 10,000 events were acquired in the region previously
201 established as that corresponding to the parasites. Histograms and analysis were performed in
202 CellQuest software, FSC-H which represents the cell volume (Joseph Trotter, Scripps
203 Research Institute, La Jolla, CA, USA).

204

205 *Autophagy assay*

206 The study of the cell death pathway in cells treated with elatol was performed using
207 monodansylcadaverine labelling (MDC).¹⁷ Autophagy was induced by elatol 1.5 and 3.0 μ M
208 in trypomastigotes (1×10^7 cells/mL) after an incubation time of 24 h. Thus, the cells were
209 incubated with 0.05 mM of MDC in PBS at 37 °C for 15 min. After incubation the cells were
210 washed in PBS two times. MDC stain was analyzed by fluorescence microscope Olympus
211 BX51 (Olympus[®]) and images were captured using a UC30 camera (Olympus[®]). In some
212 experiments, cells were pre-treated with wortmannin, a potent PI3- kinase inhibitor, before
213 induction of autophagy.

214

215 *Statistical analysis*

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

221

222

223

224 **Results**

225 *Effect of elatol on mitochondrial membrane potential and on cell membrane integrity of*
226 *trypomastigote forms*

227 Based on our previous work that indicated, by electron microscopy, the effect of elatol
228 on *T. cruzi* mitochondria and cell membrane,⁸ we decided to evaluate the mitochondrial
229 membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the cell membrane integrity in elatol-treated trypomastigotes
230 by flow cytometry. Histograms showed a marked decrease in fluorescence intensity total
231 Rh123, indicating mitochondrial depolarization in cells treated with 1.5 and 3.0 μM of elatol
232 for 3 h, with $\Delta\Psi_m$ reductions of 80.9 and 86.0% respectively (Fig. 3 B). A decrease in
233 fluorescence intensity was also observed in 2 h of treatment, with $\Delta\Psi_m$ reductions of 27.2 and
234 27.7%, respectively (data not shown). The positive control AA induced 81.3% change in
235 mitochondrial membrane potential (Fig. 3 A).

236 For cell membrane integrity, the histograms of fluorescence (PI) of trypomastigotes
237 treated with elatol at 1.5 and 3.0 μM for 2 h showed increase in intensity in both tested
238 concentrations, indicating alteration of cell membrane integrity. Figure 4 shows that the
239 percentage of PI-stained cells in untreated trypomastigotes (A) was 6.3% (upper-right and left
240 quadrant). The positive control (B) with digitonin showed an increase in fluorescence 55.0%
241 (upper-right and left quadrant). However, the percentage of PI-stained cells at 1.5 and 3.0 μM
242 (C, D) increased to 92.9% and 96.9% (upper-right and left quadrant), respectively.

243

244 *EPR spectra of spin labeled of trypomastigote forms*

245 To confirm the effect of elatol on the cell membrane the experimental and best-fit EPR
246 spectra of spin label 5-DSA (Fig. 2) structured in the plasmatic membrane of trypomastigotes
247 was made and are shown in Figure 5. These EPR spectra were typical for cellular membranes
248 containing an appreciable amount of integral proteins. The treatment with elatol increased two

249 EPR parameters, the outer hyperfine splitting, $2A_{//}$, and the rotational correlation time, τ_c ,
250 indicating significant reduction in membrane lipid dynamics. $2A_{//}$ is a practice parameter
251 measured directly in the EPR spectra (Fig. 5). This has been widely used to monitor
252 membrane fluidity even though, in principle, it is a static parameter associated with the
253 orientation distribution of the spin labels in the membrane.

254

255 *Detection of mitochondrial-derived $O_2^{\bullet-}$ of trypomastigote forms*

256 Changes in mitochondrial membrane potential can induce an increase in the
257 production of reactive oxygen species (ROS) through the electron transport chain.⁹ Thus,
258 based on our mitochondrial membrane potential results we decide to evaluate the superoxide
259 anion production ($O_2^{\bullet-}$).

260 As shown in Figure 6, elatol induced an increase in the $O_2^{\bullet-}$ production in all
261 concentrations assayed starting from 1 h of incubation. However, the 15.0 and 30.0 μ M were
262 the more effective concentrations of elatol displaying a significant increase of mitochondrial
263 $O_2^{\bullet-}$ production in trypomastigotes at 2 and 3 h when compared to the control. The positive
264 control with AA also induced an increase of mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production (data not shown).

265

266 *Effect of elatol on lipid peroxidation of trypomastigote forms*

267 It is well known that ROS can lead to destructive effects through the reaction with
268 biological macromolecules such as lipids, proteins and DNA.¹⁸ Thus, the increase of $O_2^{\bullet-}$
269 production in trypomastigotes treated with elatol, showed on Figure 6, might be responsible
270 for the loss of integrity of the cell membrane (Figure 4 and 5). In order to confirm that, we
271 measured the production of TBARS (which is frequently used to quantify lipoperoxidation of
272 the cell membrane and is expressed by the production of MDA). The measurement of TBARS

273 in trypomastigotes treated with 15.0 and 30.0 μM of elatol revealed a significant increase in
274 lipid peroxidation in 3 h when compared to the control (Fig. 7).

275

276 *Effect of elatol on DNA fragmentation of trypomastigote forms*

277 The oxidative stress can also trigger destructive effects on DNA.¹⁸ Therefore, the
278 increase of $\text{O}_2^{\bullet-}$ production induced by elatol might lead to a DNA break as well. As shown in
279 Figure 8, bright fluorescence was observed in trypomastigotes treated with 1.5 and 3.0 μM
280 elatol for 24 h and staining with TUNEL (D, F). Additionally, the counterstaining with PI (J,
281 L) denotes that elatol induced the condensation and margination of chromatin. The control
282 without treatment showed TUNEL and PI negative (B, H). In addition, bright fluorescence
283 was also observed with actinomycin D, a known apoptotic inducer (data not shown).

284

285 *Effect of elatol on cell volume of trypomastigote forms*

286 The DNA fragmentation is one of the final steps in the apoptotic process and could be
287 an evidence of apoptosis in trypomastigotes treated with elatol. Therefore, we performed
288 additional experiments to evaluate the cell shrinkage, a hallmark of apoptotic death. As shown
289 in Figure 9, there was a decrease in cell volume in concentrations 1.5 and 3.0 μM of elatol
290 after 24 h, where reductions of 20.0 and 23.8% were observed, respectively. The positive
291 control actinomycin D induced a decrease of 79.7% in the cell volume (data not shown).

