



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO TRIPANOCIDA DO (-)-ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y
DE *Trypanosoma cruzi*

RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES

FORTALEZA

2017

RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES

**EFEITO TRIPANOCIDA DO (-)-ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y
DE *Trypanosoma cruzi***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

FORTALEZA

2017

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

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

M513e Menezes, Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de.
EFEITO TRIPANOCIDA DO (-)-ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y DE Trypanosoma
cruzi / Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes. – 2017.
138 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

1. Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. (-)-alfa-Bisabolol. 4. Apoptose. 5.
GAPDH. I. Título.

CDD 615.1

RAMON RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES

**EFEITO TRIPANOCIDA DO (-)-ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y
DE *Trypanosoma cruzi***

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Farmacologia,
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza, ____ de _____ de 2017.

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

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará – UFC

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

Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

À minha mãe, Sâmia, pelo amor incondicional em todos os momentos, e por me ensinar que esse é o sentimento que vale a pena ter.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me proporcionar a oportunidade de fazer algo que eu amo tanto: produzir ciência.

A minha mãe, por me mostrar como amor é algo ser multiplicado e por estar ao meu lado sempre.

A meu pai, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A minha irmã, por torcer por mim e acreditar nos meus projetos.

Aos meus avós e tios, pelo carinho e torcida, mesmo sem entender muito bem o que eu faço.

Ao Tiago, por ser um companheiro de vida e de trabalho para todas as horas.

À professora Alice, minha orientadora. Toda a confiança, apoio e aprendizado que tive com a senhora estará sempre na minha memória. A convivência com a senhora me fez uma pessoa e um pesquisador melhor.

A todos os meus amigos, que participaram do meu trajeto até aqui e continuarão participando. Por conta de vocês, tive forças em muitos momentos.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelo suporte e por ter paciência comigo e com todos os alunos.

À CAPES, pelo suporte financeiro fornecido para a realização desse trabalho.

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

Um agradecimento muito especial à coordenação e secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC, por me abrigar durante todos esses anos. Saibam que me sinto em minha segunda casa nesse departamento.

Aos amigos e companheiros de laboratório, que tem me ajudado de maneira tão importante: Tiago, Louise, Jáder, Alba, Ticiane, Isabel, Izabel, Clarissa, Paloma, Racquel, Gdayllon, Marcus, Gabriela, Lívia, Dânya, Rodrigo, Luiza, Marília, Isabella, Brenna, Kamilla e Emanuel. Obrigado por sermos uma equipe e por trabalharmos e crescermos juntos.

Ao professor Ricardo Santos e à doutoranda Márcia, pela realização do estudo de docking.

À Denise, Thamires, Clébia, Cláudio, Kadja, Raquel, Nathália e Thaís, por serem profissionais e amigos tão competentes, e por estarem me permitindo o prazer de crescer junto a eles.

À Kelly, Mariana, Gabrieli, Ticianá, Lana, Andréa, Darcielle, André, Emiliano, Sílvia, Allen, Rosi, Musse, Isabelle e Ana Cláudia, pelo companheirismo profissional e torcida sempre.

A todos os demais que, da sua maneira, torceram pelo meu sucesso e me impulsionaram a perseguir meus objetivos pessoais e profissionais, meu muito obrigado.

“Lembre-se de que sonhos sem riscos produzem conquistas sem méritos.”

Augusto Curry

RESUMO

A doença de Chagas constitui um importante problema de saúde pública, e os fármacos disponíveis para tratamento apresentam eficácia limitada e efeitos colaterais importantes. Assim, há necessidade de novas estratégias terapêuticas eficazes e seguras. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial tripanocida do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e investigar sua seletividade e mecanismo de ação. A citotoxicidade de BIS foi avaliada em células LLC-MK2 pelo método do MTT. BIS causou efeito citotóxico nas duas maiores concentrações testadas, com $CC_{50} = 528 \pm 34 \mu\text{M}$. Foi investigado o efeito de BIS sobre epimastigotas, que demonstrou efeito progressivo e dependente de tempo e concentração, com $IC_{50}/24\text{h} = 285 \pm 20 \mu\text{M}$; $IC_{50}/48\text{h} = 144,7 \pm 8,6 \mu\text{M}$; $IC_{50}/72\text{h} = 97,33 \pm 3,25 \mu\text{M}$; e $IC_{50}/96\text{h} = 59,8 \pm 4,5 \mu\text{M}$. Em tripomastigotas, BIS causou efeito em todas as concentrações, com $LC_{50} = 20 \pm 3,84 \mu\text{M}$. A partir dos valores de CC_{50} e LC_{50} obtidos, foi estimado índice de seletividade de 26,5. BIS também apresentou efeito anti-amastigota, com redução do percentual de células infectadas, da contagem média de amastigotas/células infectadas e do índice de sobrevivência. Além disso, foi observado efeito antiparasitário em pequenos períodos de tempo, através do ensaio de recuperação de crescimento. Por citometria de fluxo, foram observadas alterações sugestivas de morte celular por apoptose, com aumento das espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas e redução do potencial transmembrânico mitocondrial. Adicionalmente, foi observado hipertrofia de reservossomos de forma tardia. Por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas algumas alterações ultraestruturais, como alteração no formato típico e aparecimento de poros. Finalmente, foi avaliado o potencial de inibição da enzima *tcGAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*). O estudo de *docking* demonstrou possível interação entre BIS e o sítio catalítico de *tcGAPDH*. A confirmação foi realizada por ensaio colorimétrico. Em conclusão, o (-)- α -bisabolol apresenta efeito antiparasitário sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*, com possível indução de apoptose e stress oxidativo. Além disso, a inibição da enzima *tcGAPDH* parece estar associada ao efeito biológico encontrado.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; (-)- α -bisabolol; apoptose; GAPDH.

ABSTRACT

TRYPANOCIDAL EFFECT OF (-)-ALPHA-BISABOLOL OVER *Trypanosoma cruzi* STRAIN Y

Chagas disease is a major public health problem, and the drugs available possess limited efficacy and great toxicity. In this way, there is a pungent need of new drugs. The aim of this work was to evaluate the trypanocidal effect of (-)- α -bisabolol (BIS) over the life forms of *Trypanosoma cruzi* and investigate its selectivity and mechanism of action. BIS cytotoxicity over mammalian cells was evaluated over LLC-MK2 cells, using MTT assay. BIS caused cytotoxic effect only at 1000 and 500 μM , with $\text{CC}_{50} = 528 \pm 34 \mu\text{M}$. Then the antiparasitic effect was investigated over epimastigote, which demonstrated a progressive and time- and concentration-dependent effect, with $\text{IC}_{50}/24\text{h} = 285 \pm 20 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}/48\text{h} = 144.7 \pm 8.6 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}/72\text{h} = 97.33 \pm 3.25 \mu\text{M}$; e $\text{IC}_{50}/96\text{h} = 59.8 \pm 4.5 \mu\text{M}$. Over trypomastigotes, BIS caused effect at all tested concentrations, with $\text{LC}_{50} = 20 \pm 3.84 \mu\text{M}$. Using CC_{50} and LC_{50} values, selectivity index was estimated at 26.5. BIS also presented anti-amastigote activity, with decrease on the percentage of infected cells, the number of amastigotes per infected cells and survival index. Besides, BIS caused its effects even when incubated by few time periods, as shown by growth recovery experiments. By flow cytometry, it was demonstrated that BIS trypanocidal effect was associated with apoptosis induction, increase on reactive oxygen species and loss of mitochondrial transmembrane potential. Also, swelling of reservosomes was present at late stages. Scanning electronic microscopy evaluation showed parasites with loss of typical format and with membrane pores. Finally, the interaction of BIS with *tcGAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *T. cruzi*) was evaluated by both theoretical and experimental methods. Docking simulation demonstrated possible interaction between *tcGAPDH* and BIS, which it was confirmed by enzymatic assay. In conclusion, it was demonstrated that BIS possess antiparasitic effect over *Trypanosoma cruzi* strain Y life forms, with possible induction of apoptosis and oxidative stress. Also, inhibition on *tcGAPDH* appears to be associated with this effect.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; (-)-alpha-bisabolol; apoptosis; *tcGAPDH*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição mundial de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> nos anos de 2006 a 2009.	24
Figura 2	– Diferenças morfológicas entre os triatomíneos.	26
Figura 3	– Diferenciação morfológica entre os insetos dos gêneros <i>Triatoma</i> sp., <i>Panstrongylus</i> sp. e <i>Rhodnius</i> sp.	27
Figura 4	– Principais vetores da doença de Chagas no Brasil.	27
Figura 5	– Principais formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	30
Figura 6	– Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	31
Figura 7	– Interação do <i>Trypanosoma cruzi</i> com células hospedeiras.	32
Figura 8	– Interação do <i>Trypanosoma cruzi</i> com seus hospedeiros invertebrados.	33
Figura 9	– Localização das organelas e estruturas celulares nas formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	34
Figura 10	– Sinais característicos da transmissão vetorial da doença de Chagas.	38
Figura 11	– Leitura e interpretação da hemaglutinação indireta para diagnóstico sorológico da doença de Chagas.	41
Figura 12	– Representação esquemática da reação de imunofluorescência indireta.	42
Figura 13	– Estrutura química do nifurtimox e do benzonidazol.	44
Figura 14	– Diferenças entre o fenótipo de alterações observadas nos mecanismos de morte celular por necrose, apoptose e autofagia.	47

Figura 15	–	Reações biológicas mediadas por tripanotona.	49
Figura 16	–	Reação enzimática catalisada pela GAPDH.	50
Figura 17	–	Visão geral da biossíntese de terpenos nas plantas.	52
Figura 18	–	Enantiômeros do bisabolol.	53
Figura 19	–	Fotomicrografia de células LLC-MK2 em estado de confluência. Escala de 100 μ M.	58
Figura 20	–	Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer.	59
Figura 21	–	Representação esquemática do procedimento de plaqueamento e tratamento de células LLC-MK2 para análise de viabilidade celular.	60
Figura 22	–	Ensaio de redução do MTT.	61
Figura 23	–	Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	63
Figura 24	–	Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas.	67
Figura 25	–	Princípio de análise celular por citometria de fluxo.	68
Figura 26	–	Princípio da marcação dos fluorocromos.	69
Figura 27	–	Protocolo de processamento das amostras para análise de necrose e apoptose por citometria de fluxo.	70
Figura 28	–	Princípio de reação da 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) com espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.	71
Figura 29	–	Procedimento experimental para marcação de formas epimastigotas com diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA).	72

Figura 30	– Estrutura química da rodamina 123.	73
Figura 31	– Mecanismo de marcação mitocondrial utilizando a rodamina 123 (Rho123).	74
Figura 32	– Protocolo de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo.	75
Figura 33	– Estrutura química da laranja de acridina.	76
Figura 34	– Protocolo experimental de marcação de reservossomos de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e avaliação por citometria de fluxo.	76
Figura 35	– Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.	77
Figura 36	– Processamento e análise de amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> por microscopia eletrônica de transmissão.	78
Figura 37	– Ensaio de bloqueio da atividade farmacológica do (-)- α -bisabolol com catalase.	79
Figura 38	– Efeito citotóxico do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre células hospedeiras LLC-MK2, avaliado pelo método do MTT.	82
Figura 39	– Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y.	84
Figura 40	– Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y após 24 horas de incubação.	86
Figura 41	– Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota do (-)- α -bisabolol.	89
Figura 42	– Efeito anti-amastigota <i>in vitro</i> do (-)- α -bisabolol.	90

Figura 43	– Ensaio de recuperação de crescimento de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após incubação com (-)- α -bisabolol.	92
Figura 44	– Potencial apoptótico do (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	95
Figura 45	– Perfil de morte celular induzido por (-)-bisabolol (285 μ M), avaliado por citometria de fluxo.	96
Figura 46	– Histograma de intensidade de marcação com DCFH-DA.	98
Figura 47	– Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre o a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.	99
Figura 48	– Histogramas de intensidade de marcação com Rho123.	100
Figura 49	– Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	101
Figura 50	– Histogramas de intensidade de marcação com AO.	102
Figura 51	– Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre os reservossomos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	103
Figura 52	– Alterações ultraestruturais induzidas por (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	105
Figura 53	– Acoplamento molecular teórico do (-)- α -bisabolol sobre a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> por <i>docking</i> molecular.	107
Figura 54	– Efeito inibitório do (-)- α -bisabolol sobre a atividade enzimática da GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos casos de doença de Chagas aguda no Brasil pela forma de transmissão, no período de 2000 a 2013.	28
Tabela 2 –	Viabilidade celular (média ± EPM) das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).	83
Tabela 3 –	Viabilidade celular (média ± EPM) das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).	85
Tabela 4 –	Viabilidade celular (média ± EPM) das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).	87
Tabela 5 –	Resumo da atividade biológica <i>in vitro</i> do (-)- α -bisabolol sobre células LLC-MK2 e formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y.	88
Tabela 6 –	Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade anti-mastigota <i>in vitro</i> do (-)- α -bisabolol.	91
Tabela 7 –	Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas após 1 e 2 horas de incubação com BIS.	93
Tabela 8 –	Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas após 15 e 30 minutos de incubação com BIS.	94
Tabela 9 –	Percentual de eventos no ensaio de avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo.	97
Tabela 10 –	Intensidade relativa de fluorescência dos experimentos de citometria usando os marcadores DCFH-DA, Rho123 e AO.	104
Tabela 11 –	Ensaio de avaliação da influência de H ₂ O ₂ sobre o efeito antiparasitário de (-)- α -bisabolol.	106

Tabela 12 – Atividade enzimática de *tc*GAPDH após tratamento com (-)- α -bisabolol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomycin D
A	Oxidantes de um elétron
Å	Angstrom
AMAST	Amastigotas
AO	Laranja de acridina
APx	Peroxidase dependente de ascorbato
Asc	Ascorbato
ASN	Asparagina
ATP	Trifosfato de adenosina
Ax/PE	Anexina V marcada com ficoeritrina
BIS	(-)- α -bisabolol
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BZ	Benzonidazol
CC ₅₀	Concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células
CoA	Coenzima A
CYS	Cisteína
DC	Doença de Chagas
DCF	Forma oxidada de 2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH	Forma reduzida de 2'-7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA	Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína
dhAsc	Dehidroascorbato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPI	Epimastigotas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FDA	Food and Drug Administration
FSC	Foward Scatter
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Typaredoxin peroxidase glutationa peroxidase-like
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPG2	Linhagem de células de câncer hepático humano
HIS	Histidina
HMGCoA	Hidróxi-metilglutaril Coenzima A

IC ₅₀	Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% de epimastigotas
ILE	Isoleucina
kDNA	DNA do cinetoplasto parasitário
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LC ₅₀	Concentração capaz de matar 50% de tripomastigotas
LLC-MK2	Células epiteliais renais de macaco
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
nDNA	DNA nuclear
NFX	Nifurtimox
NTP	National Toxicology Program
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pi	Fosfato inorgânico
R•	Radicais livres
Rho123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico
ROOH	Hidroperoxidases
RPM	Rotações por minuto
RR	Ribonucleotídeo redutase
SBF	Soro bovino fetal

SDS	Dodecilsulfato de sódio
Sel	Índice de seletividade
SER	Serina
SSC	Side Scatter
Sul	Índice de sobrevivência
SUS	Sistema Único de Saúde
T(SH) ₂	Tripanotiona
<i>tc</i> GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase específica de <i>T. cruzi</i>
TRIPO	Tripomastigotas
TryR	Tripanotiona redutase
TSCA	Toxic Substances Control Act
TXN	Tryparedoxin
TXNPx	Tryparedoxin peroxidase
UFC	Universidade Federal do Ceará
USP	Universidade de São Paulo
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrânico mitocontrial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1	Histórico e epidemiologia da doença de Chagas	23
1.2	Vias de transmissão da doença de Chagas	25
1.2.1	Transmissão vetorial	25
1.2.2	Transmissão oral	28
1.2.3	Outras vias de transmissão	29
1.3	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.4	Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
1.4.1	Membrana plasmática	35
1.4.2	Flagelo e bolsa flagelar	35
1.4.3	Mitocôndria e cinetoplasto	35
1.4.4	Reservossomos	36
1.4.5	Glicossomos e acidocalcissomos	36
1.4.6	Complexo de Golgi e retículo endoplasmático	36
1.4.7	Núcleo	37
1.5	Evolução clínica da doença de Chagas	37
1.6	Diagnóstico clínico-laboratorial da doença de Chagas	39
1.7	Tratamento farmacológico da doença de Chagas	43
1.8	Novos alvos farmacológicos na pesquisa de substâncias tripanocidas	45

1.8.1.	Mecanismos de morte celular	46
1.8.2.	Via glicolítica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
1.8.3.	Mecanismos antioxidantes	50
1.9	Óleos essenciais, terpenos e terpenoides como Fonte de novos fármacos	51
1.10	(-)-α-Bisabolol	53
2.	JUSTIFICATIVA	55
3.	OBJETIVOS	56
3.1	Objetivo geral	56
3.2	Objetivos específicos	56
4.	Materiais e métodos	57
4.1	(-)-alfa-Bisabolol e benzonidazol	57
4.2	Avaliação da citotoxicidade do (-)-alfa-bisabolol em células hospedeiras	57
4.2.1.	Cultivo e manutenção das células LLC-MK2	57
4.2.2.	Avaliação do efeito do BIS sobre células LLC-MK2	58
4.3	Avaliação da atividade do BIS sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	62
4.3.1.	Cultivo e manutenção das formas epimastigotas	62
4.3.2.	Avaliação do efeito do bisabolol em formas epimastigotas	62
4.4	Ensaio com formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	64
4.4.1.	Obtenção e de formas tripomastigotas	64

4.4.2.	Avaliação do efeito do BIS sobre formas tripomastigotas	64
4.5	Avaliação do efeito do BIS sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	65
4.6	Ensaio de recuperação de crescimento	66
4.7	Análises por citometria de fluxo	67
4.7.1.	Marcação com Anexina V/PE e 7-AAD	69
4.7.2.	Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas	71
4.7.3.	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	73
4.7.4.	Avaliação da tumefação de reservossomos	75
4.8	Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura	77
4.9	Bloqueio da atividade antiparasitária do BIS com catalase	79
4.10	Investigação da inibição da enzima gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH)	79
4.10.1.	Avaliação da inibição enzimática <i>in vitro</i>	79
4.10.2.	<i>Docking</i> molecular	80
4.11	Análise estatística	81
5.	RESULTADOS	82
5.1	Avaliação da citotoxicidade do (-)-α-bisabolol em células hospedeiras LLC-MK2	82
5.2	Efeito antiparasitário do (-)-α-bisabolol sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	83

5.3	Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	85
5.4	Efeito anti-amastigota do (-)- α -bisabolol	88
5.5	Recuperação de crescimento	91
5.6	Avaliação do perfil de morte celular	95
5.7	Medida de EROs citoplasmáticas por citometria de fluxo	97
5.8	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	99
5.9	Análise da hipertrofia de reservossomos	101
5.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	104
5.11	Avaliação da influência de H ₂ O ₂ no efeito antiparasitário do BIS	105
5.12	Inibição da enzima GAPDH <i>in vitro</i>	106
5.13	<i>Docking</i> molecular	107
6	DISCUSSÃO	109
7	CONCLUSÃO	120
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) foi inicialmente descrita em 1909, pelo médico mineiro e pesquisador da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) Carlos Chagas, ao observar no município de Lassence, em Minas Gerais, presença abundante de barbeiros nas casas de pau-a-pique típicas da região. Nesses insetos, Carlos Chagas identificou um protozoário desconhecido, denominando-o *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. Dessa forma, esse pesquisador descobriu e identificou não somente o parasito, mas também seu vetor, além de caracterizar a apresentação clínica da doença (MALAFAIA; RODRIGUES, 2010), sendo esse feito conhecido como “a tripla descoberta de Chagas”.

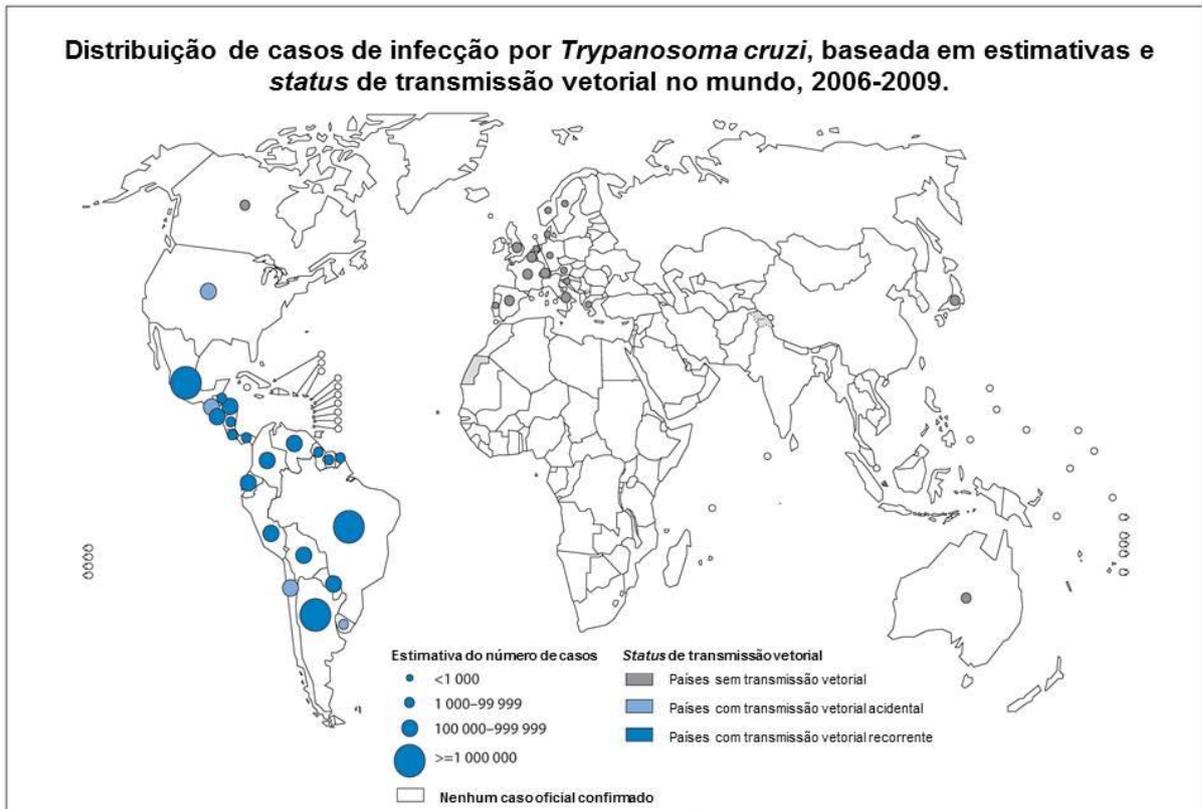
Apesar da data de seu descobrimento, existem registros que datam de quase 10 milhões de anos, demonstrando a presença de vetores da DC em ambientes habitados pelo homem ou por outros mamíferos. Além disso, foi identificado DNA (ácido desoxirribonucleico) proveniente de *Trypanosoma cruzi* em múmias encontradas no Chile e Peru, com aproximadamente 9 milhões de anos de idade (WHO, 2017a).