292

293 *Effect of elatol on autophagy of trypomastigote forms*

294 Based on our previous work showing by TEM the extensive formation of cytoplasmic
295 vacuoles on *T. cruzi* treated with elatol⁸ we decide to evaluate if autophagy could also be a
296 death pathway induced by elatol. For this, we evaluated autophagy by staining
297 trypomastigotes treated with elatol with MDC, a fluorescent probe that accumulates in

298 autophagic vacuoles.¹⁹ As shown in Figure 10 the presence of fluorescence in rounded
299 structures in cells treated with 1.5 and 3.0 μ M of elatol for 24 h, revealed the formation of
300 autophagic vacuoles (D, H), unlike the cells untreated (B). This effect could be partially
301 prevented in trypomastigotes pre-treated with wortmannin (F).

302

303 **Discussion**

304 Elatol has previously been reported to have trypanocidal,⁸ leishmanicidal,⁷
305 antimicrobial activity²⁰⁻²² and significantly active roles in ecological interactions, such as
306 antiherbivore activity.²³ In the present study we focus our efforts on the trypanocidal activity
307 of elatol an attempt to delineate the putative mechanism of action of this compound.

308 In this context, our data adds further evidences that mitochondria is a target for elatol
309 action, strengthening the idea introduced in our previous work.⁸ In fact, increasingly well
310 documented papers have described trypanocidal compounds targeting parasite mitochondrial
311 function.^{9,24}

312 Our results also show that not only the mitochondria, a unique and essential organelle
313 of trypomastigotes,²⁵ was affected by elatol, but also the plasma membrane, a selective
314 structure that controls the movement of substances in and out of cells essential for the
315 maintenance of the parasite homeostasis. This effect was evidenced by PI-stained cells.
316 Adding to this result, the presence of the sesquiterpene elatol significantly increased the
317 rigidity of the membrane of *T. cruzi* as evidenced by EPR spectra. The spin probe used in
318 EPR is sparsely distributed in the membrane and, therefore, the spin probe spectroscopy only
319 detects changes in membrane fluidity when a widespread change occurs. Moreover, the EPR
320 data strongly support the lipid peroxidation observed in trypomastigotes treated with elatol.
321 The lipid peroxidation alters essential structural components of cell membranes affecting cell
322 membrane permeability and fluidity.²⁶ We could not forget to mention that all these

323 membrane alterations induced by elatol are understandable considering the oxidative
324 imbalance caused by the production of $O_2^{\bullet-}$ detected, by a very sensitive fluorimetric assay, in
325 mitochondria of elatol-treated trypomastigotes. The production of ROS by mitochondria
326 occurs through oxidative phosphorylation involving the electron transport chain. In normal
327 conditions, the transport of electrons along this chain is used to oxidize O_2 to form water.
328 However, in certain situations, for example, drug toxicity, oxygen is reduced to $O_2^{\bullet-}$. This
329 process contributes to mitochondrial damage followed by an increase of permeability of their
330 membranes resulting in the release of apoptosis activating factors such as ROS toward the
331 cytosol.^{27,28} In this context, and based on well-established literature, we can state that elatol
332 induce an oxidative stress condition leading to cumulative oxidative damage in the parasite
333 macromolecules. Therefore, besides lipid peroxidation, we showed that elatol-treated
334 trypomastigotes can also trigger destructive effects on DNA evidenced by TUNEL and PI
335 staining cell.

336 Up to here our results indicate that elatol induced alterations that might be responsible
337 for different types of cell death. For example, the alterations in mitochondria and the
338 breakdown of the plasma membrane observed here and the distortion in the cell body
339 described before⁸ are all hallmarks of necrosis. The DNA fragmentation, one of the final steps
340 in the apoptotic process, could be an evidence of apoptosis in elatol-treated trypomastigotes.
341 Additionally, the decrease in cell volume observed here in treated parasite is one more
342 indicator of apoptosis.²⁹ Another type of cell death described for *T. cruzi* is autophagy which
343 is characterized by an increase in cytoplasmic vacuolization.³⁰ Our previous TEM data⁸ point
344 to the formation of cytoplasmic vacuoles in *T. cruzi* treated with elatol which suggest
345 autophagic death. Here we confirm that, showing that this effect was partially reduced by
346 wortmannin a PI3-K inhibitors, an enzyme part of the signaling pathway involved in
347 autophagy regulation.^{29,31}

348 In conclusion, taken together, our results indicate that the trypanocidal action of elatol
349 is associated with mitochondrial depolarization followed by an increase of ROS production in
350 the electron transport chain which affects all cell structure leading to different types of
351 parasite death. In this perspective of view, the mitochondria might be the initial target
352 organelle of elatol. This hypothesis agrees with many other studies and strengthens the idea
353 that mitochondria might be a target for trypanocidal action of new compounds.^{32,33,9,24} On the
354 other hand we could also speculate that the initial event induced by elatol would be the
355 increase of mitochondrial ROS, induced for example by a decrease in the antioxidant enzymes
356 activity of the parasite. In this case the mitochondrial dysfunction induced by elatol, described
357 here, would be a consequence of the increase of ROS. Both situations are conceivable and are
358 well supported by the “Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS-release” (RIRR)
359 process.³⁴ This process involves first the increase of mitochondrial ROS, then the
360 mitochondrial membrane potential disruption followed by ROS production by the electron
361 transport chain, leading to cellular damage and cell death. Based on the small time course and
362 also in the small concentrations of elatol in the Rh123 assay results compared to mitoSOX
363 assay results we strongly believe that the depolarization of mitochondrial membrane is the
364 initial event undergone by the elatol-treated trypomastigotes.

365

366 **Funding**

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

372

373 **References**

- 374 **1.** World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working
375 to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 1-172: 2010.
- 376 **2.** Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA *et al.* The Challenges of Chagas Disease-Grim
377 Outlook or Glimmer of Hope? *PLoS ONE* 2007; **4**: 1852-1857.
- 378 **3.** Tonin LTD, Panice MR, Nakamura CV *et al.* Antitrypanosomal and antileishmanial
379 activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carbonile)-3-carboxamides. *Biomed*
380 *Pharmacother* 2010; **64**: 386-389.
- 381 **4.** Paveto C, Guida MC, Esteva MI *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea
382 (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 69-74.
- 383 **5.** Fournet A, Ferreira ME, Rojas De Arias A *et al.* Phytochemical and antiprotozoal
384 activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitot* 2007; **78**: 382-384.
- 385 **6.** Izumi E, Morello LG, Ueda-Nakamura T *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal
386 activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae,
387 Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Exp Parasitol* 2008; **118**: 324-330.
- 388 **7.** Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T *et al.* Effect of Elatol, Isolated from
389 Red Seaweed *Laurencia dendroidea* on *Leishmania amazonensis*. *Mar Drugs* 2010; **8**: 2733-
390 2743.
- 391 **8.** Veiga-Santos P, Pelizzaro-Rocha KJ, Santos AO *et al.* In vitro antitrypanosomal
392 activity of Elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology* 2010; **137**:
393 1661-1670.
- 394 **9.** Menna-Barreto RFS, Gonçalves RSL, Costa EM *et al.* The activity on *Trypanosoma*
395 *cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. *Free*
396 *Radic Biol Med*, 2009; **47**: 644-653.