Acredita-se que as atividades agrícolas e a domesticação de animais tenham sido fatores importantes na aproximação entre o homem e os vetores, facilitando a infecção acidental. Com a invasão do homem no ecossistema e o desmatamento, houve uma migração e adaptação dos vetores ao ambiente peridomiciliar, aumentando o contato desses insetos com o homem. Dessa forma, a DC deixou de ser uma doença característica somente da zona rural (COURA, 2007).

Segundo a OMS, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* no mundo. Em especial, a população da América Latina representa o maior percentual de indivíduos contaminados, com 21 países endêmicos: Argentina, Belize, Bolívia, Venezuela, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Uruguai. Nesses países, a doença configura um dos problemas de saúde mais críticos, responsáveis por altos níveis de mortalidade (WHO, 2017b). A DC é considerada uma das 13 doenças

negligenciadas do mundo, as quais prejudicam o desenvolvimento socioeconômico das populações pobres (RASSI; MARIN-NETO, 2010). A figura 1 demonstra a distribuição mundial da DC.

Figura 1 – Distribuição mundial de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* nos anos de 2006 a 2009.



Fonte: WHO, 2009.

Entretanto, a migração de pessoas das regiões endêmicas tem provocado o aparecimento de casos da DC em regiões não-endêmicas (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Alguns casos da doença tem sido identificados na América do Norte, Europa e Japão (SCHMUNIS; YADON, 2010). Dente esses locais, os Estados Unidos representam o maior número de casos, devido ao grande número de imigrantes de origem latina, como Bolívia, Brasil e México (ORTÍ-LUCAS et al., 2014).

No Brasil, foi realizado em 2015 o II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas, apresentando dados epidemiológicos importantes sobre a doença. A América Latina contou em 2010 com 3.581.423 casos de DC, referente a 62,4% dos casos mundiais. Dentro desse grupo, o Brasil aparece em segundo lugar, com 1.156.821 de casos, perdendo apenas para a Argentina, com 1.505.235 de doentes (DIAS et al., 2016). Ainda segundo esse consenso, vários fatores contribuem para a disseminação da doença, como a dificuldade de acesso das populações rurais aos serviços de saúde, a degradação do meio ambiente, a precariedade das condições sanitária e de moradia das regiões afetadas e a migração humana descontrolada.

No Brasil, os casos de DC aguda confirmados foram monitorados e publicados pelo Ministério da Saúde. De 2000 a 2013, foram notificados 1570 novos casos da doença. Desse grupo, a região Norte aparece em primeiro lugar, com 91,1% dos casos, seguida da região Nordeste (4,6%), Sudeste (0,8%), Sul (1,8%) e Centro-Oeste (1,7%) (BRASIL, 2015). É importante ainda ressaltar que, em muitos casos, a doença não é identificada na fase aguda e só será diagnosticada após o desenvolvimento das complicações crônicas. Além disso, deve-se levar em consideração a subnotificação, significando que o número real de casos deva ser bem maior do que o apontado nos boletins epidemiológicos (CORRÊA et al., 2014).

Apesar das estratégias de controle e tratamento da DC desempenhadas no Brasil, os níveis de mortalidade permanecem altos, principalmente na terceira idade. Em 2014, foi publicado estudo apresentando dados sobre mortalidade da doença, onde foi observado valores maiores para indivíduos do sexo masculino e com mais de 60 anos. Nesse estudo, foi observada maior mortalidade na região Centro-Oeste, com 182,2 óbitos para cada 100.000 habitantes (CORRÊA et al., 2014).

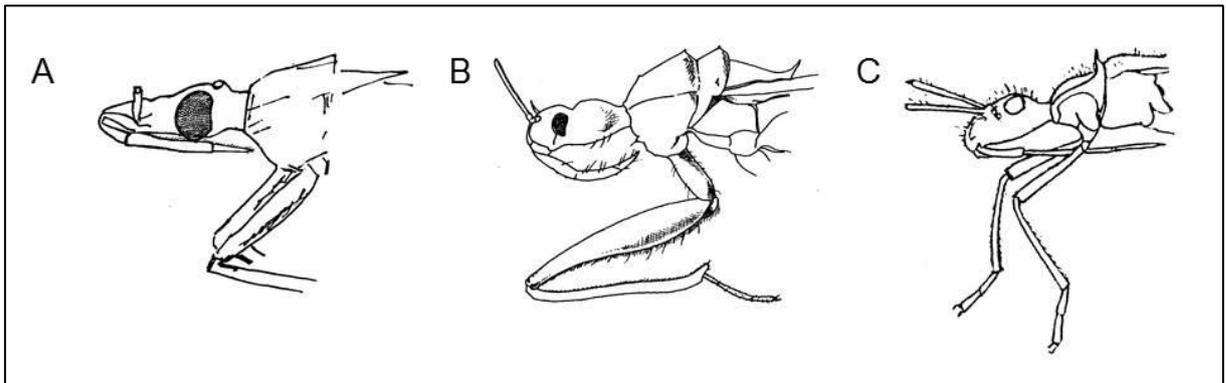
1.2 Vias de transmissão da doença de Chagas

1.2.1. Transmissão vetorial

A transmissão vetorial da doença de Chagas é a forma mais clássica de contágio, sendo o homem um hospedeiro acidental. Por essa via, o *T. cruzi* é transmitido por triatomíneos, insetos hemípteros da família *Reduviidae*. Os hemípteros podem ser divididos em 3 grupos, de acordo com seus hábitos

nutricionais: fitófagos, predadores e hematófagos. Apenas os insetos hematófagos estão associados à doença de Chagas (SHERLOCK, 2000). A diferenciação entre eles é realizada por avaliação morfológica do aparelho bucal, conforme está descrito na figura 2.

Figura 2 – Diferenças morfológicas entre os triatomíneos.



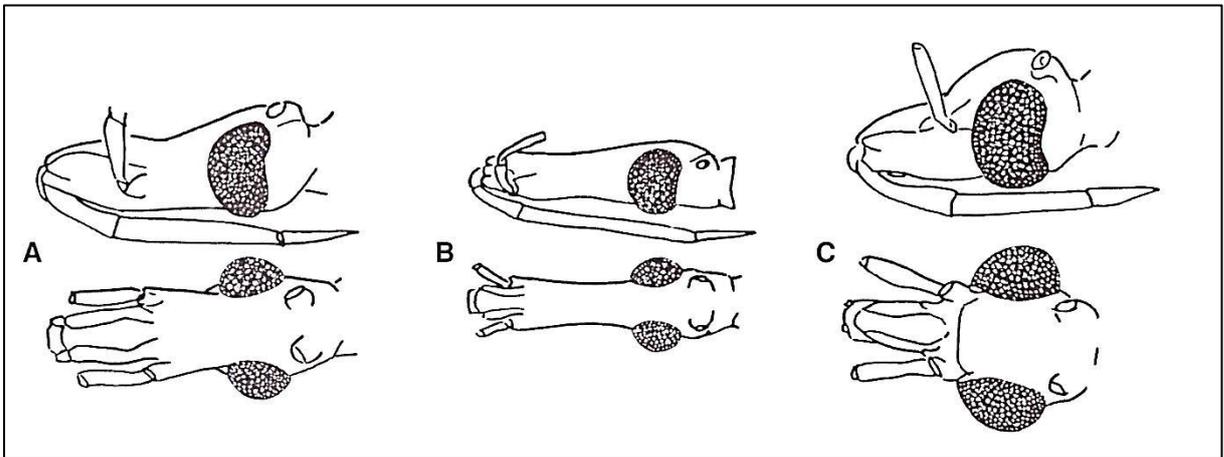
Legenda: (A) Inseto hematófago, apresentando aparelho bucal reto e que não ultrapassa o primeiro par de patas; (B) predador, com aparelho bucal curvo e curto; e (C) fitófago, com aparelho bucal reto e que ultrapassa o primeiro par de patas.

Fonte: Adaptado de http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab_triato/Triatomineos Figura1.html.

Os triatomíneos medem entre 1,6 e 44 mm na fase adulta, com fêmeas geralmente maiores do que machos. Possuem cabeça coniforme e corpo com coloração variada, do negro ao palha-claro, apresentando manchas e desenhos em sua superfície (JURBERG et al., 2014). Embora todas as espécies de triatomíneos sejam potencialmente vetoras de *T. cruzi*, três gêneros constituem os de maior importância médica: *Triatoma* sp., *Panstrongylus* sp. e *Rhodnius* sp. (BRASIL, 2015) Macroscopicamente, pode ser realizada a diferenciação entre esses três gêneros, a partir das diferenças na localização de suas antenas (figura 3).

No Brasil, os triatomíneos recebem alguns nomes populares, como barbeiro, bicho-de-parede, bicudo, borrachudo, cafote, chupa-pinto, chupança, chupão, fincão, furão, percevejo, percevejo de cama, percevejo-do-sertão, percevejão, piolho da piaçava, procotó, vum-vum e tampa-de-alforje (SHERLOCK, 2000). As espécies de maior importância clínica no país são *Triatoma infestans*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (figura 4).

Figura 3 – Diferenciação morfológica entre os insetos dos gêneros *Triatoma* sp., *Panstrongylus* sp. e *Rhodnius* sp.



Legenda: (A) Gênero *Triatoma* sp., com antenas inseridas entre a extremidade e os olhos; (B) gênero *Rhodnius* sp., com inserção das antenas na extremidade da cabeça; e (C) gênero *Panstrongylus* sp., com inserção das antenas bem próxima aos olhos.

Fonte: SHERLOCK (2000).

Figura 4 – Principais vetores da doença de Chagas no Brasil.



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

A transmissão vetorial da DC acontece durante o repasto sanguíneo, período em que o inseto defeca sobre a pele do indivíduo. Dessa forma, ao coçar o local da picada, o indivíduo se infecta com as formas de *T. cruzi*, que chegam à corrente sanguínea. Essa via de transmissão está comumente associada ao

ambiente rural, bem como as residências de madeira e barro. Originalmente, o *Triatoma infestans* era o principal vetor. Entretanto, na década de 40 e 50 houve um intenso programa de erradicação desse inseto, bem como de melhorias domiciliares. Isso provocou uma drástica redução na densidade populacional dessa espécie de barbeiro.

1.2.2. Transmissão oral

A transmissão oral da DC tem emergido como uma causa importante de novos casos. Vários autores têm descrito e tentado explicar o aparecimento desses casos. Em geral, está associado ao consumo de alimentos provenientes de áreas endêmicas, contaminados com barbeiros ou suas fezes (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). Esse tipo de contaminação está associado a surtos da doença em regiões específicas, provocando uma forma clínica bastante agressiva da doença.

Nos últimos anos, tem sido observado vários surtos de doença de Chagas aguda causada por contaminação de alimentos no Brasil. Conforme mostrado na tabela 1, essa via de transmissão tem sido emergente nas últimas duas décadas. Esse fato está associado a alguns fatores, como as mudanças de hábitos nutricionais da população, com a popularização de alimentos como o açaí e o cupuaçu (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017).

Tabela 1 – Distribuição dos casos de doença de Chagas aguda no Brasil pela forma de transmissão, no período de 2000 a 2013.

	Ano de notificação														Total	%
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	31	18	64	47	51	27	106	92	68	169	68	117	127	96	1081	68,9
Ignorada	10	6	11	8	9	3	8	59	24	34	36	61	49	54	372	23,7
Vetorial	-	-	1	1	1	-	4	4	11	16	25	10	8	20	100	6,4
Outras	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,7
Vertical	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	6	0,4
Total	41	24	75	56	61	30	118	156	104	220	131	190	188	176	1570	100,0

Fonte: BRASIL (2015).

1.2.3. Outras vias de transmissão

Vias de transmissão de menor frequência incluem: a transmissão vertical, transfusional e acidental. A transmissão vertical acontece de forma transplacentária e acontece em 2 a 8% das gestantes infectadas com *T. cruzi* (KOLLIKER-FRERS et al., 2016). Dessa forma, passa a ser uma fonte importante de novos casos da doença, mesmo que as formas clássicas de transmissão sejam controladas (RAIMUNDO; MASSAD; YANG, 2010).

A transmissão transfusional, assim como a causada por transplante de órgãos, deve ser controlada de forma rígida pelos órgãos responsáveis pela triagem de sangue, hemoderivados e órgãos. Segundo Wendel (2010), a transmissão de DC por transplantes sanguíneos corre o risco de ser negligenciada, uma vez que a maioria dos recursos e esforços tem sido direcionada ao controle de outras patologias transmissíveis por transfusão, como o HIV e as hepatites virais.

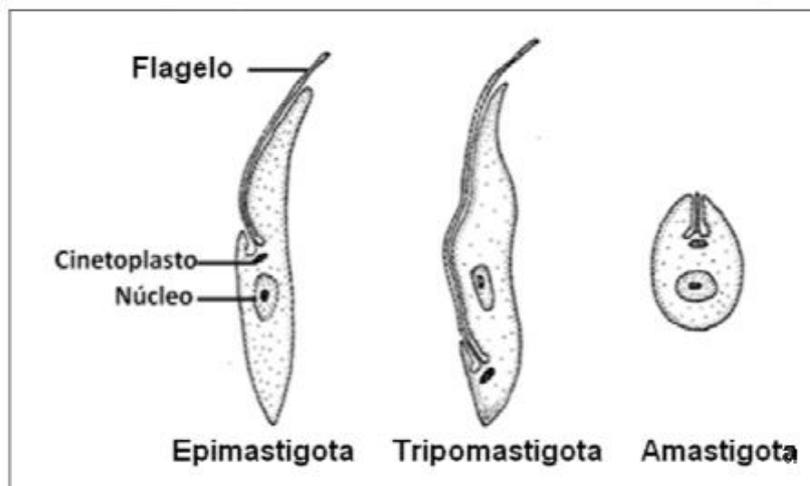
De forma acidental, estão expostos profissionais de saúde, bem como pesquisadores e outros profissionais que estejam em contato com o *T. cruzi* ou seus vetores. É importante que esses indivíduos sejam triados regularmente para avaliar seu nível de exposição. Além disso, deve estar disponível tratamento farmacológico adequado em caso da ocorrência de acidentes (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

1.3 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado do subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastidea* e família *Trypanosomatidae*. Possui um ciclo de vida que passa por dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (COSTA et al., 2011). Apresenta vários estágios de desenvolvimento, com 3 formas de vida principais: as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (figura 5). A diferenciação morfológica é realizada de acordo com formato, local de onde o flagelo e membrana ondulante emergem e posição do cinetoplasto (onde se encontra o DNA mitocondrial) em relação ao núcleo da célula.

As formas epimastigotas possuem formato alongado, com cinetoplasto localizado anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida. São encontradas no intestino dos triatomíneos, sendo as formas replicativas nesses hospedeiros. Os tripomastigotas são encontrados no intestino inferior dos triatomíneos, bem como nas suas fezes e na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. São formas não-replicativas, com formato alongado, cinetoplasto na sua extremidade posterior e flagelo longo com membrana ondulante. Por fim, as formas amastigotas são formas replicativas intracelulares encontradas nos hospedeiros vertebrados, apresentando formato esférico e ausência de flagelo exterior (SOUZA, 2009).

Figura 5 – Principais formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.

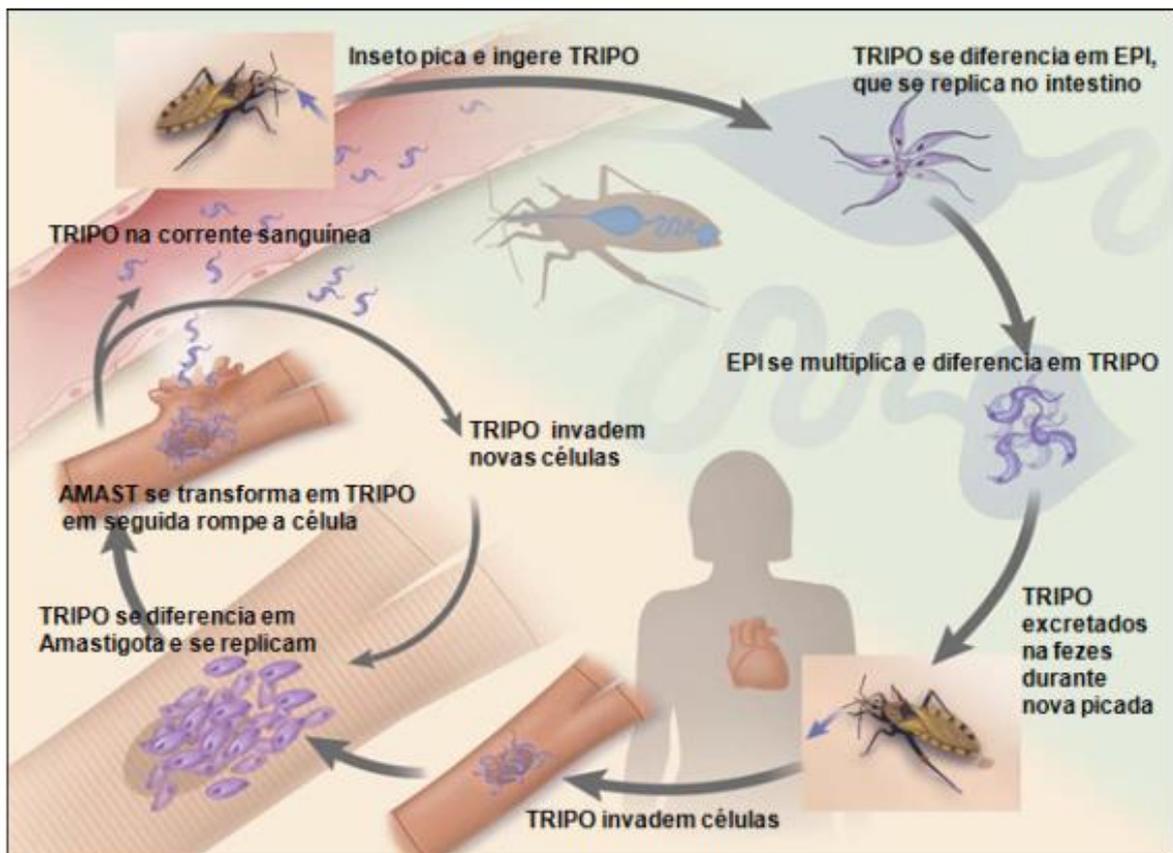


Fonte: Schuester; Sullivan (2002) *apud* PEREIRA (2015).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* que está apresentado de forma resumida na figura 6. O processo inicia com o repasto sanguíneo do triatomíneo infectado, quando formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* são depositadas na pele ou mucosa do indivíduo durante a defecação do inseto. Essas formas são altamente infectantes, capazes potencialmente de infectar quase qualquer tipo de célula de mamífero. Para isso, entram em contato com a membrana das células, induzindo um processo de formação de pseudópodos ou de uma depressão na superfície da membrana plasmática, causando internalização do parasito em um vacúolo, chamado vacúolo parasitóforo (SOUZA, 2000).

Em seguida, os lisossomos da célula hospedeira se fundem ao vacúolo parasitário, liberando suas enzimas. A partir daí, as formas tripomastigotas vão se diferenciando em amastigotas, enquanto o vacúolo se desfaz. As formas amastigotas ficam então em contato direto com o citoplasma celular, onde se reproduzem por mitose (BERN, 2015). Após ampla multiplicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, causando rompimento da célula e liberação de *T. cruzi* para o tecido intersticial e, por fim, para o sangue (Figura 7).

Figura 6 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



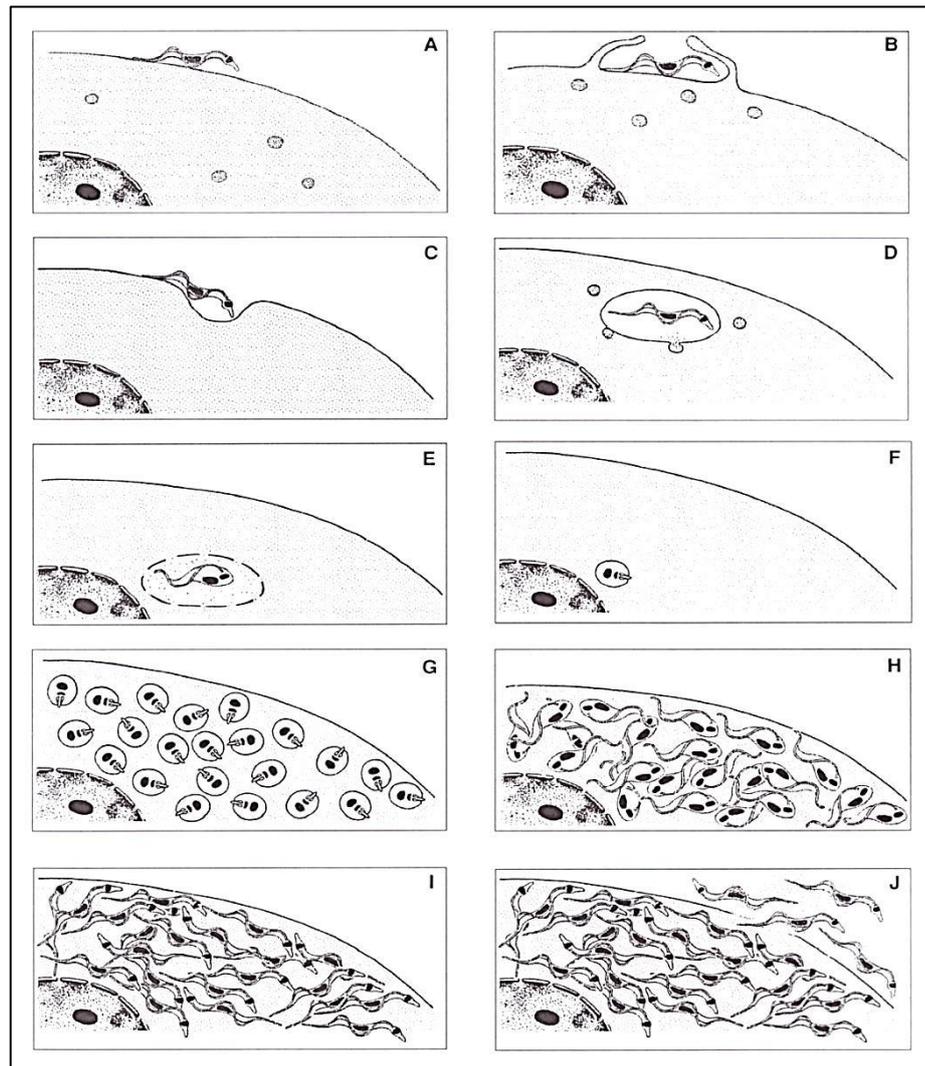
Legenda: EPI: epimastigotas; TRIPO: tripomastigotas; AMAST: amastigotas.

Fonte: BERN (2011) *apud* PEREIRA (2015).