- 397 **10.** Sims JJ, Lin GHY, Wing RM. Marine natural products: Elatol, a halogenated
398 sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Lett* 1974; **39**: 3487-
399 3490.
- 400 **11.** Konig GM, Wright AD. Sesquiterpene content of the antibacterial dichlormethane
401 extract of the red alga *Laurencia obtusa*. *Planta Med* 1997; **63**: 186-187.
- 402 **12.** Budil DE, Lee S, Saxena S *et al.* Nonlinear-least-squares analysis of slow-motional
403 EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. *J*
404 *Magn Reson* 1996; **120**: 155-189.
- 405 **13.** Dos Anjos JLV, Neto DD, Alonso A. Effects of ethanol/L-menthol on the dynamics
406 and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;
407 **67**: 406-412.
- 408 **14.** Dos Anjos JLV, Alonso A. Terpenes increase the partitioning and molecular
409 dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes. *Int J Pharm* 2008;
410 **350**: 103-112.
- 411 **15.** Piacenza L, Irigoin F, Alvarez MN *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate
412 programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron
413 superoxide dismutase overexpression. *Biochem J* 2007; **403**: 323-334.
- 414 **16.** Pompella A, Maellaro E, Casini AF *et al.* Measurement of lipid peroxidation in vivo:
415 a comparison of different procedures. *Lipids* 1987; **22**: 206-21.
- 416 **17.** Munafo DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of
417 autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci* 2001; **114**: 3619-3629.
- 418 **18.** Ba X, Gupta S, Davidson M *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen
419 species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J*
420 *Biol Chem* 2010; **285**: 11596-11606.

- 421 **19.** Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in
422 vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 1995; **66**: 3-14.
- 423 **20.** Paradas WC, Salgado LT, Sudatti DB *et al.* Induction of halogenated vesicle transport
424 in cells of the red seaweed *Laurencia obtusa*. *Biofouling* 2010; **26**: 277-286.
- 425 **21.** Vairappan CS, Daitoh M, Suzuki M *et al.* Antibacterial halogenated metabolites from
426 the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry* 2001; **58**: 291-297.
- 427 **22.** Vairappan CS. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from
428 Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomol Eng* 2003;
429 **20**: 255-259.
- 430 **23.** Pereira RC, Da Gama BAP, Teixeira VL *et al.* Ecological roles of natural products
431 from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz J Biol* 2003; **63**: 665-672.
- 432 **24.** Pelizzaro-Rocha KJ, Veiga-Santos P, Lazarin-Bidóia D *et al.* Trypanocidal action of
433 eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in
434 *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2011; **13**: 1018-1024.
- 435 **25.** Campos PC, Silva VG, Furtado C *et al.* *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional
436 analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress
437 response. *Mol Biochem Parasitol* 2011; **176**: 8-16.
- 438 **26.** Chen H, Yoshioka H, Kim GS *et al.* Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage:
439 Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxid*
440 *Redox Sign* 2011; **14**: 1505-1517.
- 441 **27.** Muller, F. The nature and mechanism of superoxide production by the electron
442 transport chain: Its relevance to aging. *AGE* 2000; **23**: 227-253.
- 443 **28.** Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation
444 of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; **353**: 411-
445 6.

- 446 **29.** Jiménez-Ruiz A, Alzate JF, MacLeod ET *et al.* Apoptotic markers in protozoan
447 parasites. *Parasit Vectors* 2010; **3**: 1-15.
- 448 **30.** Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: Autophagic programmed cell death.
449 *Cell Death Differ* 2005; **12**: 1528-1534.
- 450 **31.** Blommaert EF, Krause U, Schellens JP *et al.* The phosphatidylinositol 3-kinase
451 inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J*
452 *Biochem* 1997; **243**: 240-246.
- 453 **32.** Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV *et al.* Effect of a b-lapachone-
454 derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J*
455 *Antimicrob Chemoth* 2005; **56**: 1034-1041.
- 456 **33.** Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Pinto AV *et al.* Mitochondrial disruption and DNA
457 fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from b-
458 lapachone. *Parasitol Res* 2007; **101**: 895-905.
- 459 **34.** Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO *et al.* Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS
460 release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability
461 transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000; **192**: 1001-1014.
- 462
- 463
- 464
- 465
- 466
- 467
- 468
- 469
- 470

471 **Legends for Figures**

472 **Figure 1.** Chemical structure of elatol, the sesquiterpene extracted from red macroalgae
473 *Laurencia dendroidea*.

474

475 **Figure 2.** Chemical structure of spin label 5-DSA used in this work.

476

477 **Figure 3.** Flow cytometry analysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with
478 elatol for 3 h and stained with Rh 123. (A) Trypomastigotes treated with 2.0 μM of AA
479 (positive control). (B) Trypomastigotes treated with 1.5 and 3.0 μM for 3 h. Control group is
480 also shown. Typical histograms of at least three independent experiments.

481

482 **Figure 4.** Flow cytometry analysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with
483 elatol for 2 h and stained with PI. (A) Untreated cells. (B) Trypomastigotes treated with
484 digitonin 40 μM (positive control). (C) Trypomastigotes treated with 1.5 μM . (D)
485 Trypomastigotes treated with 3.0 μM . The numbers shows the percentage of PI-stained
486 positive cells in upper right and left quadrant. Typical histograms of at least three independent
487 experiments.

488

489 **Figure 5.** Experimental (black line) and best-fit (red line) EPR spectra of spin label 5-DSA of
490 trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol. The EPR spectra (a) and (d) were
491 obtained from trypomastigotes without treatment (control samples); spectra (b) and (e) are
492 from samples treated with 5.4×10^9 elatol molecules/cell and the spectrum (c) is from a
493 sample treated with 1.6×10^{10} elatol molecules/cell. EPR spectra were simulated with the
494 fitting program NLLS and the values of the parameter rotational correlation time, τ_C , obtained
495 from the fit for each spectrum are indicated in nanosecond scale. The EPR parameter $2A_{//}$ is

496 the separation in magnetic-field units between the first and last resonance lines (indicated by
497 vertical lines) of the spectrum. The estimated experimental error for $2A_{//}$ and τ_C parameters
498 are 0.5 G and 1.0 ns, respectively. Typical spectra of two independent experiments.

499

500 **Figure 6.** Mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*
501 treated with elatol for up to 3 h. Mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production was evaluated using the
502 fluorescent probe MitoSOX. Results are expressed as mean fluorescence (in arbitrary units) \pm
503 SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences
504 relative to the control group as identified by variance analysis (two-way) with Tukey post-test
505 ($p \leq 0.05$).

506

507 **Figure 7.** Determination of lipid peroxidation in trypomastigote forms of *Trypanosma cruzi*
508 treated with elatol in different concentrations for 3 h. The MDA concentration was measured
509 by TBARS production. The results are expressed as mean \pm SD of at least three independent
510 experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group as
511 identified by variance analysis (one-way) with Tukey post-test ($p \leq 0.05$).

512

513 **Figure 8.** DNA fragmentation in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with
514 elatol for 24 h. TUNEL assay (panels A, B, C, D, E, F) and PI (panels G, H, I, J, K, L)
515 staining were analyzed by fluorescence microscope. Gray column is phase contrast and black
516 column is fluorescence. (A, B, G, H) Representative images of untreated cells. (C, D, I, J)
517 Representative images of trypomastigotes treated with 1.5 μ M. (E, F, K, L) Representative
518 images of trypomastigotes treated with 3.0 μ M. Arrows indicate DNA fragmentation (green)
519 and condensation and margination of chromatin (red). Bars: 10 μ m.

520

521 **Figure 9.** Flow cytometry analysis of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated
522 with elatol for 24 h. Forward light scatter (FSC-H) was considered as function of cell size.
523 Representative FACS histogram showing FSC-H of trypomastigotes treated with 1.5 μ M and
524 3.0 μ M and untreated cells (gray full histogram). Typical histograms of at least three
525 independent experiments.

526

527 **Figure 10.** Determination of autophagy in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated
528 with elatol for 24 h and stained with MDC. Gray column is phase contrast and black column
529 is fluorescence. (A, B) Representative fluorescence image of untreated cells. (C, D)
530 Representative image of trypomastigotes treated with 1.5 μ M. (E, F) Representative image of
531 trypomastigotes treated with 1.5 μ M + wortmaninn. (G, H) Representative image of
532 trypomastigotes treated with 3.0 μ M. Arrows indicate the stained autophagic structures. Bars:
533 10 μ m.

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

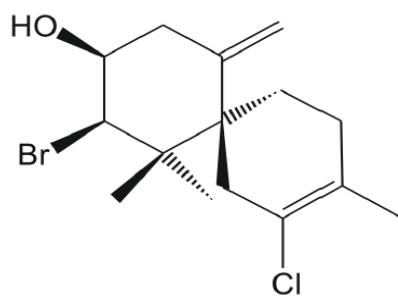
546

547

548

549

550



551

Figure 1. Chemical structure of elatol, the sesquiterpene extracted from red macroalgae

552

Laurencia dendroidea.

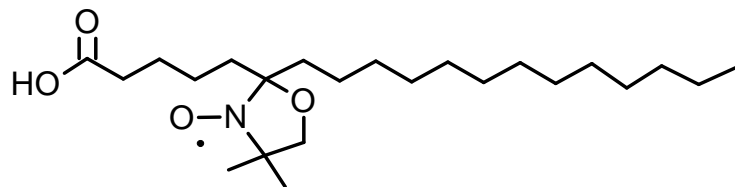
553

554

555

556

557



558

Figure 2. Chemical structure of spin label 5-DSA used in this work.

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

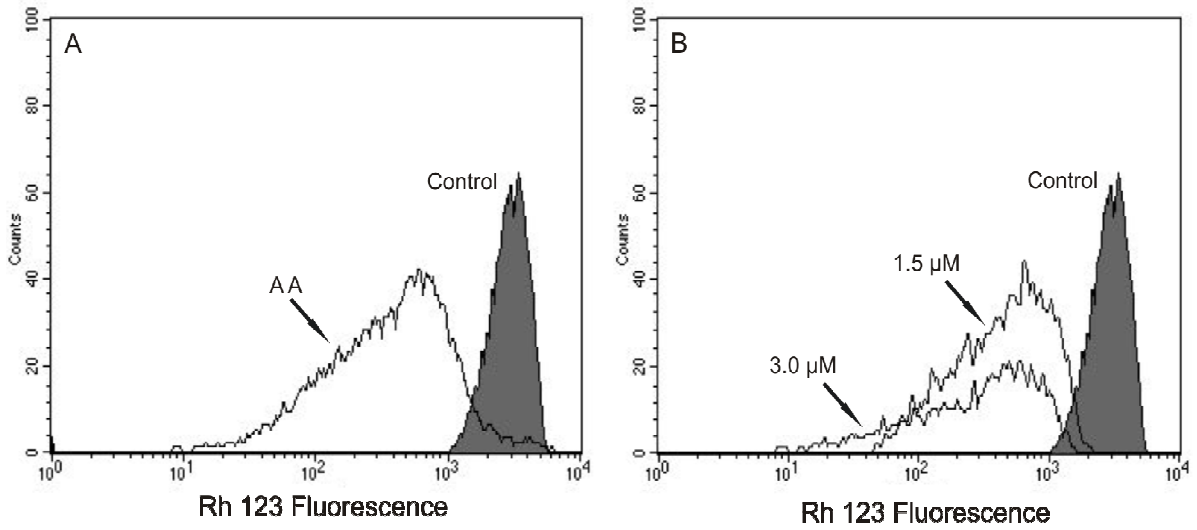
574

575

576

577

578



579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

Figure 3. Flow cytometry analysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol for 3 h and stained with Rh 123. (A) Trypomastigotes treated with 2.0 μM of AA (positive control). (B) Trypomastigotes treated with 1.5 and 3.0 μM for 3 h. Control group is also shown. Typical histograms of at least three independent experiments.