Ao picar um indivíduo infectado, os triatomíneos se infectam com as formas tripomastigotas. No estômago do barbeiro, os parasitos se diferenciam gradualmente em formas arredondadas, chamadas de esferomastigotas. Essas formas evoluem para as formas epimastigotas e chegam ao intestino médio, onde se multiplicam.

Esse processo acontece cerca de 25 horas após o repasto sanguíneo. No intestino inferior, as formas epimastigotas são mais uma vez diferenciadas, sendo chamadas de tripomastigotas metacíclicos. Os parasitos são excretados na superfície de um vertebrado durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, reiniciando o ciclo (figura 8) (PORTO-CARREIRO et al., 2000).

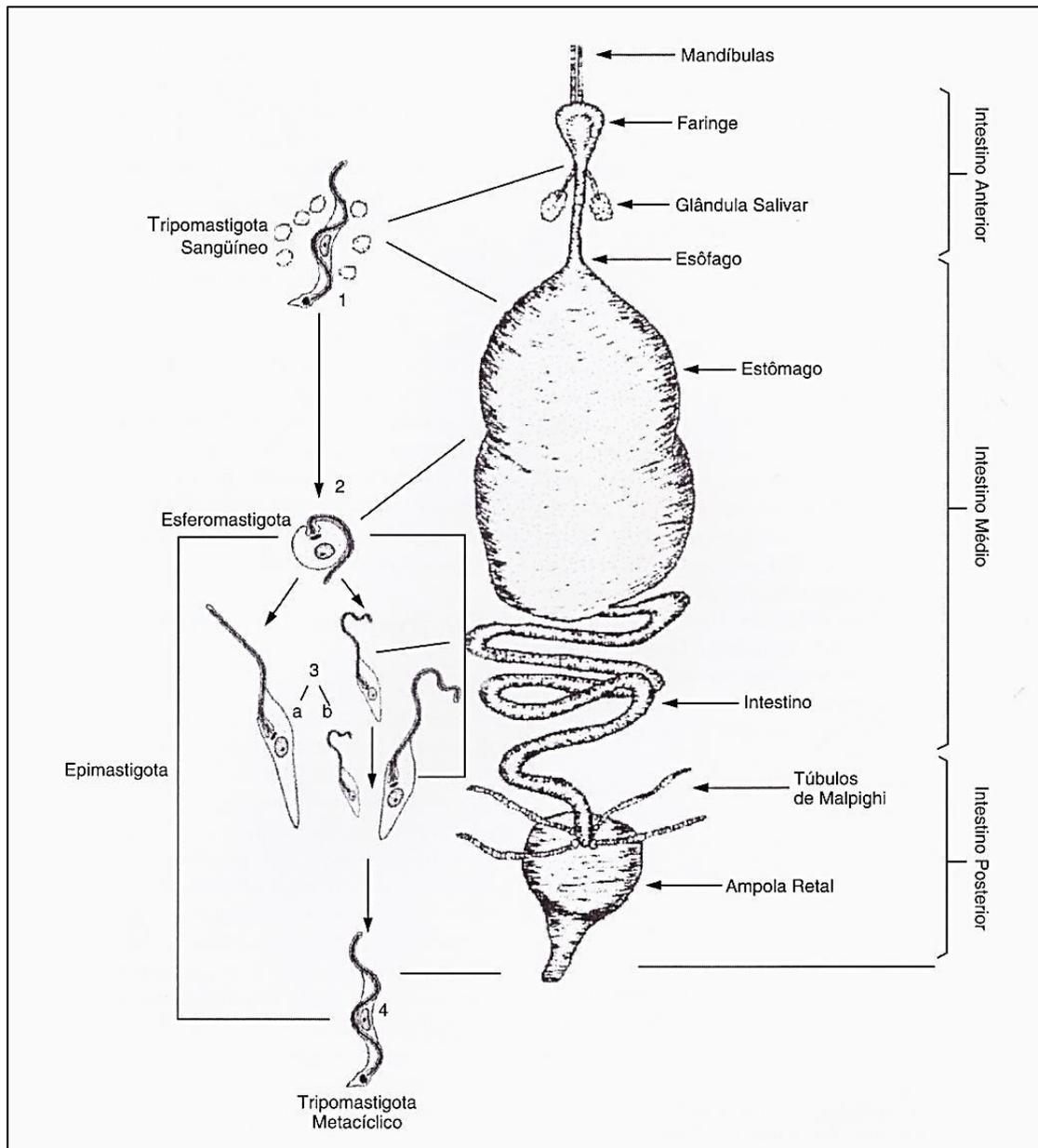
Figura 7 – Interação do *Trypanosoma cruzi* com células hospedeiras.



Legenda: (A) Aproximação da forma tripomastigotas de *T. cruzi* na membrana plasmática da célula hospedeira; (B) formação de pseudópodos; (C) formação de depressão na superfície da célula hospedeira; (D) formação do vacúolo parasitóforo e fusão com lisossomos das células hospedeiras; (E) alteração do formato de *T. cruzi* e degradação do vacúolo; (F) liberação da forma amastigota no citoplasma celular; (G, H e I) multiplicação das formas amastigotas e diferenciação em tripomastigotas no citoplasma da célula hospedeira; e (J) lise celular e liberação de tripomastigotas.

Fonte: SOUZA (2000).

Figura 8 – Interação do *Trypanosoma cruzi* com seus hospedeiros invertebrados.



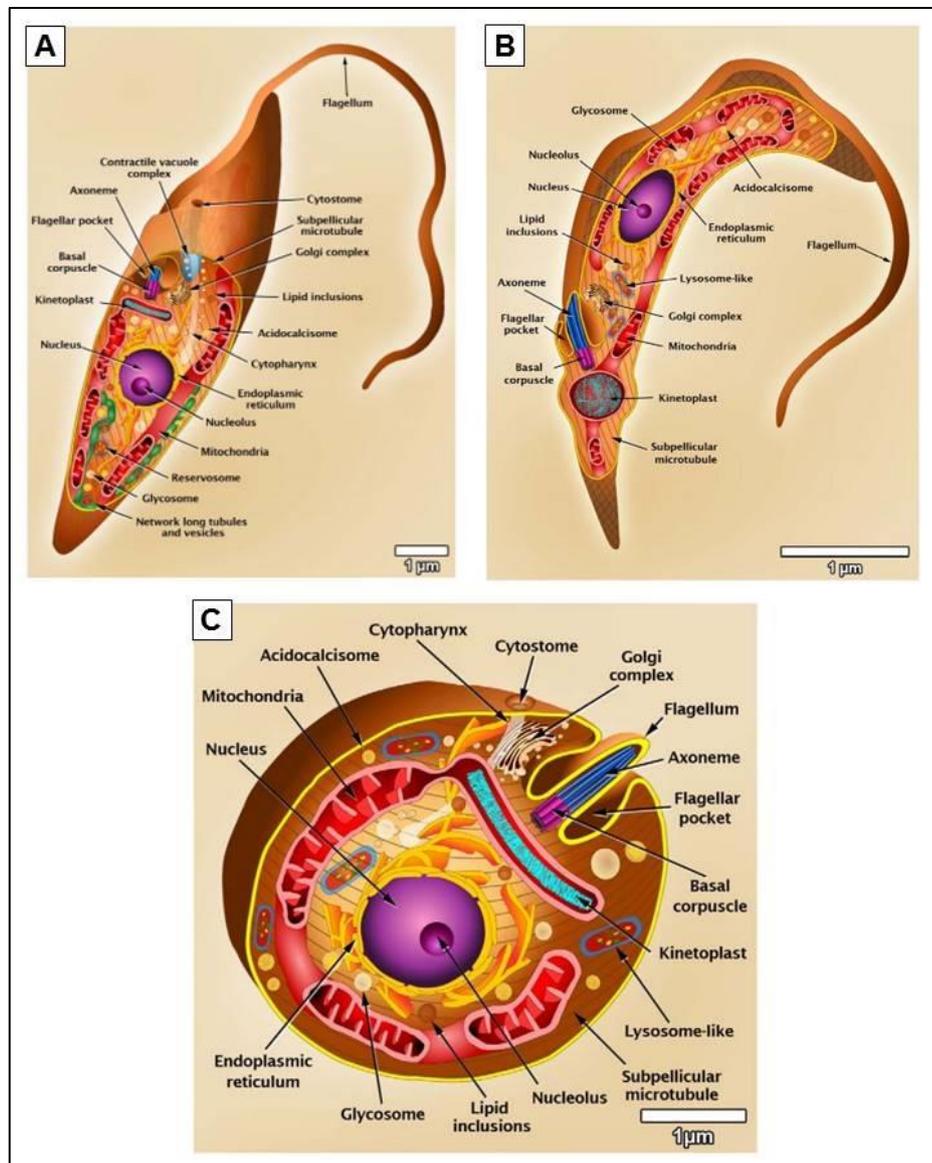
Legenda: Representação esquemática da evolução morfológica de *Trypanosoma cruzi* em seu hospedeiro invertebrado. As formas tripomastigotas (1) ingeridas junto com o sangue do hospedeiro se diferenciam em esferomastigotas (2) e, em seguida, em epimastigotas (3). Após multiplicação, os parasitos chegam ao intestino inferior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, disponíveis para infectar um hospedeiro vertebrado.

Fonte: SOUZA (2000).

1.4 Biologia celular de *Trypanosoma cruzi*

Por métodos de análise do conteúdo intracelular, foi observada a presença de diversas organelas e estruturas nas formas evolutivas de *T. cruzi*, que estão expressas na figura 9. Algumas dessas organelas são encontradas em outros organismos, enquanto outras são exclusivas dos tripanossomatídeos, exercendo funções essenciais em sua sobrevivência e interação com hospedeiros.

Figura 9 – Localização das organelas e estruturas celulares nas formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: (A) epimastigotas; (B) tripomastigotas; e (C) amastigotas.

Fonte: TEIXEIRA et al. (2012).

1.4.1. Membrana plasmática

A membrana de *T. cruzi* exerce papel importante na interação do parasito com seus hospedeiros. É constituída de dupla camada fosfolipídica com inserção de proteínas com funções variadas (SOUZA, 2009). Além disso, apresenta glicocálix, composto de glicolipídeos, glicoproteínas e lipopeptídeos. As formas tripomastigotas possuem glicocálix três vezes mais espesso do que os epimastigotas (MARTINS et al., 2012).

1.4.2. Flagelo e bolso flagelar

O flagelo está presente nas três formas evolutivas, com morfologia diferenciada. Assim como em outras células, o flagelo possui função de permitir a mobilidade dos parasitos (BUISSON; BASTIN, 2008). Associada ao flagelo existe uma estrutura chamada de bolso flagelar, especializada para permitir a exocitose e endocitose. Apesar de ocupar área correspondente a apenas 5% da área de superfície dessas células, os tripanossomatídeos possuem capacidade de endocitose e exocitose superior ao das células de organismos superiores (MCKEAN; GULL, 2008).

1.4.3. Mitocôndria e cinetoplasto

Os tripanossomatídeos possuem como característica peculiar a presença de apenas uma mitocôndria, com cristas e paredes irregulares, distribuída de forma alongada em toda a célula. Está presente em todas as formas evolutivas, com variação na organização estrutural e na composição a nível molecular (SOUSA, 2010). Assim como em outras células, a mitocôndria é essencial para a produção de energia, bem como para a detoxificação de moléculas oxidantes produzidas durante o metabolismo do parasito.

O DNA mitocondrial representa 30% do conteúdo total e está organizado nesses organismos em uma estrutura específica, chamada de cinetoplasto. Essa estrutura se localiza próxima ao núcleo e possui formato alongado nas formas epimastigotas e amastigotas, e organização em filamentos nas formas tripomastigotas (SOUZA, 2009).

1.4.4. Reservossomos

Os reservossomos são organelas semelhantes aos lisossomos, com pH ácido e grande quantidade de hidrolases. Representam o compartimento final de armazenamento de substâncias por endocitose em epimastigotas de *T. cruzi* e são ricas em cruzipaina, uma protease importante desse parasito (CUNHA-E-SILVA et al., 2006). Em tripomastigotas e amastigotas, os reservossomos perdem a capacidade de armazenamento de substâncias, e são importantes principalmente para endocitose e digestão enzimática de moléculas adquiridas do microambiente (SOUZA, 2009).

1.4.5. Glicossomos e acidocalcissomos

Os glicossomos são organelas onde os principais mecanismos glicolíticos acontecem, devido à presença de muitas enzimas envolvidas nesse processo. São estruturas esféricas, envolvidas por membrana de espessura de aproximadamente 6 nm e uma densa matrix protéica (SOUZA, 2000).

Os acidocalcissomos, por sua vez, são estruturas arredondadas delimitadas por uma unidade de membrana, contendo em seu interior um material eletrodense. Essa estrutura é decorrente da função especializada dessas organelas de armazenamento de cálcio (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010). Essas organelas estão presentes em maior quantidade nas formas amastigotas, uma vez que essa forma evolutiva necessita sobreviver no citoplasma das células hospedeiras, um ambiente em que a concentração basal de Ca^{++} é bastante baixa (DOCAMPO et al., 2013). Outras funções dessa organela são armazenamento de fósforo e magnésio, controle do pH e regulação osmótica (SOUZA, 2009).

1.4.6. Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático

A estrutura dessas organelas é bem semelhante às encontradas nas células de organismos superiores. O complexo de Golgi localiza-se próximo à bolsa flagelar e ao cinetoplasto, e suas funções são a glicosilação de proteínas e o controle do influxo e efluxo de moléculas nas células de *T. cruzi*. Já o retículo endoplasmático

está distribuído em toda a extensão da célula parasitária e participa da síntese de proteínas e lipídeos intracelulares (MARTINS et al., 2012).

1.4.7. Núcleo

A estrutura do núcleo das formas evolutivas de *T. cruzi* é bastante semelhante entre si. Apresenta membrana nuclear com poros e cromatina condensada. Durante o processo de duplicação do DNA, a membrana nuclear permanece intacta, mas o conteúdo interno sofre desorganização, com desaparecimento do nucléolo, alteração da estrutura de cromatina e surgimento de microtúbulos (DE LANA; MARTINS-FILHO, 2015).

1.5 Evolução clínica da doença de Chagas

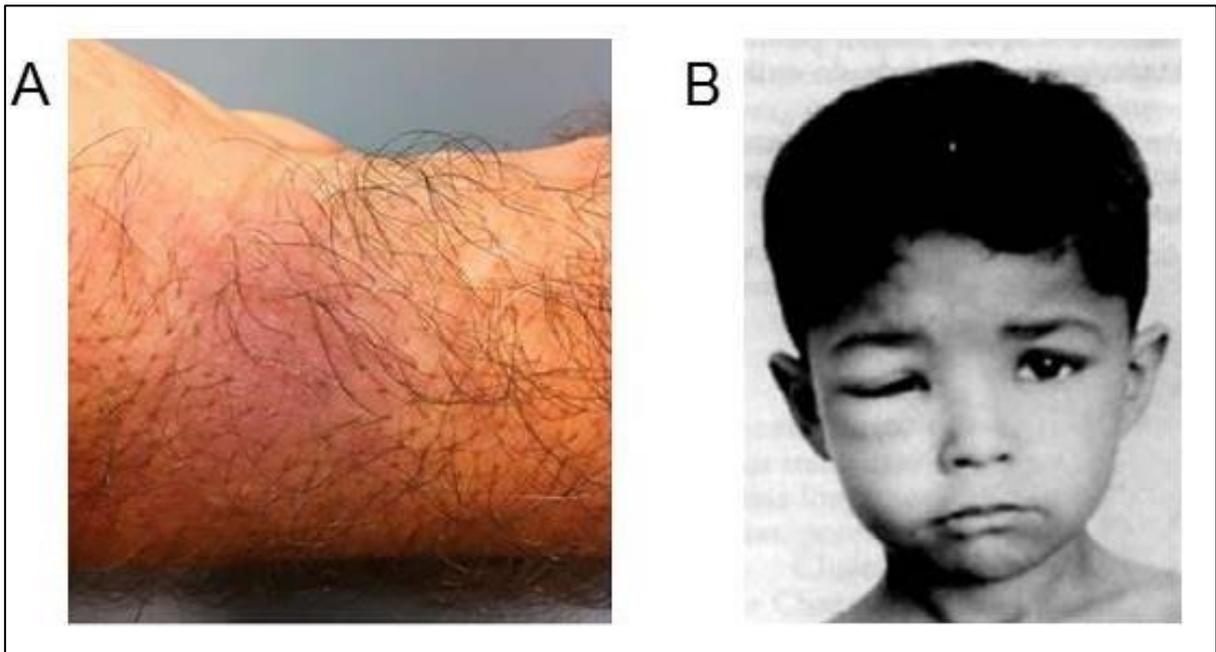
A doença de Chagas possui duas fases clínicas distintas, definidas de acordo com a evolução clínica e o perfil laboratorial: fase aguda e fase crônica. Após a inoculação das formas tripomastigotas, os parasitos invadem leucócitos e células do tecido subcutâneo, causando edema intersticial e infiltração leucocitária. Os parasitos chegam aos músculos e gânglios pelas vias sanguínea e linfática (RASSI JR.; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Os pacientes nessa fase podem ser assintomáticos, mas podem desenvolver sintomas inespecíficos, como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e edema subcutâneo. Um sintoma característico dessa fase é o aparecimento de sinais característicos no local da picada, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã (figura 10). Os sintomas da fase aguda aparecem cerca de 1 a 2 semanas após a infecção e duram 4 a 8 semanas (PEREIRA; NAVARRO, 2013). Em casos raros, podem aparecer sintomas agudos graves, como miocardite e meningoencefalite, com alta taxa de mortalidade (BERN, 2015).

Os pacientes não tratados entram na fase crônica indeterminada, com 70 a 80% assintomáticos, sem alterações no eletrocardiograma (ECG) e no raio-X de esôfago e cólon (CUNHA-FILHO et al., 2012). A maioria desses pacientes permanece positiva para os testes sorológicos de diagnóstico. Os pacientes podem permanecer nessa fase por vários anos, de forma que cerca de 60% dos pacientes

com DC se encontram nessa fase (IANNI; MADY; PAULO, 1998). Por fim, 20 a 30% dos indivíduos desenvolvem formas crônicas específicas, com alterações cardíacas, digestivas ou mistas (BERN, 2015). Em geral, essas alterações aparecem 10 a 30 anos após a infecção.

Figura 10 – Sinais característicos da transmissão vetorial da doença de Chagas.



Legenda: (A) Chagoma de inoculação; (B) sinal de romanã.

Fonte: Adaptado de SANGENIS et al. (2015) e MELO e GRECO (2009).

A doença crônica cardíaca é a manifestação clínica mais comum, diagnosticada por alterações no ECG e radiografia de tórax. Essa forma é caracterizada por dano miocárdico progressivo, causada pela fibrose incessante do tecido cardíaco induzida por *T. cruzi* (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010). Os sintomas característicos da cardiomiopatia chagásica são: fadiga ao esforço, palpitações, dispneia ao esforço, eventos arrítmicos, síndromes tromboembólicas e angina. Ao exame de imagem, observa-se cardiomegalia e hipertrofia do tecido miocárdico.

Acredita-se ainda que muitos pacientes com alterações cardíacas são falsamente classificados como portadores da fase crônica indeterminada. Esses

pacientes são assintomáticos, mas apresentam alterações significativas quando avaliados por métodos mais acurados, como ecocardiografia ou angiocardiofografia nuclear (MARÍN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 2000).

Em menor proporção, alguns pacientes crônicos desenvolvem complicações digestivas. Esses pacientes apresentam hipertrofia do tecido digestivo e redução da mobilidade do trato gastrintestinal (MARCHIORI, 2016). Essas alterações são causadas por destruição dos neurônios do sistema nervoso entérico, responsáveis pelo controle nervoso da peristalse (CORRÊA et al., 2014). Os principais sintomas observados são disfagia, regurgitação, dor esofagiana, pirose, soluços, tosse, constipação intestinal, salivação excessiva e hipertrofia das glândulas salivares (REZENDE; MOREIRA, 2000).

1.6 Diagnóstico clínico-laboratorial da doença de Chagas

O diagnóstico da DC deve ser realizado em associação de sinais clínicos e provas laboratoriais. Os dados clínicos mais importantes na triagem de paciente com DC aguda incluem os sinais clássicos de picada por barbeiro, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romanã, associados ao aparecimento de sintomas da fase aguda, como febre irregular, adenopatia, hepatoesplenomegalia, taquicardia e edema (COSTA et al., 2011). Além disso, pacientes provenientes da região rural são considerados de risco, uma vez que estão mais comumente em contato com os triatomíneos. Em pacientes com suspeita de DC crônica, consideram-se sinais importantes as alterações no raio X de esôfago e cólon, bem como no ECG (PETHERICK, 2011).

Entretanto, em ambos os casos, o diagnóstico laboratorial é indispensável. São usados testes laboratoriais distintos para diagnóstico de pacientes na fase aguda e crônica. O diagnóstico clássico da fase aguda é realizado através da observação direta do parasito no sangue do paciente, uma vez que essa fase é caracterizada por alta parasitemia com a presença de formas tripomastigotas circulantes de 6 a 8 semanas após a infecção (COSTA et al., 2017). Essa pesquisa é realizada em amostra de sangue analisada diretamente em microscópio óptico. Em pacientes negativos, sugere-se repetir o exame diariamente, em 5 a 6 amostras diárias, durante aproximadamente 5 dias (LUQUETTI; RASSI, 2000).