596

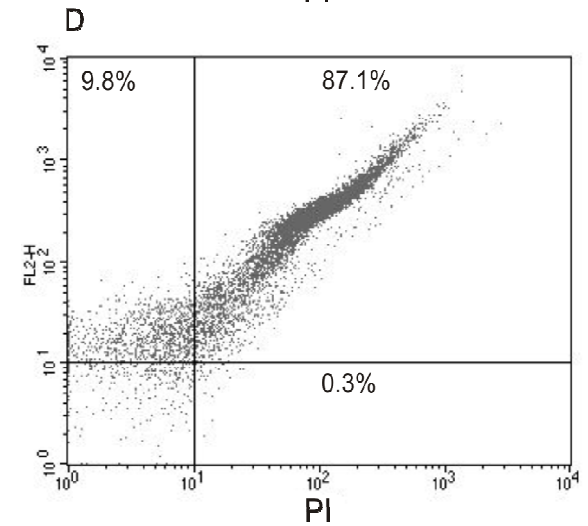
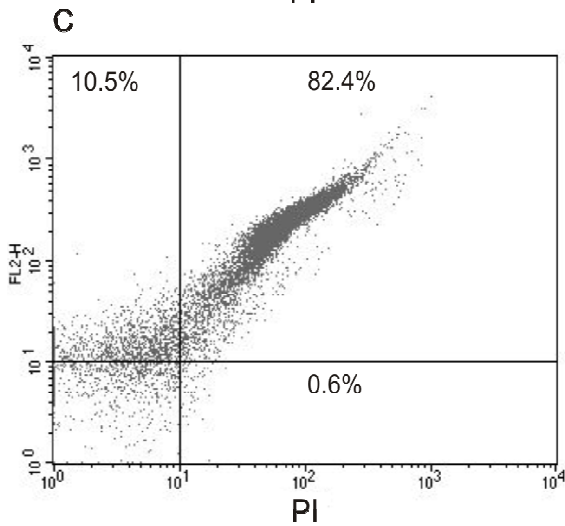
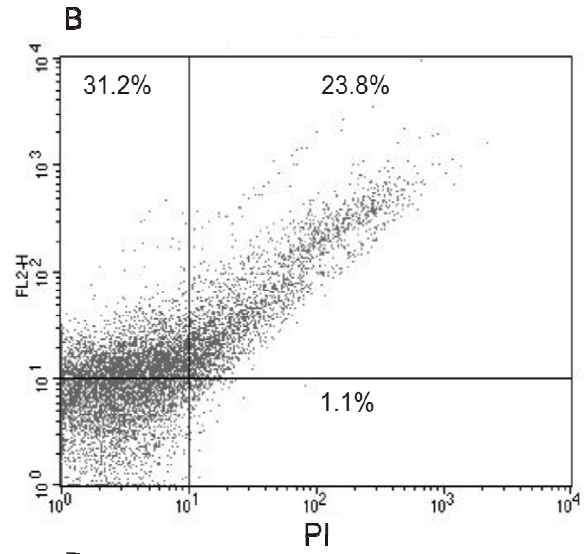
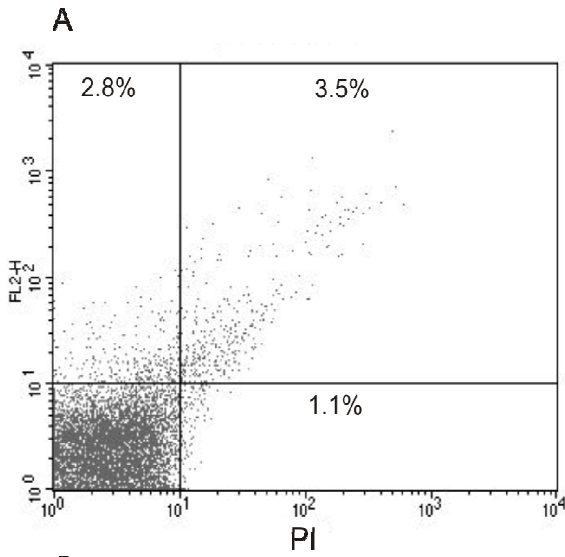


Figure 4. Flow cytometry analysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol for 2 h and stained with PI. (A) Untreated cells. (B) Trypomastigotes treated with digitonin 40.0 μM (positive control). (C) Trypomastigotes treated with 1.5 μM . (D) Trypomastigotes treated with 3.0 μM . The numbers shows the percentage of PI-stained positive cells in upper right and left quadrant. Typical histograms of at least three independent experiments.