Apesar de ser de fácil realização, o método da observação direta apresenta baixa sensibilidade, uma vez que muitos pacientes apresentam parasitemia pouco evidente. Dessa forma, alguns métodos podem ser aplicados para melhorar o desempenho desse método, como a centrifugação do sangue com anticoagulantes e busca do parasita no creme leucocitário obtido. Outros métodos para diagnóstico dessa fase da doença são chamados de métodos parasitológicos indiretos e incluem o xenodiagnóstico e a hemocultura (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

O xenodiagnóstico é um método proposto por Brumpt em 1914 e consiste na indução do contato de triatomíneos não infectados com a pele do paciente durante 30 minutos (DIAS, 1940). Os animais são mantidos em laboratório e suas fezes são analisadas 30 e 60 dias após o repasto sanguíneo para pesquisa de formas tripomastigotas metacíclicas. Alternativamente, pode-se realizar cultura das fezes do triatomíneo em meio de cultura específico (LANA; TAFURI, 2004). Esse método apresenta alta sensibilidade na fase aguda, mas é de realização complexa e incômoda para o paciente. É mais comumente usado em regiões rurais endêmicas para a DC (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

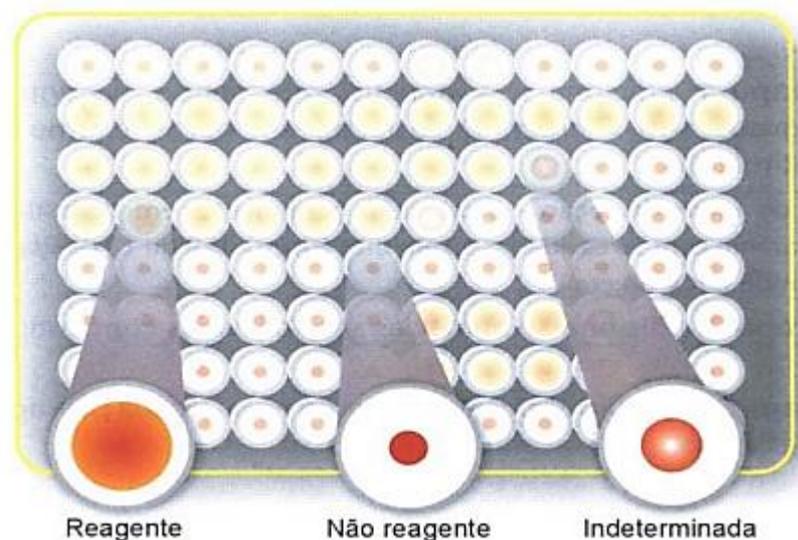
A hemocultura é realizada utilizando concentrado de células, obtido após centrifugação do sangue total heparinizado. A separação das células e do plasma deve ser realizada a 4°C e rapidamente após a coleta, para evitar inativação dos parasitos por anticorpos plasmáticos (LUQUETTI; RASSI, 2000). As amostras devem ser semeadas em múltiplos tubos contendo meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e incubadas a 28°C. Após 45, 60, 90 e 120 dias de cultivo, as amostras são analisadas por microscopia para pesquisa do parasito. As amostras negativas até a última coleta devem ser centrifugadas e o precipitado, novamente analisado para confirmação (CASTRO et al., 2000).

Durante a fase crônica, a parasitemia regride drasticamente; portanto, a pesquisa parasitológica direta não é um método adequado para diagnóstico desses pacientes. Podem ser realizados os métodos de xenodiagnóstico e hemocultura, mas os testes de eleição constituem métodos sorológicos, buscando anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos pacientes. Os principais métodos aplicados para esse diagnóstico são a hemaglutinação indireta, a imunofluorescência indireta e o ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A hemaglutinação indireta é um teste amplamente utilizado desde 1962. É de fácil e rápida realização e interpretação. Além disso, dispensa o uso de equipamentos especiais. Para realização desse teste, mistura-se a amostra do paciente em diferentes diluições com hemácias sensibilizadas com antígenos específicos de *T. cruzi* em microplaca. Após incubação de 1 a 2 horas, a leitura é realizada, onde amostras negativas formam precipitação puntiforme das hemácias, enquanto amostras positivas apresentam precipitação em forma de “tapete”, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa (figura 11). Dessa forma, o resultado é expresso de forma semi-quantitativa, apresentando o título de anticorpos presentes na amostra (NETO et al., 2005).

Figura 11 – Leitura e interpretação da hemaglutinação indireta para diagnóstico sorológico da doença de Chagas.

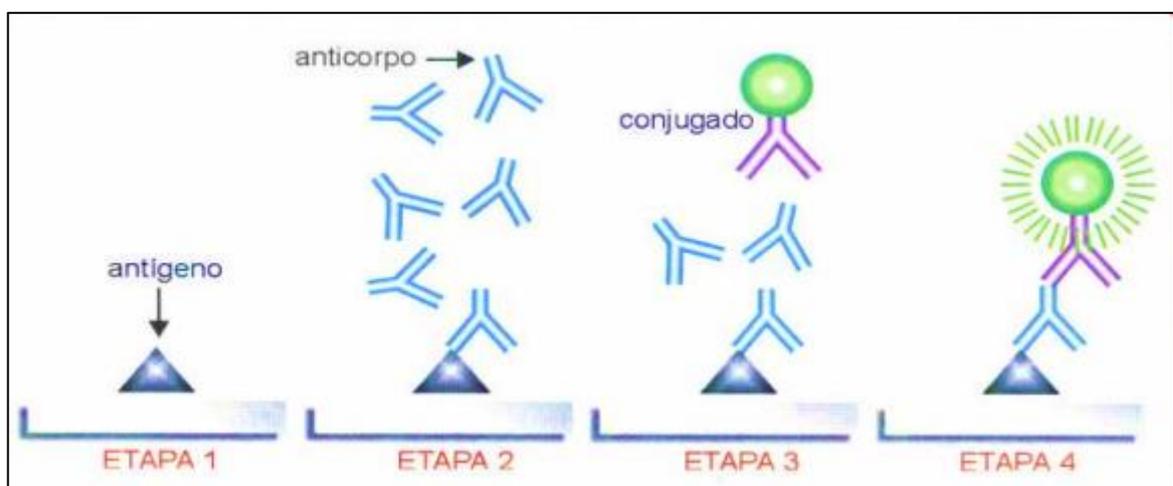


Fonte: LUQUETTI et al. (1998).

A reação de imunofluorescência indireta é baseada na ligação de formas epimastigotas de *T. cruzi* com anticorpos específicos presentes no soro de pacientes (figura 12). Para isso, uma lâmina contendo células de *T. cruzi* aderidas à sua superfície é incubada com a amostra diluída do paciente. Em seguida, a lâmina é

lavada e incubada com anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Após mais uma lavagem, a leitura é realizada em microscópio de fluorescência, onde parasitos emitindo fluorescência verde indicam presença de FITC e, conseqüentemente, ligação de anticorpos do paciente. Assim como na hemaglutinação indireta, pode-se obter a titulação de anticorpos a partir desse método (LUQUETTI et al., 1998).

Figura 12 – Representação esquemática da reação de imunofluorescência indireta.



Fonte: LUQUETTI et al. (1998).

O ELISA é uma técnica amplamente utilizada na pesquisa de antígenos e anticorpos específicos para várias doenças infecciosas. No contexto da DC, o método é utilizado para determinação quantitativa de anticorpos anti-*T. cruzi*. Para tal, placas sensibilizadas com antígenos do parasito são incubadas com a amostra do paciente, contendo os anticorpos. Após incubação, as placas são lavadas e incubadas com um anticorpo secundário, conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina). Por fim, a reação é mais uma vez lavada e revelada através da adição de substrato para ação da enzima. A intensidade de produto colorido produzido pode ser lida por espectrofotometria e é diretamente proporcional à concentração de anticorpos na amostra do paciente (LUQUETTI; RASSI, 2000; NAVARRO et al., 2017).

Além disso, os métodos de biologia molecular possuem alta sensibilidade e podem ser utilizados para o diagnóstico de todas as fases da doença, bem como

para identificação de triatomíneos infectados. Para isso, é realizada reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) para amplificação de fragmentos de DNA do cinetoplasto (kDNA) ou nuclear (nDNA) (VASOO; PRITT, 2013). Uma aplicação importante para a utilização desse tipo de teste é o diagnóstico de pacientes imunossuprimidos, em que a redução da produção endógena de anticorpos compromete o desempenho analítico dos testes sorológicos (DO BRASIL; CASTRO; DE CASTRO, 2016; LATTES; LASALA, 2014).

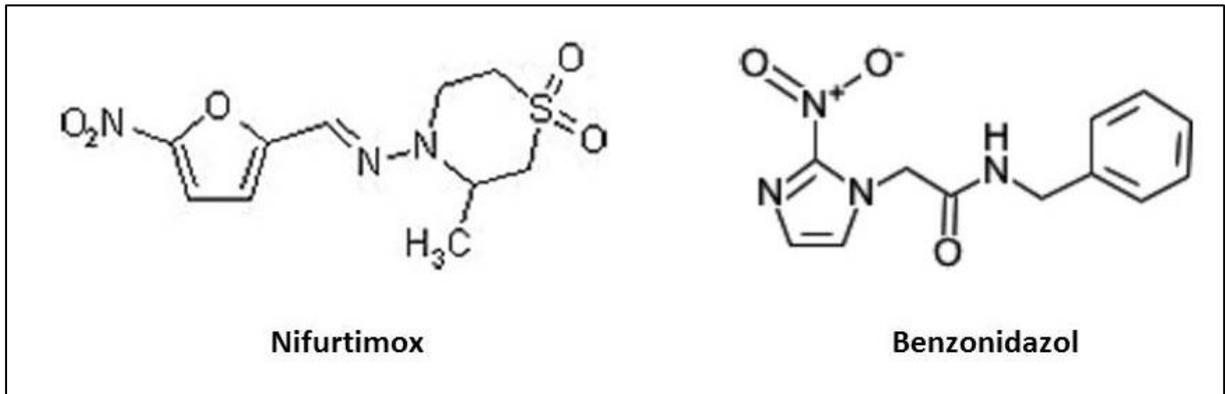
1.7 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

Mesmo décadas após a descrição da doença de Chagas, vários aspectos relacionados ao tratamento ainda são considerados complexos. O tratamento é eficaz logo após a infecção no início da fase aguda, porém, uma vez que a doença tenha progredido para forma crônica (indeterminada ou determinada), nenhum medicamento apresenta efetividade satisfatória (BERN, 2015; RASSI; MARINETTO, 2010)

As opções terapêuticas disponíveis atualmente foram desenvolvidas há mais de 50 anos, a exemplo do Nifurtimox (NFX), produzido em 1967. Esse fármaco foi o primeiro a ser usado para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas. O Benzonidazol, por sua vez, foi introduzido na terapêutica em 1972 (CUNHA-FILHO et al., 2012). O Nifurtimox deixou de ser adotado como tratamento no Brasil, devido sua alta toxicidade (CANÇADO, 2002). Dessa forma, o Benzonidazol é o tratamento indicado pelo Ministério da Saúde; todavia possui eficácia limitada e também desencadeia muitos efeitos adversos (CANÇADO, 2002; PEREZ-MOLINA et al., 2009). A estrutura química do benzonidazol e do nifurtimox está apresentada na figura 13.

O benzonidazol (N-benzil-2nitro-1-imidazolacetaminda) (BZ) é um composto nitroheterocíclico que foi desenvolvido pelo laboratório Roche® sob o nome comercial de Rochagan®. Em 2003, a patente desse fármaco foi transferida para o Brasil, que produz esse medicamento para distribuição pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 13 – Estrutura química do nifurtimox e do benzonidazol.



Fonte: OLIVEIRA et al. (2008).

O BZ está disponível em comprimidos contendo 100 mg de fármaco. Seu esquema terapêutico consiste na dose de 5 a 7,5 mg/Kg/dia, dividida em 2 ou 3 administrações diárias, durante 30 a 60 dias (CUNHA-FILHO et al., 2012). Após administrado por via oral, é rapidamente absorvido e, em 3 a 4 horas, atinge pico de concentração plasmática entre 2,2 e 2,8 µg/mL. Apresenta distribuição rápida e uniforme, com volume de distribuição de 0,56 L/Kg. Possui $t_{1/2}$ (tempo de meia-vida) de eliminação de 12 horas, com 40% de ligação às proteínas plasmáticas. 2/3 do fármaco e seus metabólitos são eliminados por via renal, em quanto o restante, por via fecal (DAVANÇO, 2015).

Apesar de não ser completamente esclarecido, sabe-se que o BZ é um pró-fármaco que age por meio da formação de radicais livres e metabólitos nucleofílicos. Para isso, o seu grupo nitro é reduzido pelo NADPH-citocromo P-450 redutase, produzindo um radical ânion nitro intermediário. O metabólito ativo de BZ age causando stress redutivo, envolvendo reação de intermediários nitroreduzidos com macromoléculas parasitárias. Além disso, tem sido demonstrado que BZ causa efeito no ambiente extra e intracelular, sendo capaz de matar formas tripomastigotas e amastigotas (OLIVEIRA et al., 2008).

Em pacientes na fase aguda da DC, o BZ apresenta eficácia de 75 a 95% após alguns meses, verificado a partir da negatização do xenodiagnóstico. Entretanto, esse fármaco não apresenta os mesmos resultados na fase crônica da doença, conforme descrito por diversos autores (CHATELAIN, 2015; OLIVEIRA et al., 2008; PEREZ-MOLINA et al., 2009; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Nessa fase, o

fármaco é usado com objetivo de prevenir o aparecimento de complicações cardíacas, não sendo capaz de curar o paciente.

Além disso, o BZ apresenta efeitos tóxicos pronunciados, que diminuem a adesão ao tratamento e reduzem a qualidade de vida dos pacientes. Nas primeiras semanas, os efeitos adversos mais comumente observados são reações cutâneas, dentre as quais podem ser citados dermatite atópica, eritematose, erupções sensíveis à luz, púrpura, febre, perda de peso e distúrbios gastrointestinais. O avançar do tratamento pode culminar em leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos como degeneração neuronal e desmielinização (ANTUNES et al., 2016). A necessidade do emprego deste medicamento em esquemas posológicos prolongados facilita o surgimento dessas reações (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012).

A OMS define como requisitos para um bom quimioterápico: (a) cura parasitológica dos casos agudos e crônicos da infecção; (b) efetividade em uma dose simples ou em poucas doses; (c) acessibilidade ao paciente, baixo custo e fácil obtenção; (d) sem efeitos colaterais ou efeitos teratogênicos; (e) não ter a necessidade de internação para o tratamento e (f) ausência de resistência do agente etiológico (COURA; DE CASTRO, 2002). Dessa forma, o Benzonidazol não atende a esses critérios, de forma que se faz necessário a pesquisa por novas alternativas terapêuticas.

1.8 Novos alvos farmacológicos na pesquisa de substâncias tripanocidas

Os esforços voltados ao desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos tem sido historicamente limitados, com um pequeno número de pesquisadores se dedicando ao assunto e abordagens mal sucedidas. Dessa forma, poucas substâncias foram triadas para esse fim, tendo sido obtido opções pouco satisfatórias, com baixa eficácia e alta toxicidade, além de outras limitações. Nesse grupo, estão inseridas as naftoquinonas, diamindinas, nitroimidazólicos e compostos de rutênio (CHATELAIN, 2015).

Entretanto, nos últimos anos, novas instituições tem se interessado pelo assunto, impulsionando as pesquisas. Como resultado, dois estudos clínicos de novos fármacos estão em fase de desenvolvimento após mais de 40 anos do

desenvolvimento do benzonidazol (CHATELAIN, 2016). Esses eventos estimulam os grupos de pesquisa a buscar estratégias inovadoras para auxiliar no tratamento da DC.

Uma vez que o benzonidazol é considerado o principal fármaco ativo contra a doença, ele também é considerado fármaco referência. Dessa forma, substâncias candidatas devem possuir eficácia superior e toxicidade inferior ao BZ para serem consideradas aptas (PAUCAR; MORENO-VIGURI, 2016).

As diferenças morfológicas e bioquímicas entre as células de *T. cruzi* e de seus hospedeiros são utilizadas como base para a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas tripanocidas seletivas. Nesse contexto, algumas rotas metabólicas específicas tem atraído atenção dos pesquisadores e sido consideradas promissoras.

1.8.1. Mecanismos de morte celular

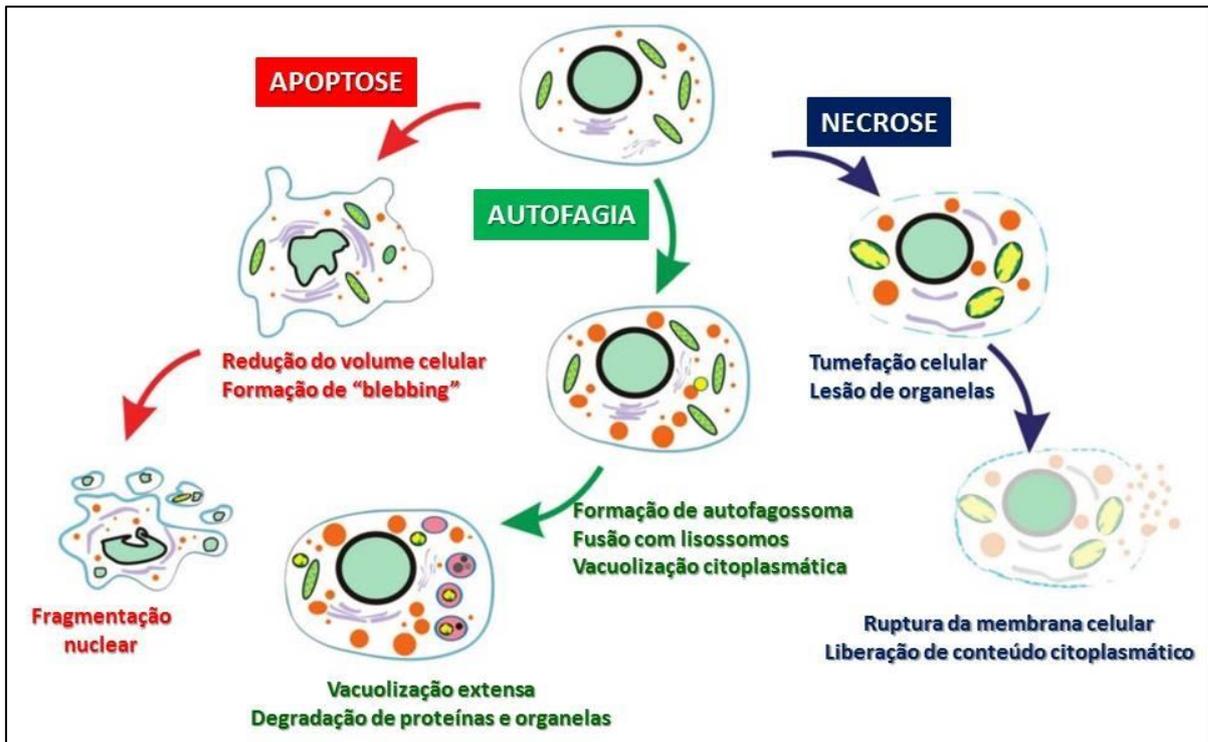
Durante muitos anos, acreditou-se que a morte celular acontecia somente de forma acidental, relacionada a processos lesivos e degenerativos e como resposta a ação de substâncias ou microambientes tóxicos. Esse processo, conhecido como necrose, é descrito de acordo com alterações morfológicas características, como tumefação celular, agregação de cromatina, desorganização citoplasmática, lesão de membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular (KRYSKO et al., 2008).

Atualmente, sabe-se que a morte celular pode ser induzida por vias distintas, apresentando características morfológicas drasticamente diferentes. É reconhecido ainda que acontece não somente em resposta a estímulos patológicos, mas também como parte da homeostase de um tecido ou população de células (DOONAN; COTTER, 2008). O conjunto desses processos é denominado morte celular programada.

Além disso, o perfil fenotípico de alterações observadas durante o processo de morte depende de diversos fatores, como o tipo de célula e a natureza dos estímulos envolvidos (TAN et al., 2014). Apesar de existirem diversos subtipos de morte celular programada, a apoptose e a autofagia se destacam, por estarem relacionadas tanto no processo de homeostase celular quanto no efeito citotóxico de

substâncias bioativas. A figura 14 demonstra a diferença das manifestações celulares observadas em células necróticas, apoptóticas e autofágicas.

Figura 14 – Diferenças entre o fenótipo de alterações observadas nos mecanismos de morte celular por necrose, apoptose e autofagia.



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

A apoptose é um mecanismo controlado de morte celular, caracterizado pela ausência de lise celular (ARCHANA; YOGESH; KUMARASWAMY, 2013). Durante esse processo, um determinado estímulo fisiológico ou patológico induz a ativação de uma cascata de reações, culminando diversas alterações funcionais e morfológicas, como: translocação de fosfatidilserina para o folheto externo da membrana plasmática; redução do volume celular; ativação de cisteíno proteases específicas, chamadas de caspases; alteração do potencial transmembrânico mitocondrial; formação de estruturas bolhosas na membrana plasmática (processo chamado de "blebbing"); e formação de estruturas pequenas contendo o material intracelular, conhecidas como corpos apoptóticos (DOONAN; COTTER, 2008; KRYSKO et al., 2008; LOCKSHIN; ZAKERI, 2001).

A apoptose pode ser induzida por duas vias principais, chamadas de via intrínseca e via extrínseca. Na via intrínseca, estímulos como lesão do DNA, *stress oxidativo* e aumento da concentração citoplasmática de cálcio causam disfunção mitocondrial, com conseqüente liberação de citocromo c para o citoplasma. Por fim, o citocromo c induz a ativação de caspases, causando finalmente a morte celular (JIANG et al., 2011). A via extrínseca, em contraste, é induzida por ligação de substâncias indutoras na membrana plasmática, como o fator de necrose tumoral ou substâncias bioativas, causa alteração da conformação no domínio intracelular dos receptores de membrana e ativação de caspases .

A autofagia, por sua vez, também é um processo de morte sem liberação de conteúdo interno. Entretanto, apresenta diferenças importantes em relação à apoptose. Durante o processo, organelas e outros componentes celulares são internalizados em vacúolos, chamados de autofagossomos. Em seguida, os autofagossomos se fundem aos lisossomos (ou em tripanossomatídeos, aos reservossomos), formando estruturas chamadas de autolisossomos. As enzimas proteolíticas presentes nos lisossomos tem o papel de degradar o conteúdo celular para reciclagem de aminoácidos e outras substâncias (MENNA-BARRETO et al., 2009).

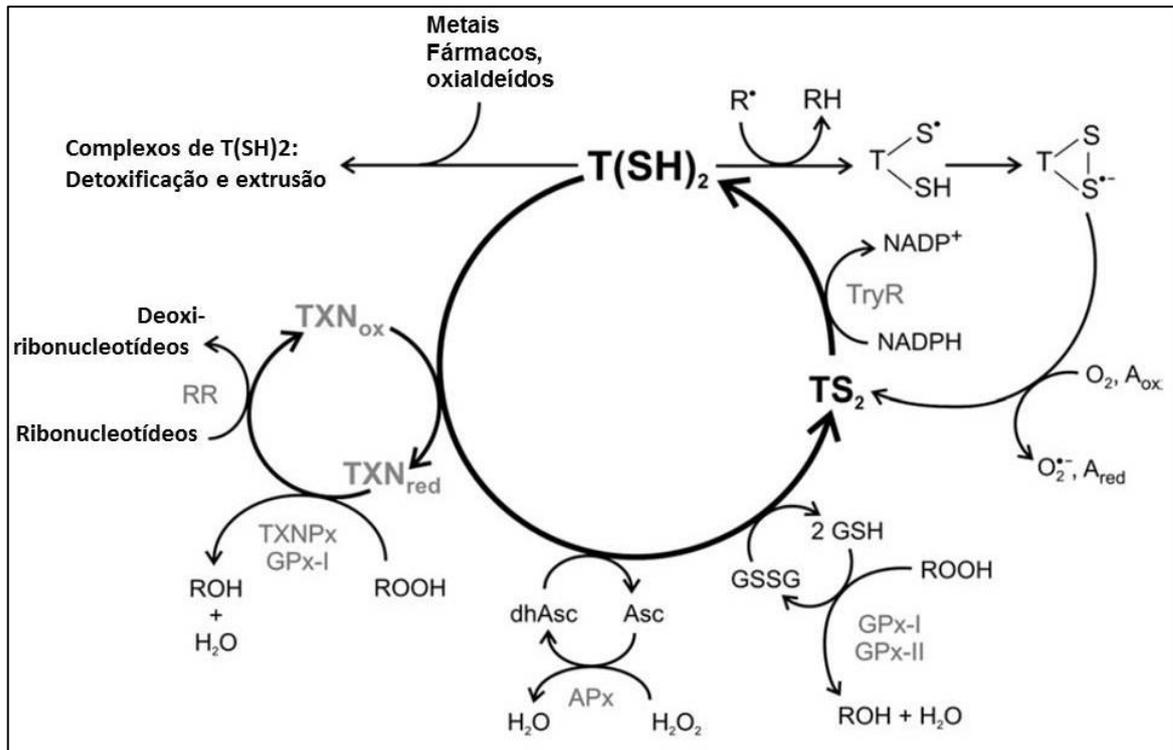
1.8.2. Mecanismos antioxidantes

Durante sua passagem por diferentes hospedeiros e seu metabolismo aeróbico, são produzidos uma diversidade de mediadores oxidantes em *T. cruzi*. Esses metabólitos, quando em excesso, causam lesão de organelas importantes e conseqüente morte celular (IRIGOÍN et al., 2008). Entretanto, o parasito possui enzimas detoxificantes, que são importantes para a sua sobrevivência nos diversos compartimentos biológicos em que se encontra em seu ciclo biológico.

Um dos mecanismos detoxificantes mais importantes em *T. cruzi* envolve a participação da tripanotona [N1,N8-bis(glutathionyl)spermidine], uma molécula ditiol formada pela ligação covalente de duas moléculas de glutatona a uma molécula de espermidina. Exerce papel central dos mecanismos antioxidantes em tripanossomatídeos, agindo como cofator na ação de diversas enzimas antioxidantes (PIACENZA et al., 2012), como demonstrado na figura 15. Dentre elas, destacam-se

a tripanotiona redutase (TryR) e a triparedoxina, que tem sido consideradas alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos (KHAN, 2007).

Figura 15 – Reações biológicas mediadas por tripanotiona.



Legenda: A tripanotiona é mantida em sua forma reduzida $[T(SH)_2]$ às custas de NADPH, em uma reação catalisada pela enzima tripanotiona redutase (TryR). $T(SH)_2$ realiza a redução de triparedoxina (TXN), dehidroascorbato (dhAsc) em ascorbato (Asc) e glutatona dissulfeto (GSSG) em glutatona reduzida (GSH). Dessa forma, participa do processo de síntese de deoxi-ribonucleotídeos e da decomposição de peróxidos. $T(SH)_2$ pode ainda interagir diretamente com vários grupos eletrofílicos de substâncias, metabolizando fármacos, oxialdeídos e metais. Além disso, a tripanotiona pode reagir com radicais livres (R^\bullet) em reações de eliminação ou reparo. Siglas adicionais: RR = ribonucleotídeo redutase; ROOH = hidroperóxidos; A = oxidante de um elétron; TXNPx = triparedoxin peroxidase; GPx-I e GPx-II = triparedoxin peroxidases glutatona peroxidase-like do tipo I e II, respectivamente; APx = peroxidase dependente de ascorbato.

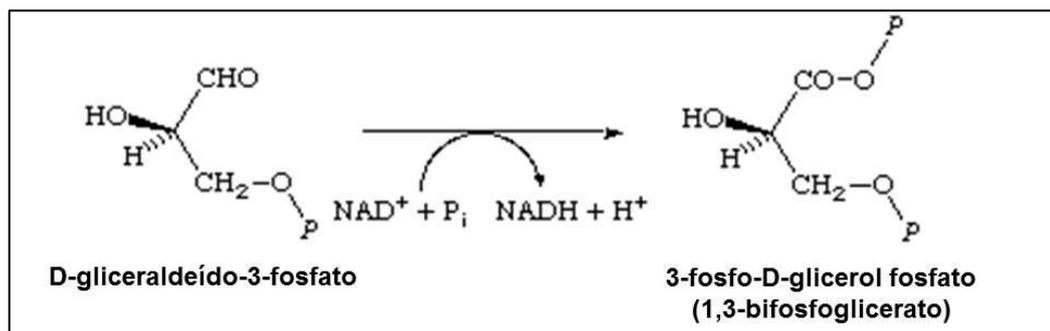
Fonte: Adaptado de IRIGOÍN et al. (2008).

1.8.3. GAPDH e a via glicolítica de *Trypanosoma cruzi*

A degradação da glicose é a principal via de produção de energia em tripanossomatídeos, sendo esse processo mediado por enzimas específicas. Em comparação a outros organismos, possuem baixa capacidade de utilização de lipídeos e proteínas como Fonte de energia (CHELESKI et al., 2011). Apesar de a via glicolítica ser comum tanto aos parasitos quanto aos hospedeiros, a distância evolutiva entre hemoflagelados e humanos proporcionou que as enzimas relacionadas a essa função sejam estruturalmente pouco relacionadas.

Dessa forma, essa rota metabólica pode constituir um mecanismo promissor para novos fármacos antiparasitários seletivos e tem sido estudado nos últimos anos (HARRIS; MITCHELL; MORRIS, 2014). Uma das enzimas consideradas mais promissoras como alvo farmacológico nessa via metabólica é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada) e fosfato inorgânico (Pi) (figura 16). Está presente no glicosoma dos parasitos e, quando bloqueada, provoca redução drástica da síntese de ATP, além do acúmulo de mediadores oxidantes tóxicos para a célula (MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011).

Figura 16 – Reação enzimática catalisada pela GAPDH.



Fonte: http://www.chem.uwec.edu/webpapers2005/mintermm/pages/GAPDH_media/GAPDH.gif.

Em contraste, tem sido observado recentemente que essa enzima está envolvida em vários processos fisiológicos não relacionados à síntese de ATP, como reparo do DNA, organização da membrana nuclear, proliferação celular,

metabolismo redox e regulação da morte celular por apoptose (NICHOLLS; LI; LIU, 2012; TRISTAN et al., 2011).

1.9 Óleos essenciais, terpenos e terpenoides como fonte de novos fármacos

Dentre as substâncias de origem vegetal com utilidade biotecnológica, os óleos essenciais se destacam, por estarem bastante inseridos na indústria farmacêutica e química. São amplamente utilizados na produção de cosméticos, principalmente por suas propriedades aromáticas. Além disso, óleos essenciais proveniente de uma vasta quantidade de plantas, bem como seus constituintes, apresentam atividades farmacológicas de interesse farmacêutico (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

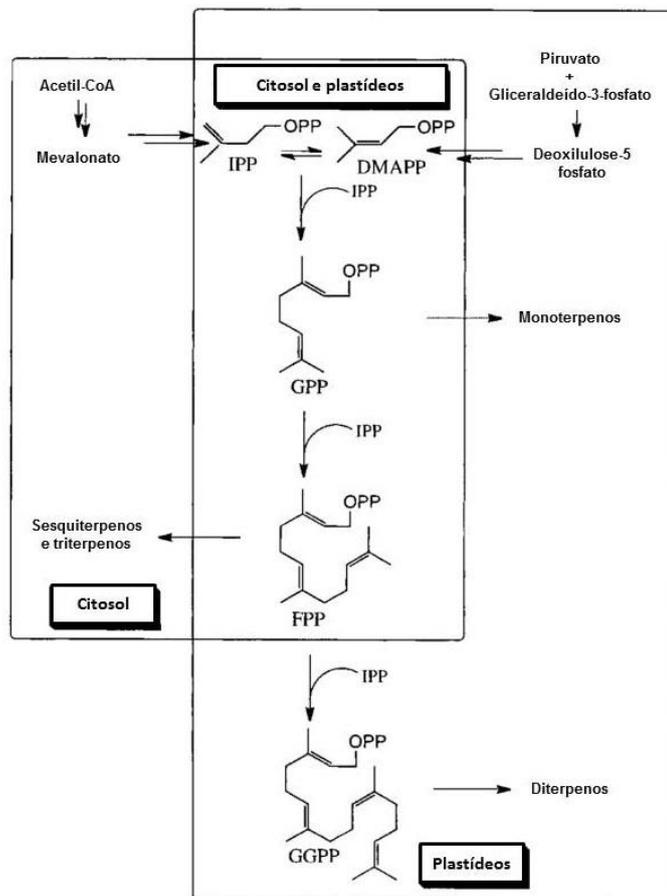
Os terpenos, também chamados de isoprenóides, são substâncias derivadas do ácido mevalônico. Além disso, podem ser produzidas a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, sem a participação do mevalonato, conforme demonstrado na figura 17. Possuem estrutura química constituída de estruturas de isopreno, cada uma com 5 carbonos. Dessa forma, são classificados em: a) hemiterpenos, contendo 5 carbonos; b) monoterpenos, com 10 carbonos; c) sesquiterpenos, com 15 carbonos; d) os diterpenos, que contém entre 20 e 40 átomos de carbono; e e) os triterpenos, contendo 30 carbonos (BREITMAIER, 2006).

Os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais. Os demais tipos são característicos de bálsamos, resinas, ceras e borrachas. Já os terpenoides são definidos como terpenos modificados por redução ou rearranjo dos grupamentos metila, ou por adição de átomos de oxigênio oxidados (BREITMAIER, 2006).

Sabe-se que as substâncias aromáticas presentes nas plantas exercem um papel importante em sua fisiologia, como a atração de agentes polinizadores, inibição da germinação, proteção contra predadores e perda de água (DEGENHARDT et al., 2003). Além disso, são considerados seguros para consumo humano por vários órgãos reguladores, como o *Food and Drug Administration* (FDA), *Toxic Substances Control Act* (TSCA) e o *National Toxicology Program* (NTP).

Ao avaliar o potencial farmacológico de plantas utilizadas tradicionalmente pelo conhecimento popular, foi observado que sesquiterpenos foram responsáveis por muitas propriedades farmacológicas dessas plantas. Alguns exemplos incluem o efeito antimicrobiano, antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2015), anti-inflamatório (MAURYA et al., 2014), anticancerígeno (FRIKECHE et al., 2015) e anticolinesterásico (MAKWANA et al., 2015).

Figura 17 – Visão geral da biossíntese de terpenos nas plantas.



Legenda: A compartimentalização intracelular das reações envolvidas na biossíntese de terpenos, pelas vias dependentes e independentes de mevalonato, estão apresentadas acima. IPP = isopentenildifosfato; DMAPP = dimetilalil difosfato; FPP = farnesil difosfato.

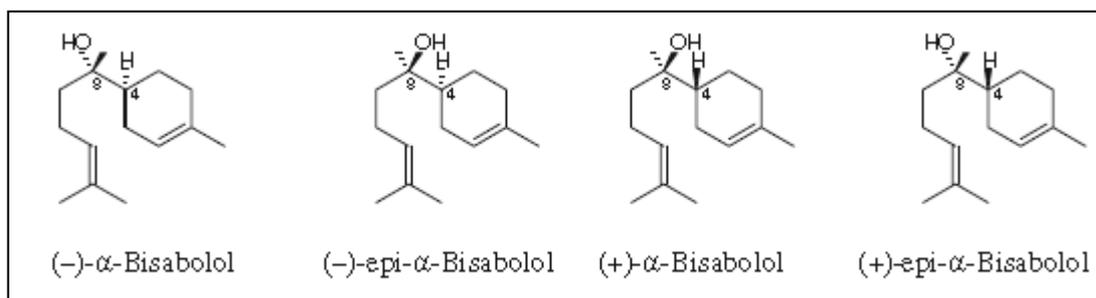
Fonte: Adaptado de TRAPP; CROTEAU, (2001).

1.10 (-)- α -Bisabolol

O bisabolol (alfa,4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol) possui massa molar de 222,37 g/mol, sendo um álcool sesquiterpeno monocíclico pequeno e oleoso, que existe na natureza no estado líquido. Está presente no óleo essencial de várias plantas, tendo sido isolado inicialmente das flores e folhas de camomila (*Matricaria chamomilla*), correspondendo a aproximadamente 50% do conteúdo total do seu óleo essencial. Essa substância pode existir na natureza em quatro estereoisômeros possíveis, conforme apresentado na figura 18. Dentre eles, o isômero (+)- α -bisabolol é de rara ocorrência, e o (-)- α -bisabolol está presente em maior quantidade nas plantas (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

O (-)- α -bisabolol (BIS), também chamado de levomenol pode ser obtido a partir da hidrodestilação do óleo essencial de algumas espécies, como a camomila alemã (*Matricaria chamomilla*), sálvia (*Salvia runcinata*), candeeiro (*Vanillosmopsis arborea*), arnica (*Arnica chamissonis*) e *Myoporum grassifolium* (BUITRAGO et al., 2015).

Figura 18 – Enantiômeros do bisabolol.



Fonte: SAMPAIO (2016) *apud* GUY et al. (2010).

Estão descritas na literatura diversas bioatividades do BIS, como o potencial antimicrobiano (ROTTINI et al., 2015; VILA et al., 2010), antineoplásico (CHEN et al., 2010a; COSTARELLI et al., 2010; DA SILVA et al., 2010; LIANG et al., 2014; RIGO; VINANTE, 2016; SEKI et al., 2011; UNO et al., 2016), anticolinesterásico (DE SIQUEIRA et al., 2014), anti-inflamatória (ZARGARAN et al., 2014), nefroprotetor (SAMPAIO et al., 2016), antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2015) e gastroprotetora (BEZERRA et al., 2009; MOURA ROCHA et al., 2010). É ainda

usado como excipiente em formulações tópicas, por aumentar a permeação transdérmica de fármacos (KIM et al., 2012). Recentemente, foi demonstrando o efeito de BIS e de uma nanopartícula sólida contendo BIS sobre *Trypanosoma evansi*, aumentando o interesse na pesquisa dessa substância sobre tripanossomatídeos (BALDISSERA; GRANDO; SOUZA, 2016). Além disso, os mecanismos associados ao efeito antiparasitário de BIS não estão descritos.

Em relação à sua toxicidade, BIS tem demonstrado efeito inibitório concentração-dependente sobre células de glioma, sem interferir no crescimento de células normais (CAVALIERI et al., 2011). Além disso, alguns estudos in vivo demonstram baixa toxicidade e boa absorção, indicando que essa substância é facilmente aplicável a ensaios in vivo (MOURA ROCHA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2016).

Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar o potencial farmacológico do (-)- α -bisabolol como uma molécula com atividade antichagásica utilizando modelo in vitro e as três formas de vida principais do *T. cruzi*.

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas representa um problema de saúde pública com altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas (RASSI; MARINNETO, 2010; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Possui complicações crônicas importantes, como a cardiopatia chagásica e alterações digestivas, que causam grande comprometimento do estado geral de saúde dos pacientes afetados (CHATELAIN, 2015).

No Brasil, o benzonidazol é o único fármaco disponível para o tratamento. Desenvolvido há mais de quarenta anos, apresenta boa eficácia apenas na fase aguda da doença. Em contraste, possui efeito limitado sobre as formas crônicas da doença, além de possuir efeitos adversos importantes, que limitam sua utilização clínica (OLIVEIRA et al., 2008). Assim, o atual cenário farmacológico chama a atenção para a necessidade de buscar estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitas.

Substâncias derivadas da biodiversidade brasileira apresentam potencial aplicação em biotecnologia (KOH; KINI, 2012), pois possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novos fármacos (CHATELAIN, 2015). Dentre os grupos de substância de interesse, os terpenos se destacam pela diversidade de efeitos biológicos demonstrados por vários autores. Moléculas desse grupo apresentam efeito antimicrobiano, antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2015), anti-inflamatório (MAURYA et al., 2014), anticancerígeno (FRIKECHE et al., 2015) e anticolinesterásico (MAKWANA et al., 2015).

O (-)- α -bisabolol é um sesquiterpeno presente no óleo essencial de camomila e apresenta uma diversidade de efeitos biológicos de interesse, incluindo efeito sobre *Trypanosoma evansi* e espécies de *Leishmania* sp. (BALDISSERA et al., 2016; MORALES-YUSTE et al., 2010). Dessa forma, é uma substância promissora e, no presente trabalho, foi escolhida para investigação do seu efeito biológico sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*. O presente trabalho pode abrir perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos, bem como de estratégias terapêuticas para o manejo de pacientes portadores da DC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar o efeito antiparasitário do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre as formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y e avaliar seu mecanismo de indução de morte celular

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade do BIS sobre células de hospedeiro mamífero.
- Determinar o efeito antiparasitário do BIS sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y *in vitro*.
- Avaliar o efeito do BIS sobre a recuperação de crescimento de formas epimastigotas.
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido por BIS sobre *T. cruzi*.
- Avaliar a indução de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas em *T. cruzi* induzida por BIS.
- Investigar o efeito de BIS sobre o potencial transmembrânico mitocondrial dos parasitos.
- Estudar o efeito de BIS sobre a tumefação de reservossomos de *T. cruzi*.
- Analisar as alterações morfológicas induzidas por BIS em epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar a influência de peróxido de hidrogênio sobre o efeito antiparasitário de BIS.
- Avaliar o potencial inibitório de BIS sobre a enzima GAPDH em modelos experimental e computacional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 (-)-alfa-Bisabolol e benzonidazol

O (-)-alfa-Bisabolol (BIS) foi obtido da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha) e armazenado respeitando as orientações do fabricante. A substância foi diluída na concentração de 0,2 M em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Em seguida, as soluções usadas no trabalho foram preparadas por diluição seriada em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,47 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4). As diluições foram feitas de forma que a concentração final de DMSO nos experimentos nunca ultrapassou 0,5%.

O benzonidazol (BZ), fármaco de referência, foi gentilmente doado pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE).

4.2 Avaliação da citotoxicidade do (-)-alfa-bisabolol em células hospedeiras

A citotoxicidade do BIS foi investigada com o objetivo de selecionar as concentrações de estudo para os ensaios de atividade tripanocida. Além disso, o efeito citotóxico foi determinado para avaliar a seletividade da substância pelo *Trypanosoma cruzi* em relação às células hospedeiras.

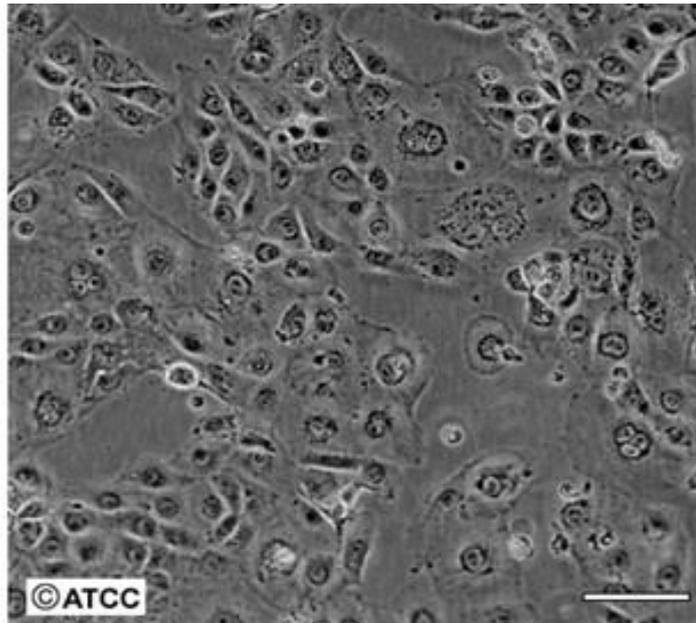
4.2.1. Cultivo e manutenção das células LLC-MK2

As células LLC-MK2 são uma linhagem imortalizada de células epiteliais renais obtidas de rim de macaco (*Macaca mulatta*) e foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (130 mg/L). As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis de 75 cm² em estufa de CO₂, mantendo as culturas a 37 ± 0,3°C e 5% de CO₂.

O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação por microscópio invertido, para verificação da densidade celular na monocamada (figura 19). Após atingirem confluência, o meio foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA

(0,25 %) por 5 a 10 minutos a 37°C. Alíquotas das células deslocadas foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM.

Figura 19 – Fotomicrografia de células LLC-MK2 em estado de confluência. Escala de 100 µM.



Fonte: Adaptado de <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-7.aspx#documentation>. Acesso em 26/12/2016.

Para estocagem, culturas confluentes foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos). Em seguida, o meio foi removido e o *pellet* ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% de DMSO estéril. As células foram congeladas em frascos de criopreservação em nitrogênio líquido.

4.2.2. Avaliação do efeito do BIS sobre células LLC-MK2

– Princípio do método

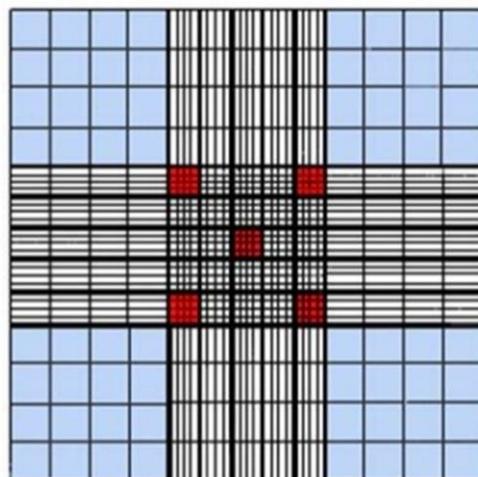
A avaliação da viabilidade celular após o tratamento com BIS foi realizada pelo método de redução do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela que, quando em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado por succinato

desidrogenases do retículo endoplasmático e da mitocôndria, produzindo um sal de cor arroxeada chamado formazan (MOSMANN, 1983). Em seguida, os cristais de formazan são excitados e podem ser solubilizados pela adição de reagentes como DMSO ou dodecilsulfato de sódio (SDS). Células não-viáveis perdem a capacidade metabólica de internalizar e clivar o MTT. A concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e é medida pela leitura da absorbância a 570 nm.

– Procedimento experimental

Culturas confluentes foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas, para que as células sincronizem na fase G_0 do ciclo celular. Em seguida, foram lavadas e tripsinizadas conforme descrito no item 4.2.1. A mistura foi transferida para tubos cônicos e centrifugada a 4000 RPM por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em DMEM e uma alíquota foi diluída de forma seriada em azul de trypan (4% p/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100. A amostra mais diluída (1:100) foi transferida para câmara de Neubauer, e a densidade celular foi determinada por contagem. Foram contadas as células presentes nos campos laterais, conforme demonstrado na figura 20.

Figura 20 – Representação esquemática da área de contagem da câmara de Neubauer.



Fonte: Adaptado de SCHITTINI, 2007.