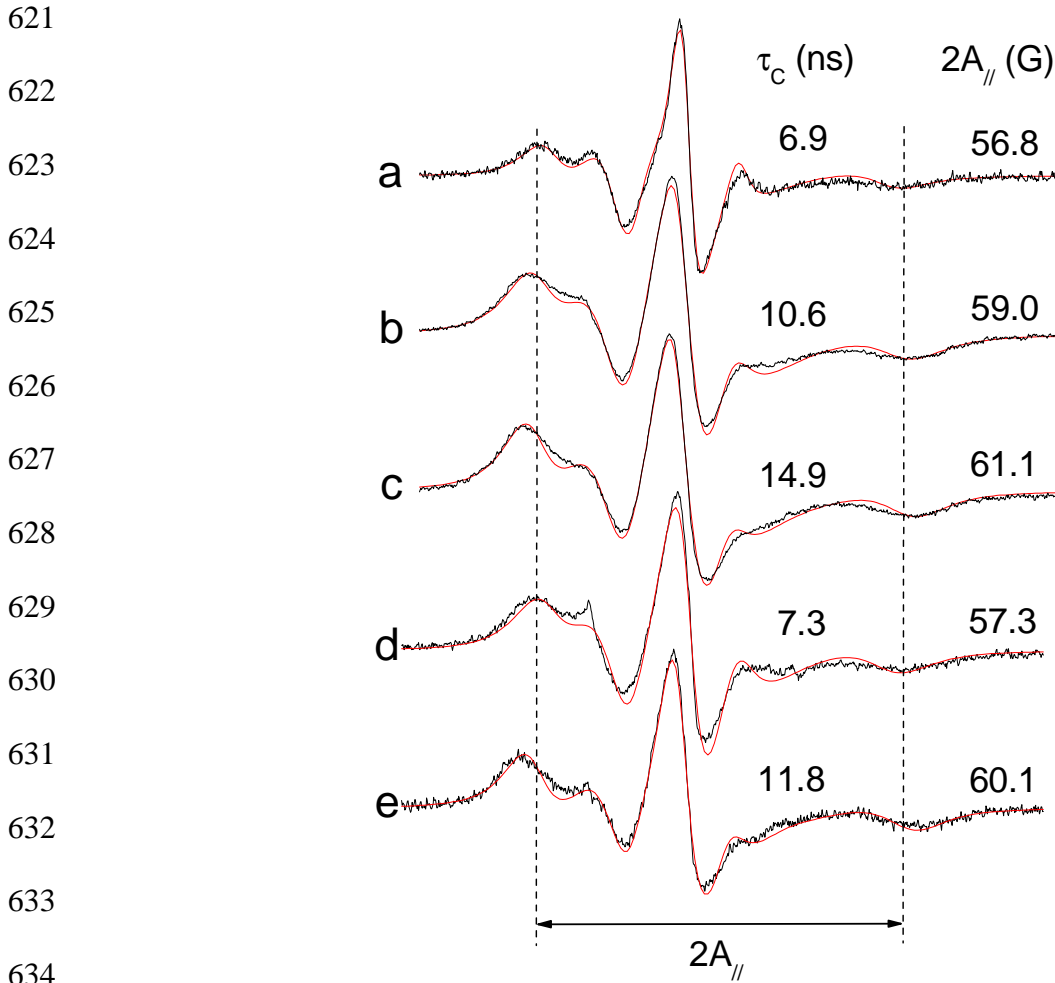


Figure 5. Experimental (black line) and best-fit (red line) EPR spectra of spin label 5-DSA of trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol. The EPR spectra (a) and (d) were obtained from trypanomastigotes without treatment (control samples); spectra (b) and (e) are from samples treated with 5.4×10^9 elatol molecules/cell and the spectrum (c) is from a sample treated with 1.6×10^{10} elatol molecules/cell. EPR spectra were simulated with the fitting program NLLS and the values of the parameter rotational correlation time, τ_C , obtained from the fit for each spectrum are indicated in nanosecond scale. The EPR parameter $2A_{//}$ is the separation in magnetic-field units between the first and last resonance lines (indicated by vertical lines) of the spectrum. The estimated experimental error for $2A_{//}$ and τ_C parameters are 0.5 G and 1.0 ns, respectively. Typical spectra of two independent experiments.

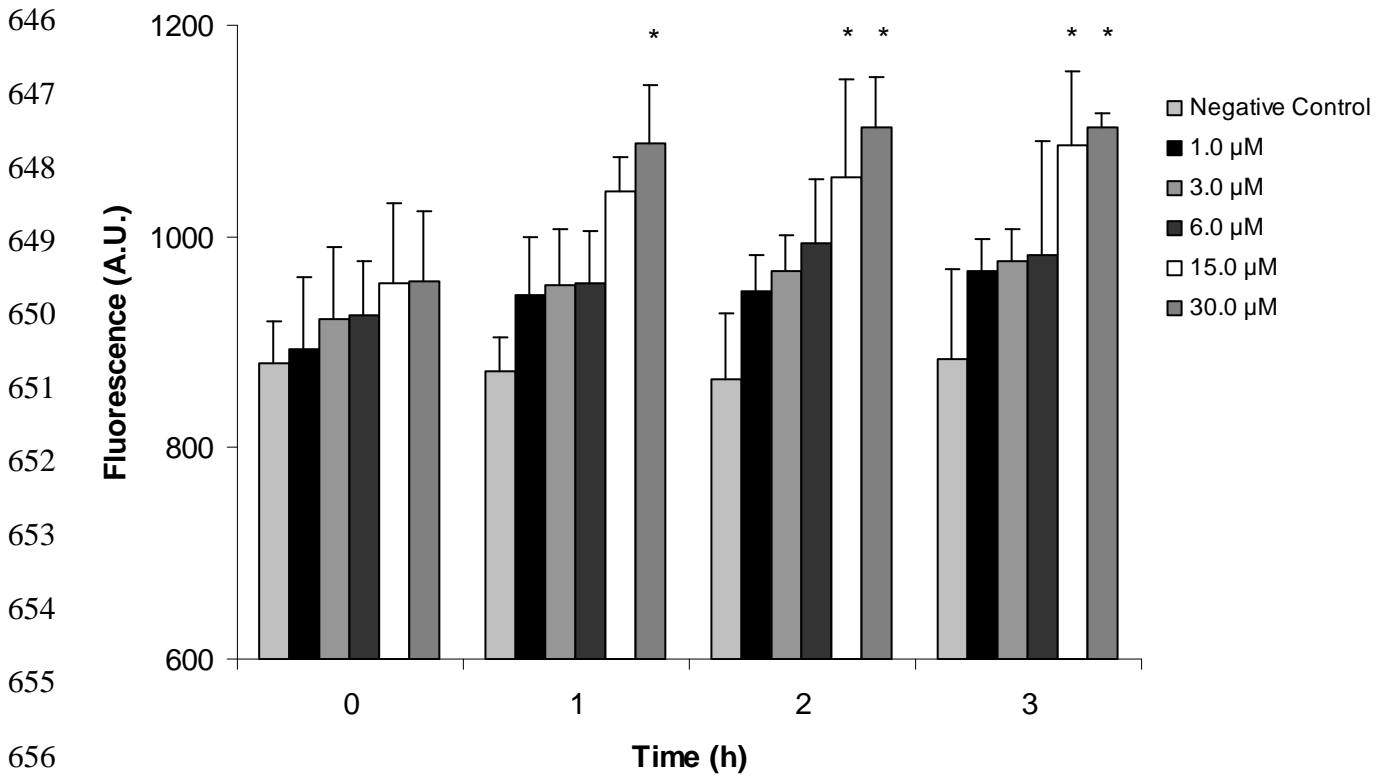
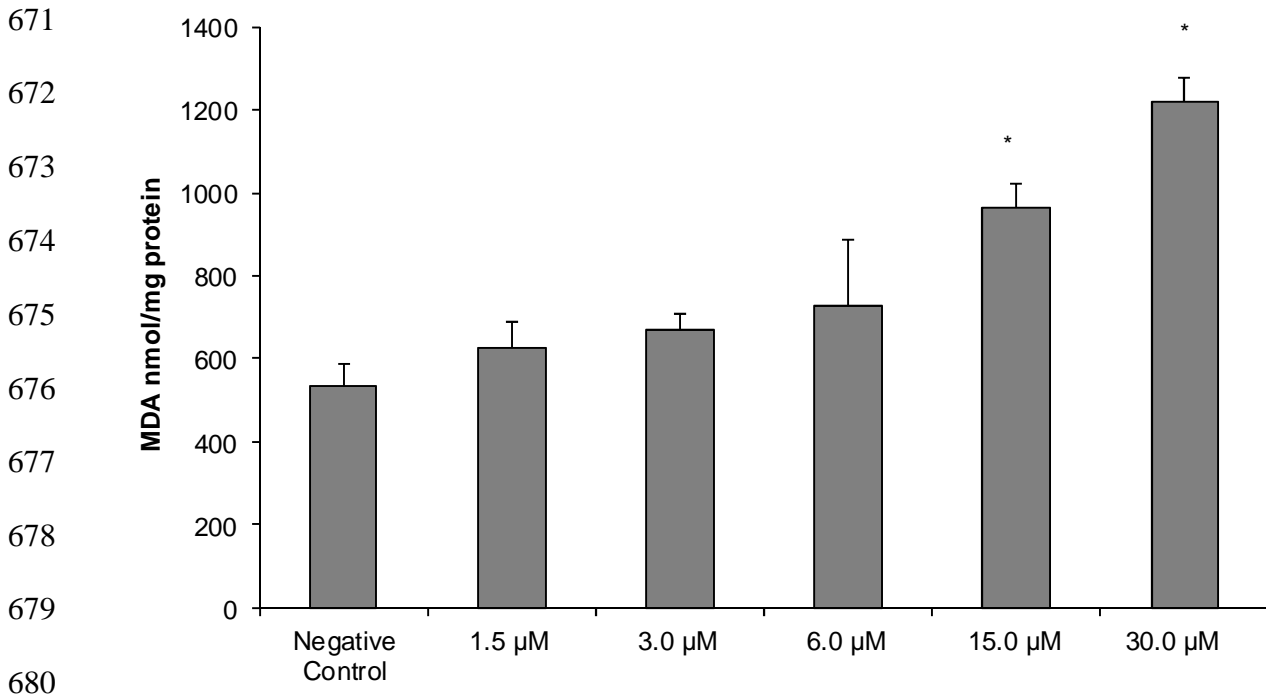


Figure 6. Mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production in trypanomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol for up to 3 h. Mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production was evaluated using the fluorescent probe MitoSOX. Results are expressed as mean fluorescence (in arbitrary units) \pm SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group as identified by variance analysis (two-way) with Tukey post-test ($p \leq 0.05$).