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

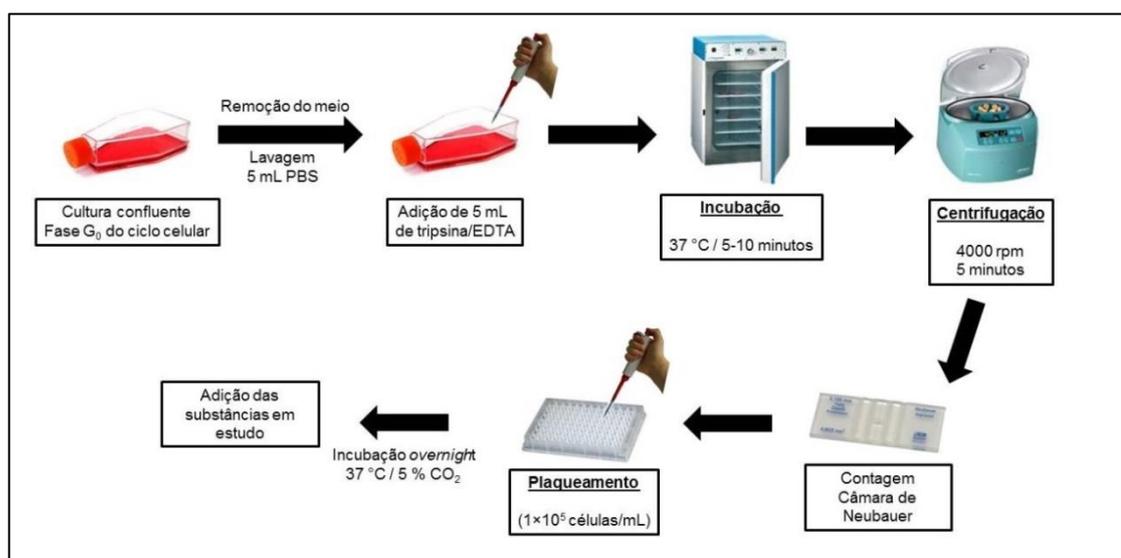
A densidade celular foi determinada conforme a fórmula a seguir:

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

onde fd = o fator de diluição usado para contagem.

A densidade celular foi ajustada para 10^5 células/mL e transferida para placas estéreis de 96 poços com fundo chato (200 μ L/poço). As placas foram incubadas *overnight* em estufa de CO₂ e, em seguida, os poços foram tratados com BIS em diferentes concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μ M) (figura 21). Como controle negativo, foram usadas células não tratadas, e células tratadas com DMSO 0,5 % foram utilizadas para avaliar o efeito citotóxico do diluente. Além disso, BZ foi tratado nas mesmas concentrações para comparação. Poços contendo apenas meio de cultura, sem adição de células ou outras substâncias, foram usados como branco.

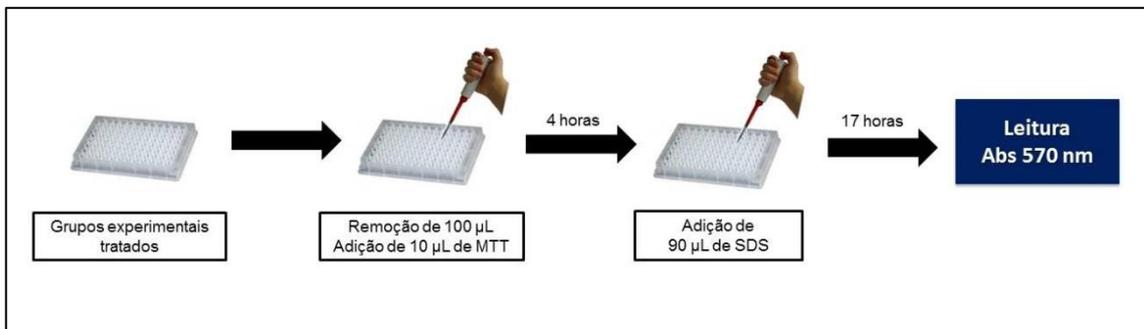
Figura 21 – Representação esquemática do procedimento de plaqueamento e tratamento de células LLC-MK2 para análise de viabilidade celular.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 24 horas de incubação, 100 µL de cada poço foi removido e 10 µL de solução de MTT (2,5 mg/mL em PBS) foi adicionado. As placas foram incubadas a 37°C no escuro por 4 horas e 90 µL de uma solução de SDS (10 % p/v em HCL 0,1 N) foram adicionados. As placas foram deixadas em repouso por 17 horas para completa solubilização dos cristais de formazan e, por fim, foi realizada leitura espectrofotométrica em leitora de microplacas (figura 22).

Figura 22 – Ensaio de redução do MTT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cálculo da viabilidade celular, foi utilizado o cálculo:

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

Onde:

AbsT = leitura de absorbância do grupo-teste;

AbsB = média das leituras da absorbância do branco; e

AbsCT = média das leituras de absorbância do grupo controle.

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

4.3 Avaliação da atividade do BIS sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

4.3.1. Cultivo e manutenção das formas epimastigotas

As formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Bioquímica de Parasitas da Universidade da USP e cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, constituído de NaCl 4g/L; Na₂HPO₄.12H₂O 11,6 g/L; KCl 0,4 g/L; glicose 2,2 g/L; triptose 5 g/L; infusão de fígado 5 g/L; hemina 25 mg/L; pH 7,4) suplementado com 10% de SBF, penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (50 mg/L). As culturas foram mantidas em garrafas plásticas estéreis, sem agitação, em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000a).

Os parasitos foram inicialmente cultivados na densidade de 5×10^4 células/mL e avaliados diariamente para determinação da curva de crescimento. Quando atingiram a fase exponencial de crescimento (6^o ao 8^o dia de cultivo), os parasitas foram repicados através da transferência de uma amostra da cultura para um novo meio LIT, mantendo a proporção inicial. Para estoque da cultura, as células foram centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos) e ressuspensas em 1 mL de meio LIT contendo 10% de DMSO estéril. Em seguida, foram estocadas em nitrogênio líquido.

4.3.2. Avaliação do efeito do bisabolol em formas epimastigotas

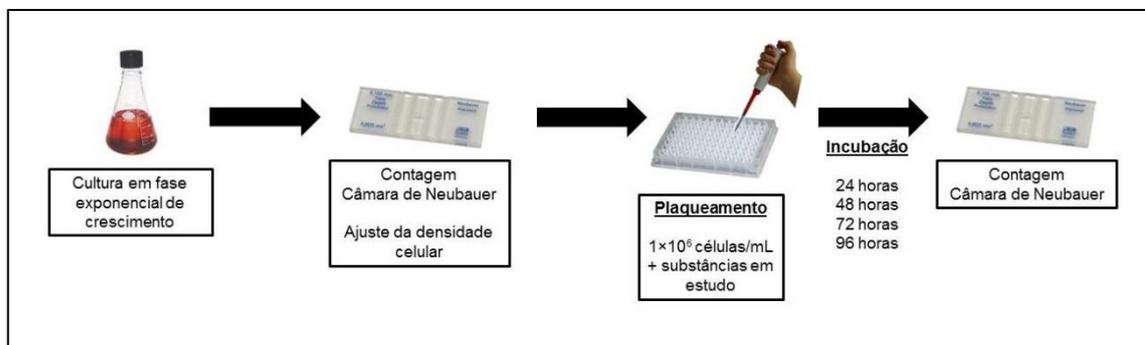
Alíquotas das culturas contendo epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram diluídas em PBS e transferidas para câmara de Neubauer. Em seguida, os parasitas foram contados para determinação da densidade celular. A contagem foi realizada no campo central, contando 1/5 da área total do campo, conforme demonstra a figura 20. O cálculo da densidade celular foi realizado usando a fórmula:

$$\text{Densidade celular (células/mL)} = \text{Contagem} \times 5 \times 10^4 \times fd$$

Onde fd = fator de diluição utilizado para contagem.

Em seguida, os parasitos foram incubados em placas estéreis de 96 poços na densidade de 1×10^6 células/mL na presença de diferentes concentrações de BIS (1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μM). Como fármaco de referência, foi utilizado o benzonidazol nas mesmas concentrações (figura 23). Adicionalmente, as células foram tratadas com DMSO 0,5% para avaliar o efeito do veículo sobre a viabilidade celular. Como controle negativo, foram usadas células tratadas com PBS.

Figura 23 – Representação esquemática do ensaio de avaliação do efeito do (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Alíquotas dos grupos experimentais foram colhidas após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação para quantificação das células viáveis (LIMA et al., 2016; MENEZES et al., 2012). Foram considerados viáveis os parasitos que preservaram formato típico e mobilidade. Por fim, o percentual de viabilidade celular foi determinado pela fórmula mostrada a seguir e a IC_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% dos parasitos) foi determinada por regressão não-linear.

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

Onde:

T = Contagem de parasitos viáveis no grupo experimental

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

4.4 Ensaio com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

4.4.1. Obtenção e de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células hospedeiras infectadas, conforme descrito previamente (LIMA et al., 2016). Células LLC-MK2 foram cultivadas na concentração de 2×10^6 células/mL em garrafas estéreis com 25 cm² de área de cultivo. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 2 % de SBF e 10^7 tripomastigotas/mL.

As garrafas foram cultivadas durante 5 a 6 dias, com substituição do meio de cultura a cada dois dias. No 5º e 6º dia pós-infecção, o meio de cultura foi colhido e centrifugado (2500 RPM por 7 minutos) para obtenção dos tripomastigotas. A densidade celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, da mesma forma como descrito para formas epimastigotas. Os tripomastigotas obtidos foram utilizados para os ensaios de avaliação do BIS e para obtenção de formas amastigotas.

4.4.2. Avaliação do efeito do BIS sobre formas tripomastigotas

10^6 tripomastigotas/mL foram incubados com (-)- α -bisabolol em diferentes concentrações (125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; e 3,9 μ M) em placas de 96 poços em estufa de CO₂. Células não-tratadas foram usadas como controle negativo e consideradas como 100% de viabilidade. DMSO 0,5% foi usado como controle de toxicidade do veículo e o benzonidazol, como fármaco de referência.

Após 24 horas de incubação, alíquotas dos grupos experimentais foram colhidas para contagem em câmara de Neubauer. O percentual de viabilidade celular foi calculado utilizando a mesma fórmula usada para as formas epimastigotas. A LC₅₀ (concentração letal para 50% dos parasitos) foi estimada por regressão não-linear. Além disso, foi calculado o índice de seletividade (Sel) do BIS sobre tripomastigotas em relação às células hospedeiras, usando a fórmula:

$$Sel = \frac{CC_{50}}{LC_{50}}$$

Onde:

Sel = Índice de seletividade

CC₅₀ = concentração que causa 50% de toxicidade em células LLC-MK2; e

LC₅₀ = concentração que causa 50% de morte em tripomastigotas.

4.5 Avaliação do efeito do BIS sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

Para avaliação do efeito do bisabolol sobre a forma intracelular de *T. cruzi*, células LLC-MK2 (10⁵ células/mL) foram cultivadas em lâminas estéreis para cultivo celular (Sigma-Aldrich), com área de cultivo de 1,8 cm²/poço, durante 24 horas em estufa de CO₂. Em seguida, as células foram infectadas conforme descrito no item anterior. Após 48 horas de infecção, o meio de cultura foi substituído e os poços foram tratados com BIS (40, 20 e 10 µM) e BZ (257 e 514 µM).

As lâminas de cultivo foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ e, em seguida, as lâminas foram cuidadosamente lavadas com água deionizada. Para fixação das células, as lâminas foram embebidas em solução de Bouin. Após lavagem com água destilada e etanol 70%, foram mergulhadas em metanol por 2 minutos. Em seguida, foram coradas utilizando corante Giemsa (diluído a 5% v/v em água deionizada) durante 20 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas mais uma vez e, após secagem, montadas em lâmina utilizando entelan (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000b).

O efeito anti-amastigota do bisabolol e do benzonidazol foi determinado pela contagem de 300 células em cada poço, realizada em microscópio óptico. Em cada célula infectada, foi realizada a contagem de amastigotas internalizados. Além disso, as lâminas foram fotografadas (Microscópio Trinocular Motic e Moticam Software 2.0.) para evidenciar o efeito biológico induzido por BIS. Dessa forma, foi calculado o percentual de células infectadas, a quantidade de amastigotas por células e o índice de sobrevivência (Sul), usando as fórmulas (MARÍN et al., 2015):

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

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

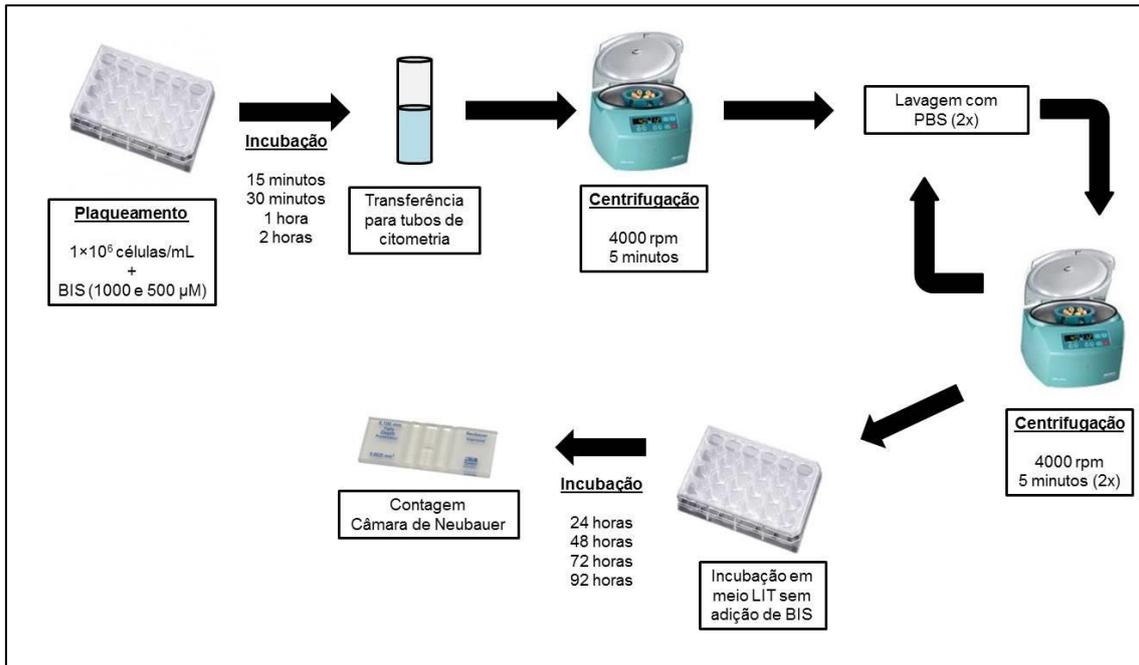
$$\text{SuI} = \text{n}^\circ \text{ de células infectadas} \times \text{amastigotas/células infectadas}$$

4.6 Ensaio de recuperação de crescimento

Para investigar o efeito do BIS sobre *T. cruzi* em pequenos períodos de tempo, epimastigotas em fase exponencial de crescimento (10^6 células/mL) foram cultivados com BIS em altas concentrações (1000 e 500 μM), em placas de cultura estéreis de 24 poços. Os grupos experimentais foram incubados por 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas.

Em seguida, os parasitos foram centrifugados (4000 RPM por 5 minutos) e lavados com PBS 2 vezes. Os parasitos foram cultivados em meio LIT fresco, sem adição de BIS. As culturas foram incubadas em estufa BOD pelo período total de 96 horas. A cada 24 horas, alíquotas foram colhidas para contagem em câmara de Neubauer e determinação da densidade celular (figura 24), conforme descrito nos itens anteriores (KESSLER et al., 2013).

Figura 24 – Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

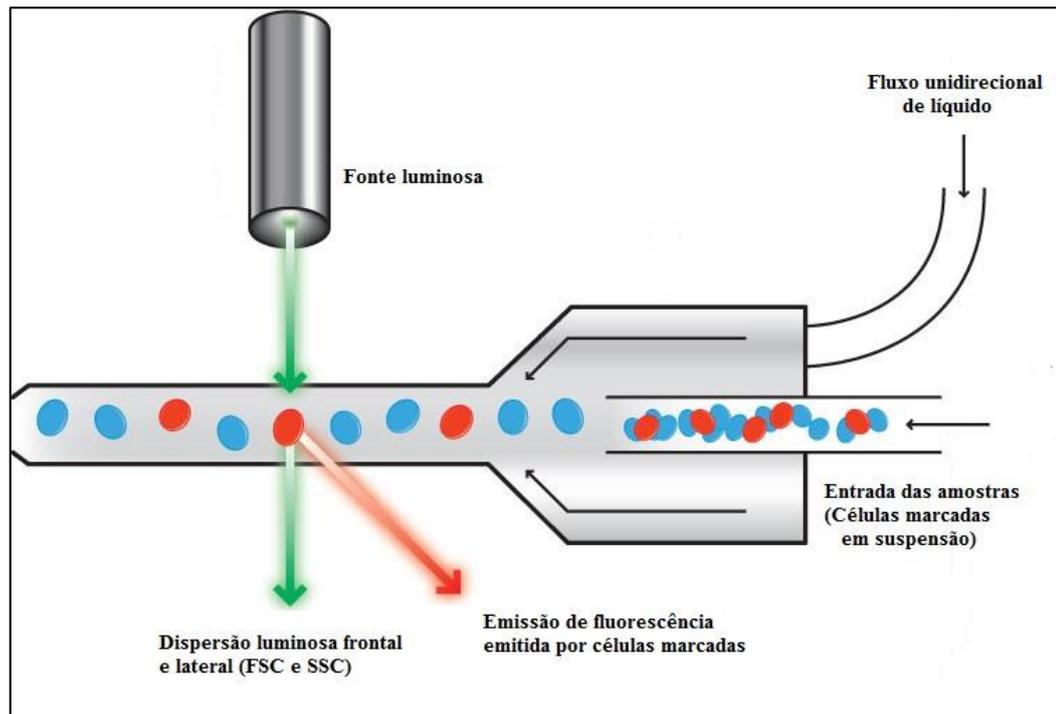
4.7 Análises por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método de análise individual de partículas desenvolvido por Andrew Moldavan em 1934, em que células em suspensão eram contadas por detecção fotoelétrica. Em 1949, Wallace Coulter aprimorou essa técnica, através do princípio da impedância, em que as células eram contadas e classificadas por seu tamanho, de acordo com o impedimento da passagem da corrente elétrica em uma solução eletrolítica (BRAGA et al., 2016). No ano de 1972, foram desenvolvidos equipamentos chamados de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*), que, utilizando os princípios de fluorescência, permitiram o aumento da sensibilidade e da versatilidade do método.

A contagem e caracterização das partículas por citometria de fluxo é realizada pela combinação dos princípios de focagem hidrodinâmica e fluorescência (figura 25). As células são injetadas no centro de um feixe de solução salina em fluxo contínuo. Dessa forma, elas são forçadas a passar individualmente pela câmara de leitura, atravessando um ou mais feixes de luz de comprimento de onda específicos. Ao passarem pela câmara de leitura, as células causam a dispersão do feixe luminoso em várias direções. A luz que sofre pouca ou nenhuma dispersão –

chamada de FSC (*Forward Scatter*) – é usada como medida do tamanho da célula. A dispersão lateral de luz, chamada de *Side Scatter* (SSC), acontece devido ao encontro do feixe luminoso com as estruturas intracelulares, como organelas, núcleo e grânulos. Dessa forma, o SSC é uma medida da complexidade celular.

Figura 25 – Princípio de análise celular por citometria de fluxo.



Fonte: Adaptado de <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-how%20it%20works-Diagram.jpg>.

Além disso, quando células ou outras partículas são marcadas com fluorocromos, o feixe luminoso provoca a excitação dessas moléculas e consequente emissão de luz em um comprimento de onda diferente. Dessa maneira, as células podem ser classificadas quanto à presença de marcadores citoplasmáticos e de membrana específicos, além de permitir a detecção de mediadores intracelulares relacionados ao metabolismo normal e/ou patológico (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012). Todas essas informações são colhidas por detectores específicos e transformadas em sinais eletrônicos, que podem ser avaliados e armazenados de maneira simples.

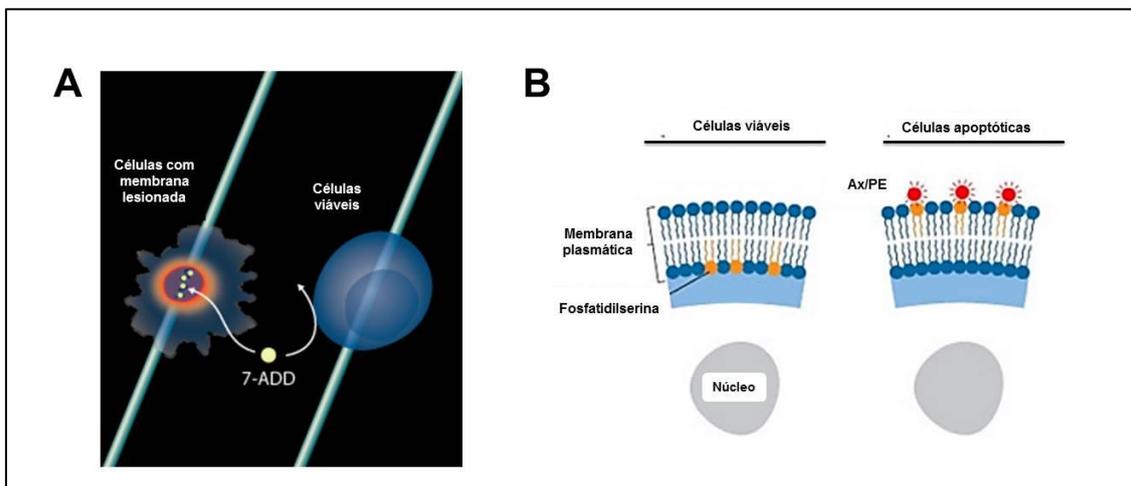
4.7.1. Marcação com Anexina V/PE e 7-AAD

- Princípio do método

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

O 7-AAD é uma molécula capaz de se intercalar especificamente no DNA. Entretanto, não é capaz de penetrar em células com membrana íntegra. Dessa forma, células com alta marcação para 7-AAD são consideradas células necróticas, por perda de integridade de membrana (LECOEUR; DE OLIVEIRA-PINTO; GOUGEON, 2002). A anexina V é uma proteína de 36 KDa, que, na presença de íons cálcio, tem alta afinidade pela fosfatidilserina. Dessa forma, a Ax/PE é usada para avaliar a externalização de fosfatidilserina como marcador de apoptose (ATALE et al., 2014) (figura 26).

Figura 26 – Princípio da marcação dos fluorocromos.



Legenda: (A) 7-AAD se liga ao DNA das células com membrana plasmática lesionada; (B) Ax/PE se liga à fosfatidilserina translocada para o folheto externo de células em processo de apoptose.

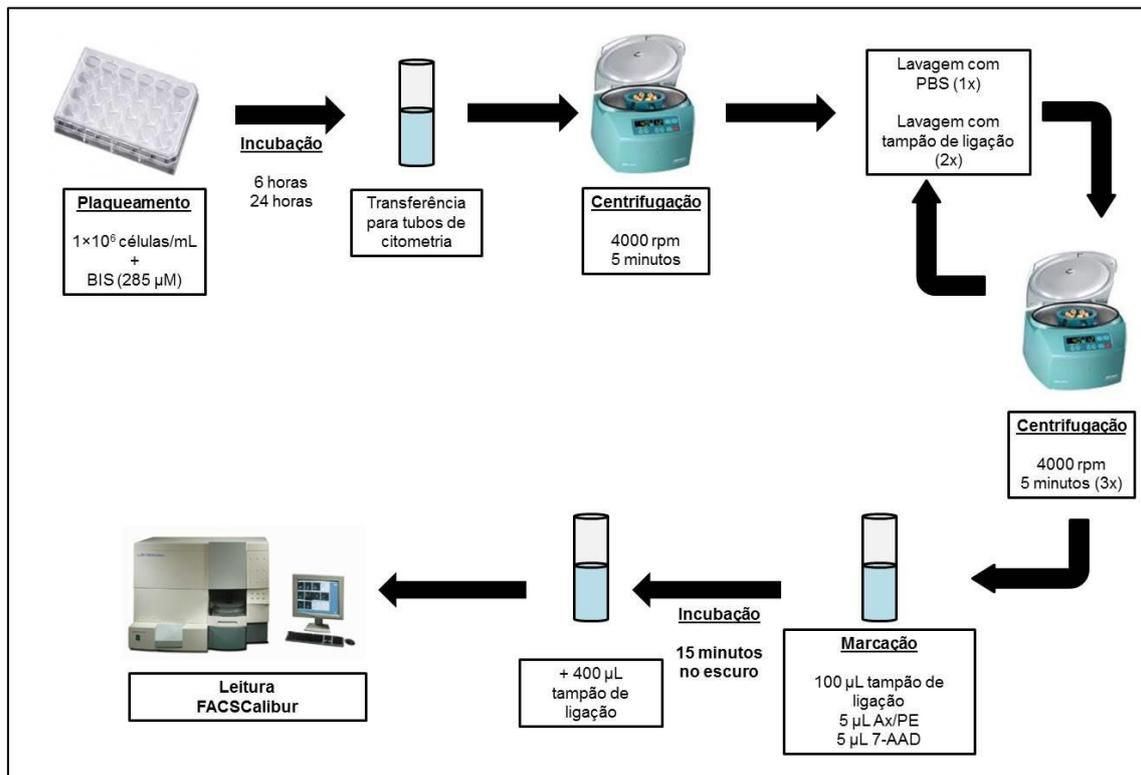
Fonte: Adaptado de <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad> e <https://www.einstein.yu.edu/research/facilities/facs/page.aspx?id=22637>

- Procedimento experimental

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas na densidade de 10^6 células/mL na presença de BIS (285 μ M) por 6 e 24 horas em estufa BOD. Em seguida, as células foram transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a

4000 RPM por 5 minutos e lavadas com PBS uma vez e com tampão de ligação (pH 7,4; composto de hepes 10 mM; NaCl 140 mM e CaCl₂ 2,5 mM) duas vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão de ligação, 5 µL de 7-AAD (0,5 mg/mL) e 5 µL de Ax/PE. O procedimento foi realizado utilizando um kit comercial (Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences) e respeitando as orientações do fabricante. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences) (figura 27).

Figura 27 – Protocolo de processamento das amostras para análise de necrose e apoptose por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cada tubo, um mínimo de 10⁴ células foram analisadas, para quantificação do percentual de células não-marcadas e individual ou duplamente marcadas com 7-AAD e Ax/PE. Para isso, foi usado laser de argônio (488 nm) para excitar os fluorocromos. As células marcadas com Ax/PE foram lidas pelo detector FL₂ (563 a 606 nm, fluorescência amarela), enquanto as células marcadas com 7-

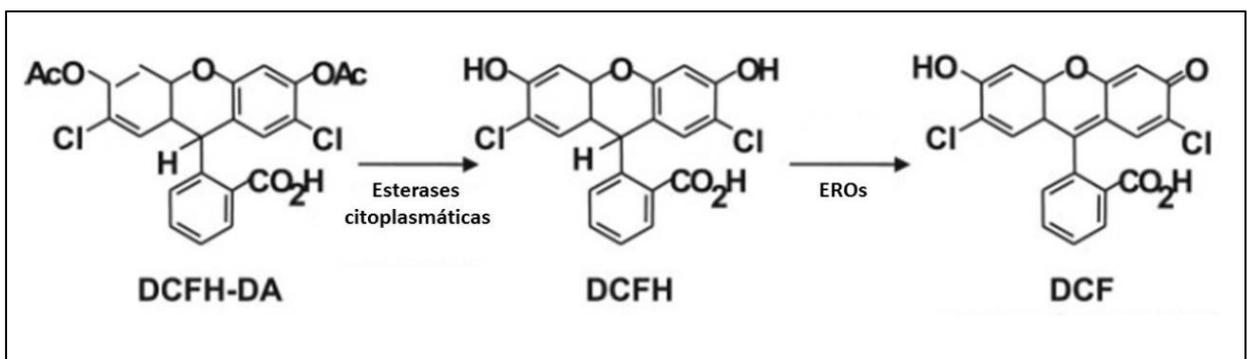
AAD foram lidas em comprimento de onda de 615 a 645 nm (fluorescência vermelha, detector FL₃).

4.7.2. Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

- Princípio do método

A presença aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma de células epimastigotas tratadas com BIS foi avaliada utilizando o reagente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Essa é uma molécula lipofílica que, uma vez internalizada nas células, é clivada por esterases citoplasmáticas em DCFH (forma reduzida de 2',7'-diclorofluoresceína), que não é capaz de atravessar as membranas. DCFH reage com EROs intracitoplasmáticas produzindo DCF (forma oxidada de 2',7'-diclorofluoresceína). (figura 28). Essa última molécula emite fluorescência verde, de forma que a intensidade de fluorescência emitida pela célula é diretamente proporcional à concentração intracitoplasmática de EROs (CHEN et al., 2010b).

Figura 28 – Princípio de reação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) com espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.



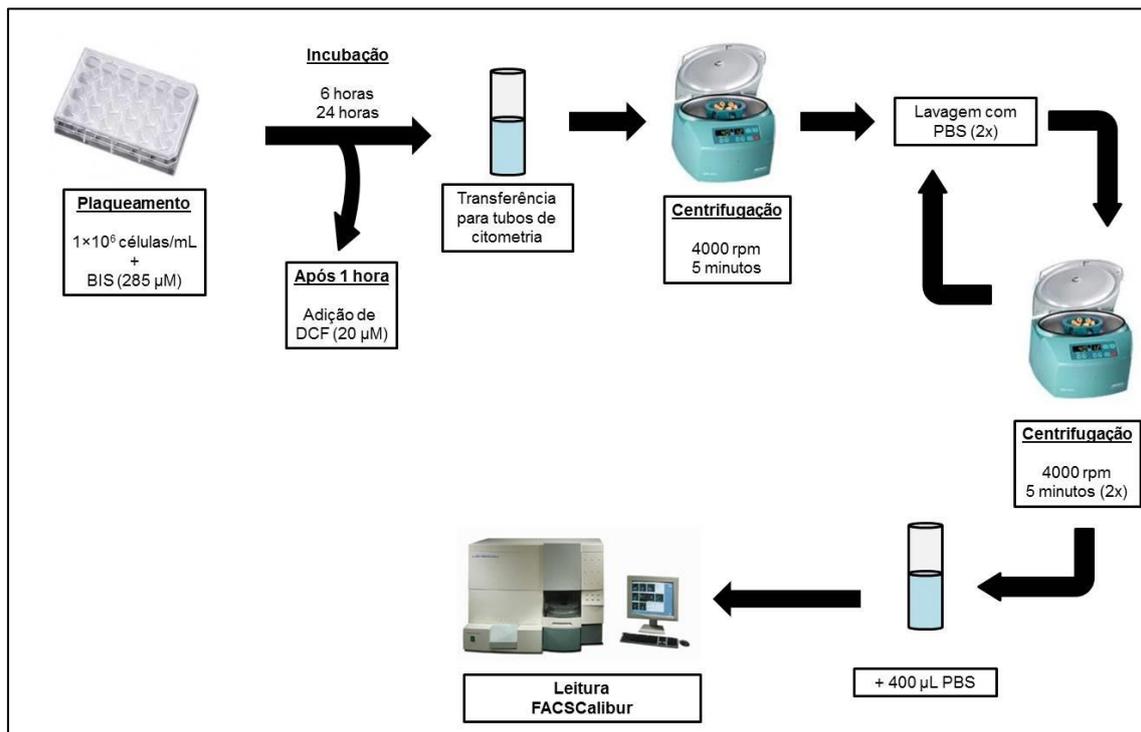
Fonte: Adaptado de DIKALOV; GRIENDLING; HARRISON, 2007.

- Procedimento experimental

10⁶ epimastigotas/mL foram adicionados a placas de 24 poços na presença de BIS (285 µM). Após 1 hora de incubação, 10 µL de uma solução de DCFH-DA (2 mM em DMSO), obtendo concentração final de 20 µM. Após 6 e 24 horas de

incubação com BIS, as células foram colhidas, centrifugadas (4000 RPM por 5 minutos), lavadas com PBS 2 vezes e ressuspensas em 500 µL de PBS. Por fim, as células foram analisadas em citômetro de fluxo pelo detector FL₁ (fluorescência verde, de 515 a 545 nm) (figura 29).

Figura 29 – Procedimento experimental para marcação de formas epimastigotas com diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O nível de marcação em cada grupo foi analisado pela média geométrica da intensidade de fluorescência, conforme descrito por KESSLER et al. (2013). Os resultados foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, utilizando a fórmula:

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

Onde:

mTESTE = média geométrica do grupo a ser analisado;

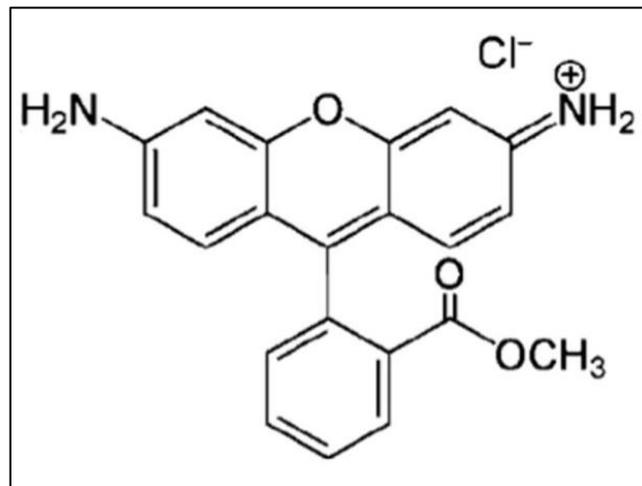
mCONTROLE = valor médio da média geométrica do grupo controle.

4.7.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

- Princípio do método

O potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123) (figura 30) (JOHNSON et al., 1980; POKORNÝ et al., 2014).

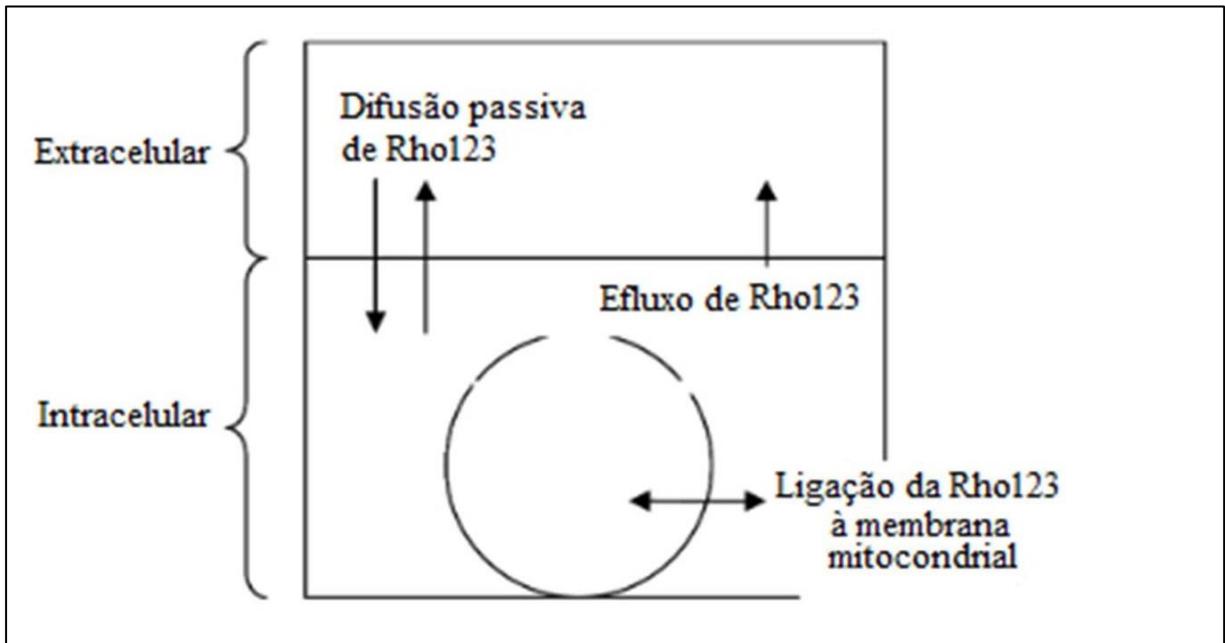
Figura 30 – Estrutura química da rodamina 123.



Fonte: JOHNSON et al., 1980.

A Rho123 é um corante lipofílico e catiônico que, em condições normais, se acumula no espaço intermembrânico mitocondrial por afinidade com os íons hidrogênio, emitindo fluorescência vermelha (figura 31). Quando existe lesão mitocondrial, há uma redução da concentração de íons H^+ no espaço intermembrânico, o que reduz o acúmulo de Rho123. No citoplasma, a Rho123 emite fluorescência verde. Dessa forma, alterações no $\Delta\Psi_m$ podem ser medidas utilizando a Rho123 através da medida da redução da fluorescência verde ou do aumento da fluorescência vermelha (ZHANG et al., 2011).

Figura 31 – Mecanismo de marcação mitocondrial utilizando a rodamina 123 (Rho123).

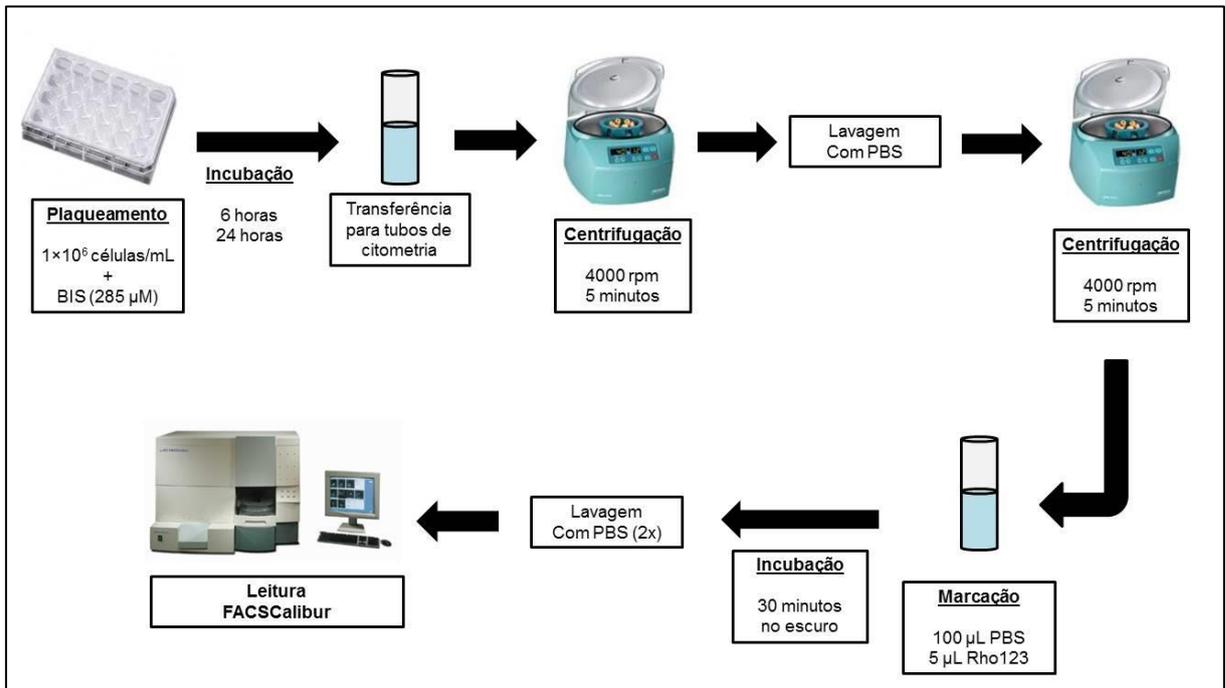


Fonte: Adaptado de YANG et al., 2012.

- Procedimento experimental

(-)- α -bisabolol (285 μ M) foi adicionado a formas epimastigotas (10^6 células) em placas de 24 poços. Após 6 e 24 horas de incubação, as células foram transferidas para tubos, centrifugadas e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e foi adicionado 5 μ L de solução de Rho123 (200 μ g/mL em etanol absoluto), obtendo concentração final de 10 μ g/mL. As amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em PBS (500 μ L/tubo). Finalmente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando detector FL₂ (figura 32) (SAMPAIO et al., 2016). Os resultados foram avaliados pela intensidade relativa de fluorescência, calculado conforme descrito no item anterior.

Figura 32 – Protocolo de avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo.



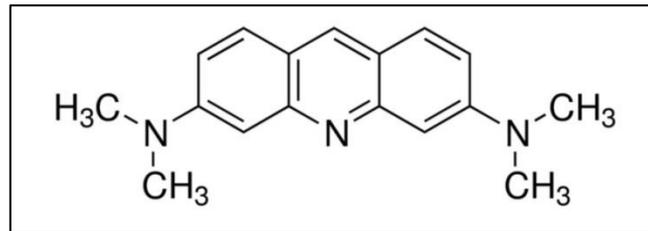
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.4. Avaliação da tumefação de reservossomos

- Princípio do método

O volume dos reservossomos de epimastigotas tratados com BIS foi avaliado utilizando laranja de acridina (AO, *acridine orange*) (figura 33). Esse corante tem tropismo por compartimentos ácidos intracelulares, de forma que se acumula nos reservossomos de *Trypanosoma cruzi*, emitindo fluorescência alaranjada. A tumefação dos lisossomos, que é uma das alterações indicativas de morte celular por autofagia, causa aumento do acúmulo de AO, e essas células podem ser analisadas por citometria de fluxo (ATALE et al., 2014; KESSLER et al., 2013).

Figura 33 – Estrutura química da laranja de acridina.

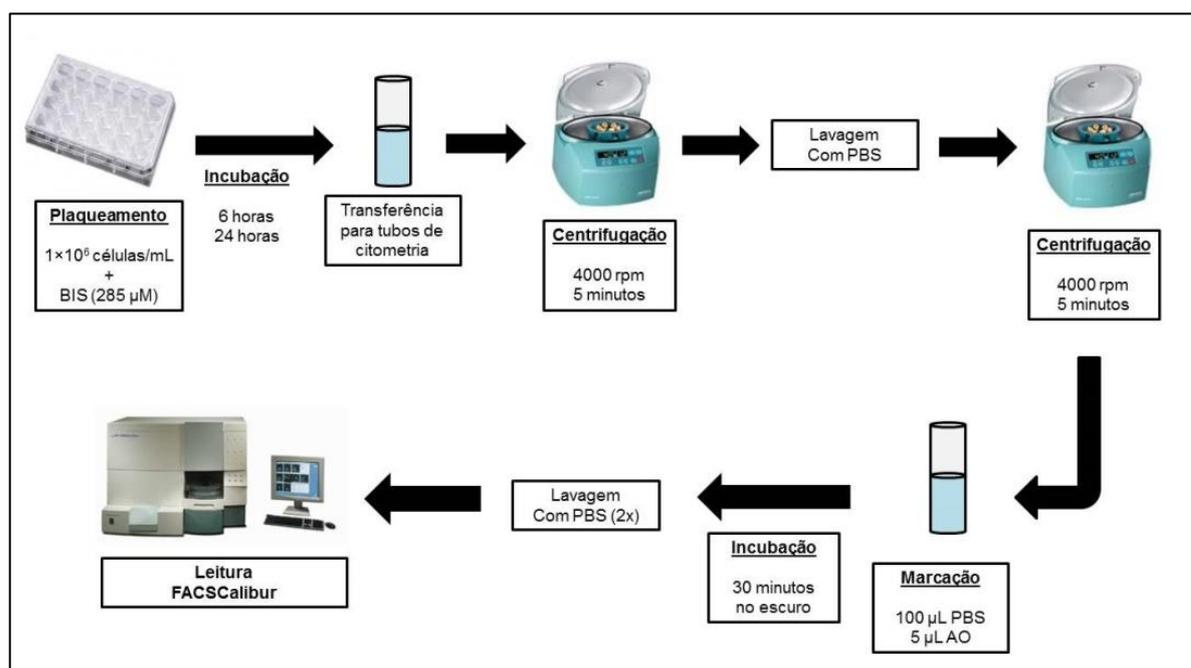


Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/235474?lang=pt®ion=BR>

- Procedimento experimental

Após 6 e 24 horas de incubação com BIS (285 μM), as formas epimastigotas foram colhidas e lavadas. Em seguida, foram ressuspensas em 100 μL de PBS incubadas com 5 μL de solução de AO (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em DMSO), obtendo concentração final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após incubação por 15 minutos no escuro, as células foram lavadas 2 vezes e analisadas no citômetro, usando detector FL₃ (KESSLER et al., 2013) (figura 34). Os resultados foram expressos como intensidade de fluorescência relativa.

Figura 34 – Protocolo experimental de marcação de reservossomos de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e avaliação por citometria de fluxo.