681 **Figure 7.** Determination of lipid peroxidation in trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*
682 treated with elatol in different concentrations for 3 h. The MDA concentration was measured
683 by TBARS production. The results are expressed as mean \pm SD of at least three independent
684 experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group as
685 identified by variance analysis (one-way) with Tukey post-test ($p \leq 0.05$).

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

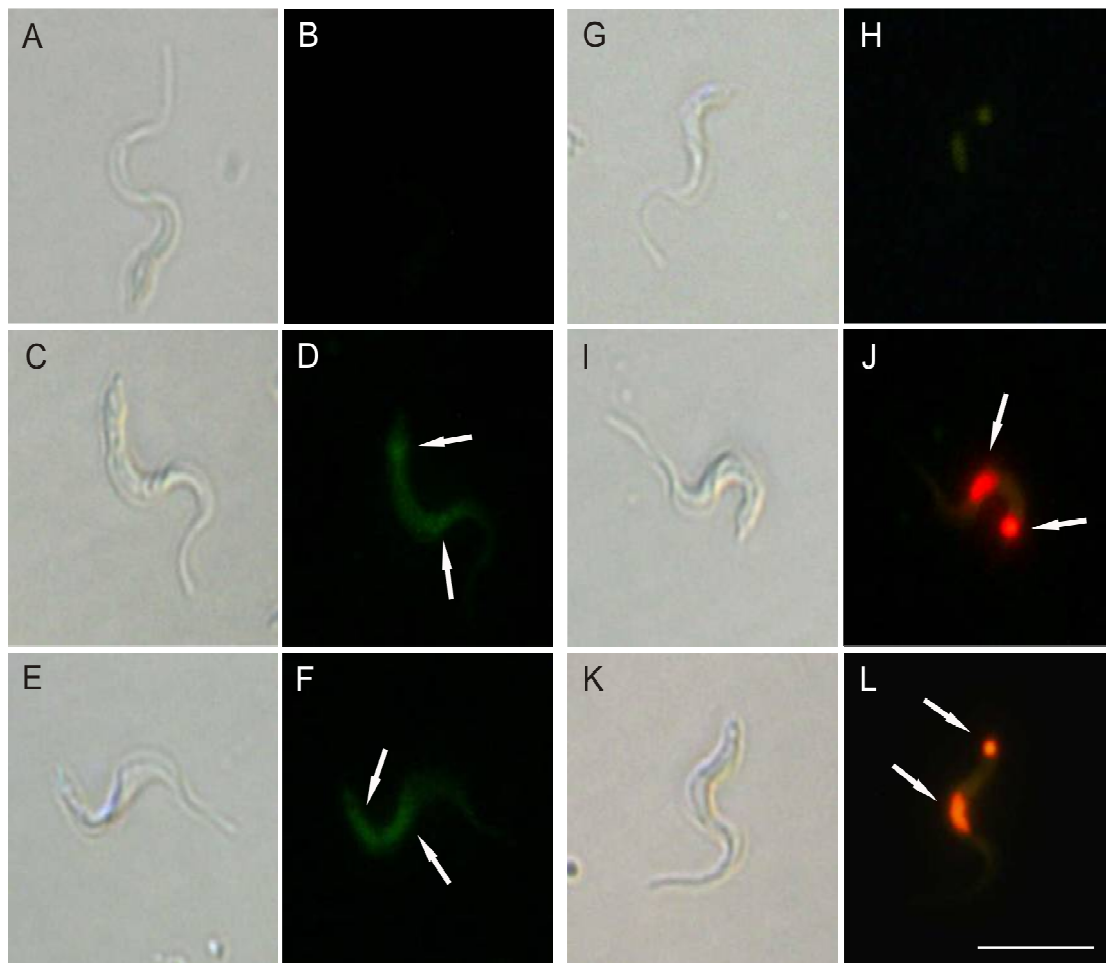
705

706

707

708

709



710

Figure 8. DNA fragmentation in trypanosomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with

711

elatol for 24 h. TUNEL assay (panels A, B, C, D, E, F) and PI (panels G, H, I, J, K, L)

712

staining were analyzed by fluorescence microscope. Gray column is phase contrast and black

713

column is fluorescence. (A, B, G, H) Representative images of untreated cells. (C, D, I, J)

714

Representative images of trypanosomastigotes treated with 1.5 μ M. (E, F, K, L) Representative

715

images of trypanosomastigotes treated with 3.0 μ M. Arrows indicate DNA fragmentation (green)

716

and condensation and margination of chromatin (red). Bars: 10 μ m.

717

718

719

720

721

722

723

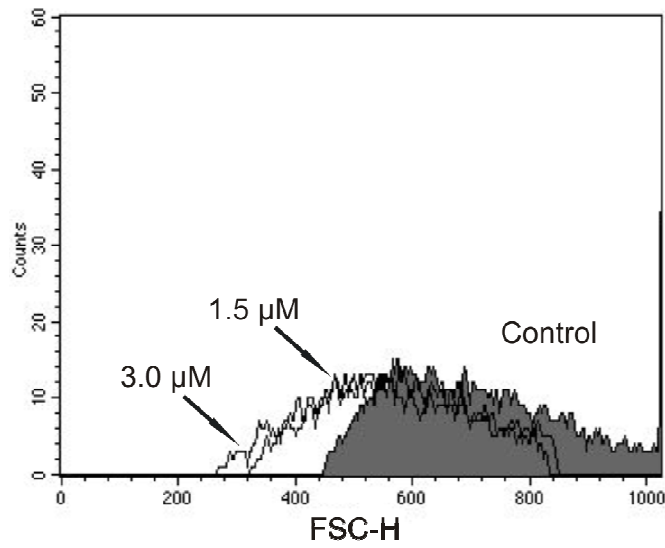
724

725

726

727

728



729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

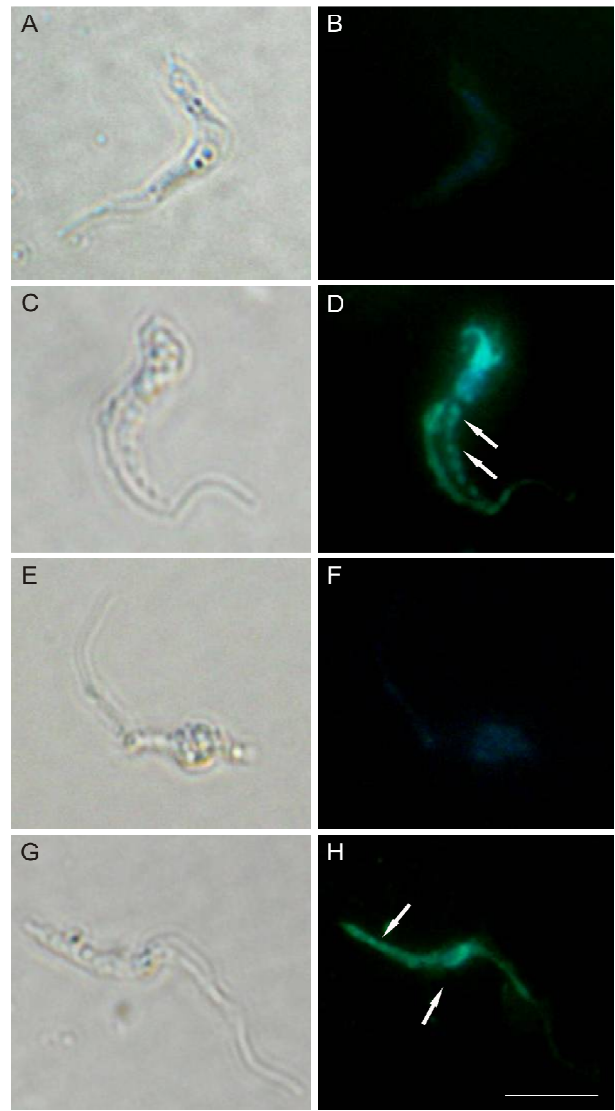
743

744

745

Figure 9. Flow cytometry analysis of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated with elatol for 24 h. Forward light scatter (FSC-H) was considered as function of cell size. Representative FACS histogram showing FSC-H of trypomastigotes treated with 1.5 μ M and 3.0 μ M and untreated cells (gray full histogram). Typical histograms of at least three independent experiments.

746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761



762 **Figure 10.** Determination of autophagy in trypanomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* treated
763 with elatol for 24 h and stained with MDC. Gray column is phase contrast and black column
764 is fluorescence. (A, B) Representative fluorescence image of untreated cells. (C, D)
765 Representative image of trypanomastigotes treated with 1.5 μ M. (E, F) Representative image of
766 trypanomastigotes treated with 1.5 μ M + wortmannin. (G, H) Representative image of
767 trypanomastigotes treated with 3.0 μ M. Arrows indicate the stained autophagic structures. Bars:
768 10 μ m.

769

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos até aqui, observamos que a ação tripanocida do elatol envolve múltiplos eventos que culminam com a morte de *T. cruzi* (Fig. 2). Assim, na tentativa de elucidar este mecanismo criamos uma hipótese orientada a partir das alterações mitocondriais, que em seguida determinaria caminhos bioquímicos distintos induzindo tipos diferentes de morte celular.

Assim, a alteração no potencial de membrana mitocondrial e o aumento na produção de ânion superóxido, poderiam ser responsáveis pela oxidação de lipídeos de membrana, seguida de perda da integridade da membrana celular. Estes eventos são sinais clássicos de morte celular por necrose.

Da mesma forma o aumento de ânion superóxido poderia induzir ainda a fragmentação de DNA, uma característica de apoptose e também de necrose. Adicionalmente, como um sinal confirmatório de apoptose descrevemos a diminuição do volume celular.

Por último, a formação de vacúolos autofágicos evidenciaria a morte celular por autofagia.

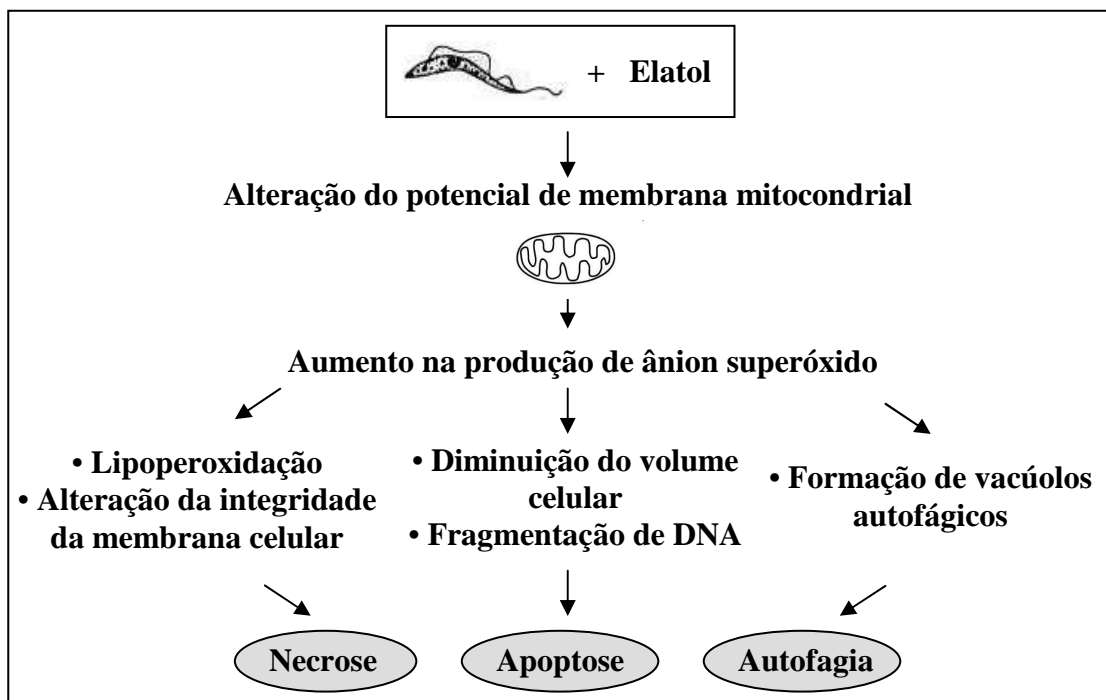


Figura 2. Possíveis mecanismos da atividade tripanocida do elatol. Indução de tipos diferentes de morte celular a partir da disfunção mitocondrial.