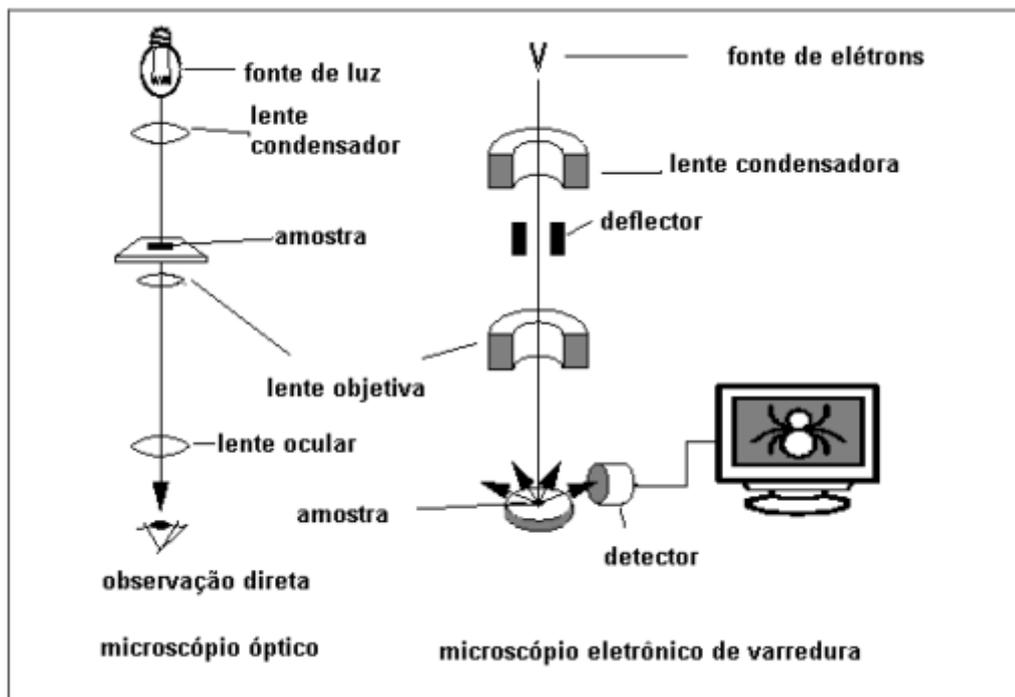
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura

- Princípio do método

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica extremamente versátil, útil para caracterização microestrutural em diversas áreas do conhecimento, como ciência de materiais, engenharia, geociências e ciências biológicas. O microscópio de varredura é capaz de analisar estruturas com tamanho entre 0,8 a 1,4 nm, utilizando um feixe de elétrons como Fonte de energia. Ao encontrar a amostra, os elétrons são dispersos e detectados para composição das imagens (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A figura 35 demonstra a diferença entre os princípios da microscopia óptica e da MEV.

Figura 35 – Desenho esquemático para comparação entre microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007.

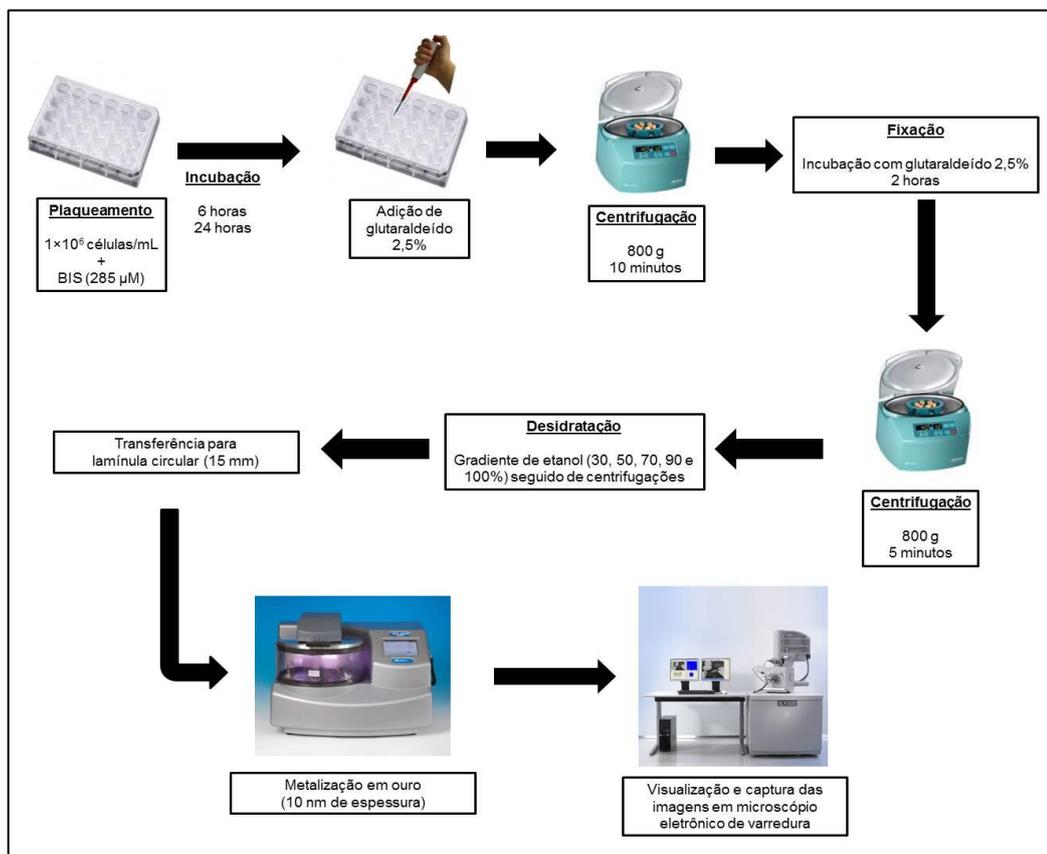
- Procedimento experimental

Para avaliação das alterações induzidas por BIS na ultraestrutura de *T. cruzi*, as formas epimastigotas foram incubadas com BIS por 24 horas (285 µM).

Após esse período, foi adicionado glutaraldeído (concentração final 2,5%) em cada amostra, e elas foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em solução de glutaraldeído a 2,5% e incubado por 2 horas.

As amostras fixadas foram novamente centrifugadas e expostas a gradiente crescente de etanol (30, 50, 70 90 e 100%) para desidratação, seguida de centrifugação a 800 g por 5 minutos. Por fim, as células foram transferidas para a superfície de lamínulas circulares de 15 mm previamente limpas e postas a secagem em estufa. As lâminas foram cobertas com camada de ouro (espessura de 20 nm) utilizando a Metalizadora QT150 ES-Quorum e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG-FEI, para observação de alterações na estrutura tridimensional das formas de vida de *T. cruzi* (VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009) (figura 36).

Figura 36 – Processamento e análise de amostras de *Trypanosoma cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão.

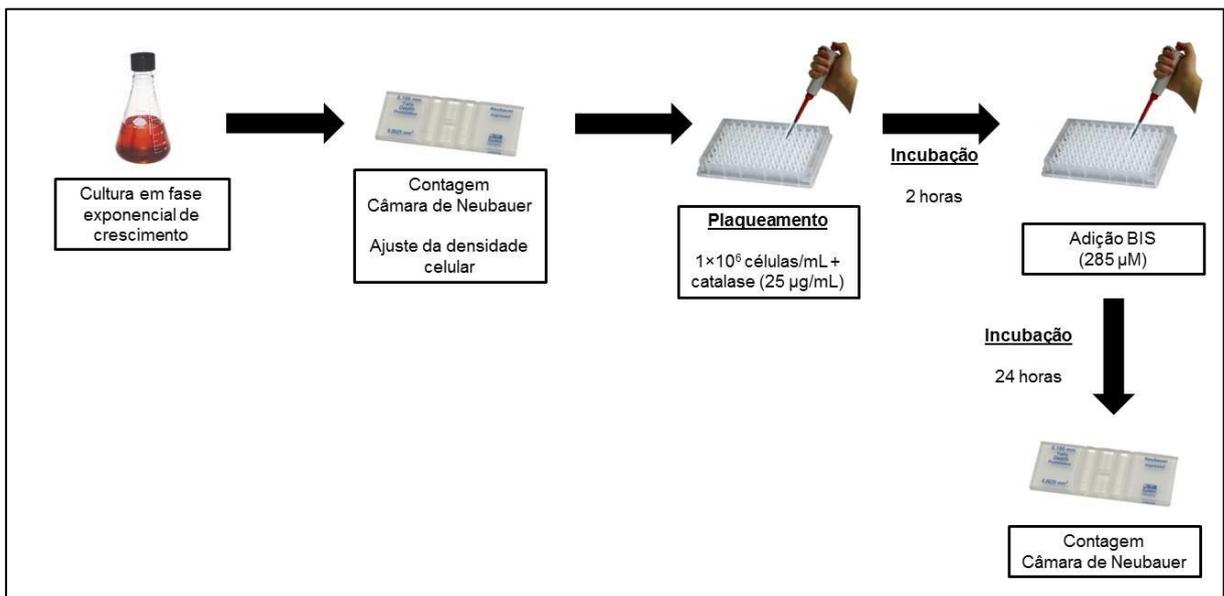


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Bloqueio da atividade antiparasitária do BIS com catalase

Para investigar o papel do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) extracelular sobre o efeito do BIS em *T. cruzi*, o presente modelo foi utilizado, a partir de adaptações de modelos prévios (PEREIRA, 2015) (figura 37). As formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram cultivadas na densidade de 10^6 células/mL, conforme descrito nos itens anteriores, na presença de catalase ($25\mu\text{g/mL}$ diluído em PBS). Após 2 horas de incubação, BIS foi adicionado, obtendo concentração final de $285\mu\text{M}$. A densidade celular foi determinada após 24 horas de incubação para determinação do percentual de viabilidade celular.

Figura 37 – Ensaio de bloqueio da atividade farmacológica do (-)- α -bisabolol com catalase.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Investigação da inibição da enzima gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH)

4.10.1. Docking molecular

Os ensaios *in silico* foram realizados no Laboratório de Engenharia de Materiais e da Computação de Sobral (LEMCS), sob orientação do prof. Dr. Ricardo Santos. A avaliação da interação teórica do BIS com *tcGAPDH* foi realizada em

comparação com o sítio ocupado pela chalepina, uma cumarina derivada de plantas da família Rutáceas. Ela foi escolhida por possuir efeito biológico bem definido e estrutura cristalográfica disponível em bancos de dados computacionais (MENEZES et al., 2003a).

Para isso, a estrutura tridimensional do complexo *tcGAPDH*-chalepina foi obtida do RBSC Protein Data Bank (código PDB:1K3T), um website de livre acesso que contém informações sobre a estrutura tridimensional de diversas proteínas (PAVÃO et al., 2002). Em seguida, a chalepina foi removida do complexo, obtendo-se a estrutura de *tcGAPDH* isolada.

A otimização geométrica da estrutura do (-)-bisabolol (ChemSpider ID390796) foi realizada utilizando um método semiempírico PM7 pelo programa MOPAC2012 (disponível em <http://openmopac.net>). A identificação dos potenciais sítios de ligação entre a molécula otimizada de BIS e *tcGAPDH* foi realizado pelo método de *docking* molecular, utilizando o programa Autodocking Vina (Molecular Graphics Lab) (PIERCE et al., 2014). Nesse programa, é realizada a busca de todos os possíveis modos de ligação entre proteína-alvo e ligante.

Cada possível conformação foi avaliada por escores baseados na energia, complementaridade e forças eletrostáticas (MINTSERIS et al., 2007). O complexo *tcGAPDH*-chalepina foi usado para comparar a posição de do ligante no sítio de ligação. Gráficos moleculares foram construídos usando o software UCSF Chimera 1.8 package (PETTERSEN et al., 2004).

4.10.2. Avaliação da inibição enzimática *in vitro*

Para determinação da atividade enzimática de *tcGADPH*, foi utilizado um kit comercial (Abcam®, Cambridge, UK) e respeitando as orientações. Resumidamente, 10^8 epimastigotas foram tratados com BIS (285 μ M) por 15 min, 30 min, 1 hora e 2 horas. Em seguida, foram centrifugadas (4000 RPM, 5 minutos), lavadas com PBS gelado duas vezes e, em seguida, ressuspensos em tampão de reação gelado. Após 10 minutos em repouso para lise celular, as amostras foram mais uma vez centrifugadas. Finalmente, 50 μ L do sobrenadante de cada amostra (contendo a enzima de interesse) foram adicionados a 50 μ L de mistura reacional (composta de tampão de reação, gliceraldeído-3-fosfato e NAD^+) em placas de 96 poços. As

placas foram incubadas sob agitação a 37°C e lidas por espectrofotometria após 0, 3, 6, 9 e 12 minutos a 450 nm.

Em paralelo, parasitos não tratados foram submetidos ao protocolo para determinação da atividade basal. Além disso, foi realizada uma curva-padrão, utilizando amostra fornecida pelo kit. As leituras de absorbância foram utilizadas para determinação da atividade enzimática de *tcGAPDH* nos grupos experimentais, seguindo as orientações do fabricante.

4.11 Análise estatística

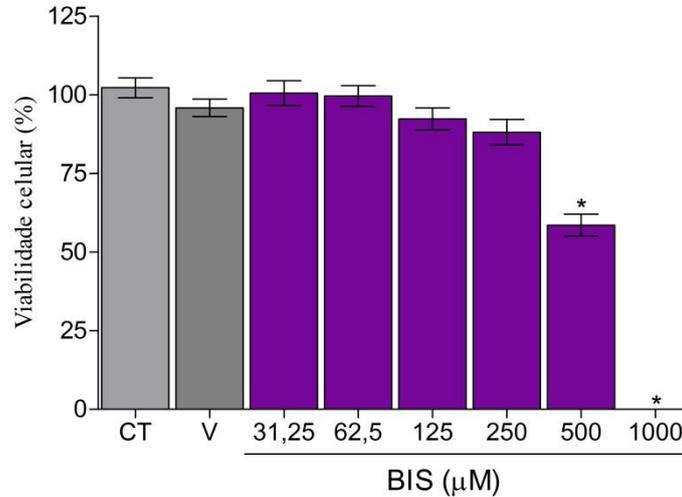
Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com mínimo de n=3 por experimento. Os dados numéricos foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM) e analisados por *one-way* e/ou *two-way* ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet e/ou pós-teste de Bonferroni. A análise foi realizada utilizando os programas Microsoft Office® Excel 2010 e GraphPad Prism® versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade do (-)- α -bisabolol em células hospedeiras LLC-MK2

As células LLC-MK2 foram selecionadas como células hospedeiras de *Trypanosoma cruzi* para esse estudo. Dessa forma, elas foram submetidas ao teste do MTT para avaliação do efeito citotóxico da substância. Foi observada redução da viabilidade celular nos grupos tratados com as concentrações mais altas de BIS (1000 e 500 μ M), conforme mostrado na figura 38. A concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade (CC_{50}) foi $528 \pm 34 \mu$ M. Os valores de viabilidade celular estão expressos na tabela 2.

Figura 38 – Efeito citotóxico do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre células hospedeiras LLC-MK2, avaliado pelo método do MTT.



Legenda: CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Viabilidade celular (média \pm EPM) das células LLC-MK2 submetidas ao método do MTT após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).

	Viabilidade Celular (%)
Controle	102,2 \pm 3,18
Veículo	95,85 \pm 2,78
BIS 31,25 μ M	100,5 \pm 3,91
BIS 62,5 μ M	99,58 \pm 3,29
BIS 125 μ M	92,28 \pm 3,54
BIS 250 μ M	88,10 \pm 7,06
BIS 500 μ M	58,57 \pm 3,50*
BIS 1000 μ M	0,00 \pm 0,00*

Legenda: Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

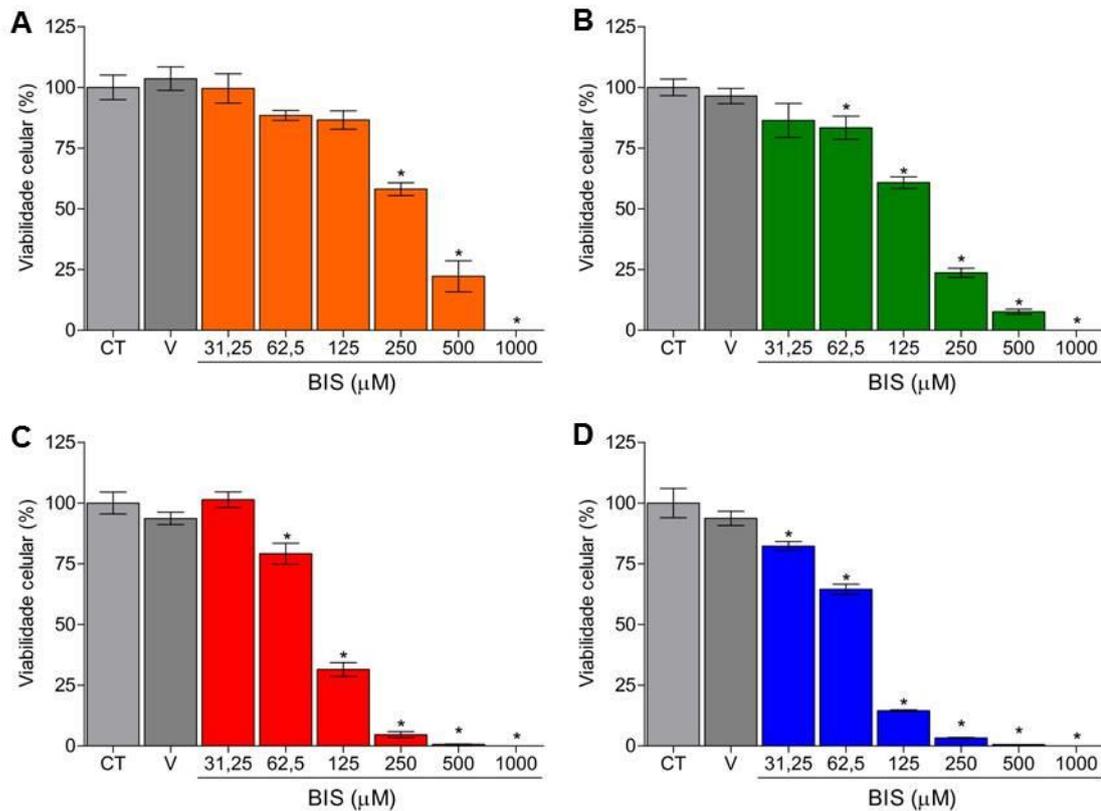
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Efeito antiparasitário do (-)- α -bisabolol sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foram tratadas com BIS por 24, 48 72 e 96 horas para avaliação do potencial tripanocida dessa substância. Foi observado, conforme demonstrado na figura 39, efeito inibitório crescente sobre essas células. Os parasitos, após contato com BIS, apresentavam-se com diversas alterações morfológicas, como ausência de flagelo, perda de motilidade e alteração de formato típico. Os grupos tratados com o diluente (DMSO 0,5%) não apresentaram redução na viabilidade celular nos tempos analisados. Foram obtidos, por regressão não-linear, os valores a seguir: $IC_{50}/24h = 285 \pm 20 \mu M$; $IC_{50}/48h = 144,7 \pm 8,6 \mu M$; $IC_{50}/72h = 97,3 \pm 3,25 \mu M$; e $IC_{50}/96h = 59,8 \pm 4,5 \mu M$.

Os valores de viabilidade celular estão exibidos na tabela 3 e demonstram ainda que o efeito observado foi dependente de tempo. Os percentuais de viabilidade para os grupos tratados apresentaram-se progressivamente reduzidos com o aumento do tempo de incubação.

Figura 39 – Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.



Legenda: As figuras representam o tratamento por (A) 24 horas, (B) 48 horas, (C) 72 horas e (D) 96 horas. CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Viabilidade celular (média \pm EPM) das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).

	Viabilidade celular (%)			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Controle	100 \pm 5,04	100 \pm 3,39	100 \pm 4,49	100 \pm 12,1
Veículo	103,6 \pm 4,83	96,44 \pm 3,16	93,70 \pm 2,54	93,67 \pm 5,93
BIS 31,25 μ M	99,58 \pm 6,03	86,41 \pm 6,99	101,4 \pm 3,19	82,31 \pm 3,67*#
BIS 62,5 μ M	88,44 \pm 2,05	83,37 \pm 4,78*	79,13 \pm 4,30*	64,50 \pm 4,26*#
BIS 125 μ M	86,57 \pm 3,81	60,79 \pm 2,37*#	31,49 \pm 2,84*#	14,56 \pm 0,74*#
BIS 250 μ M	58,13 \pm 2,60*	23,69 \pm 1,91*#	4,69 \pm 1,25*#	3,32 \pm 0,49*#
BIS 500 μ M	22,25 \pm 6,40*	7,65 \pm 1,11*	0,69 \pm 0,16*#	0,55 \pm 0,11*#
BIS 1000 μ M	0,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0*

Legenda: Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet e two-WAY ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com a mesma concentração no tempo 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

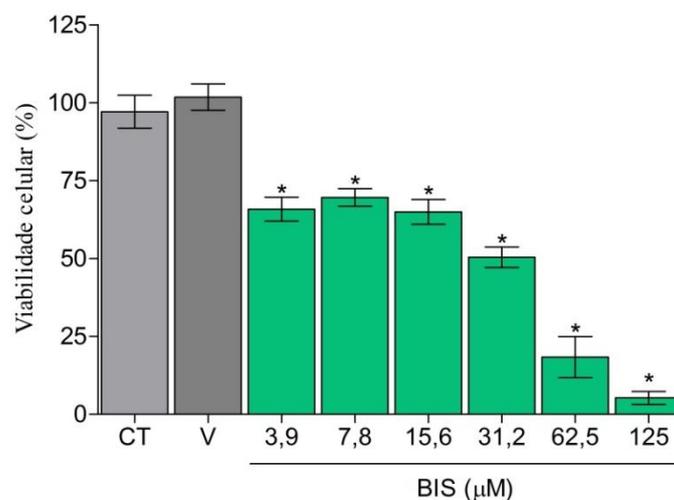
5.3 Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas, conforme descrito na seção anterior. Após incubação com bisabolol em diversas concentrações, foi observado que ele foi capaz de causar morte de *T. cruzi* em todas as concentrações testadas. Os grupos testados com concentrações de BIS acima de 125 μ M (250, 500 e 100 μ M) apresentaram 100% de morte em todos os experimentos, conforme mostrado na tabela 4. A figura 40 demonstra o efeito da substância em estudo sobre formas tripomastigotas nas concentrações de 3,9 a 125 μ M. O grupo tratado com DMSO

(concentração final 0,5%) não demonstrou morte celular, confirmando que o veículo usado para dissolução do BIS é inerte para o parasito. Após análise de regressão não-linear, foi obtido $LC_{50} = 20 \pm 3,84 \mu M$.

Para identificar se BIS apresenta efeito tripanocida e citotoxicidade adequados, foi calculado o índice de seletividade (Sel), através da divisão entre a CC_{50} (concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade em células hospedeiras LLC-MK2) e a LC_{50} (concentração capaz de causar 50% de morte em formas tripomastigotas). Conforme demonstrado na tabela 5, obtido resultado de $Sel = 26,5$. Isso indica que BIS mostrou ser 26,5 vezes mais seletivo para *T. cruzi* em relação às células hospedeiras. A tabela 5 também resume os valores de CC_{50} , IC_{50} e LC_{50} encontrados nesse trabalho.

Figura 40 – Efeito tripanocida do (-)- α -bisabolol (BIS) sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y após 24 horas de incubação.



Legenda: CT = grupo controle; V = grupo veículo (DMSO 0,5%). Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Viabilidade celular (média \pm EPM) das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após incubação com (-)- α -bisabolol (BIS).

	Viabilidade celular (%)
Controle	97,10 \pm 5,30
Veículo	101,8 \pm 4,25
BIS 3,9 μ M	65,83 \pm 3,85*
BIS 7,8 μ M	69,59 \pm 2,86*
BIS 15,6 μ M	64,97 \pm 4,00*
BIS 31,25 μ M	50,40 \pm 3,28*
BIS 62,5 μ M	18,37 \pm 6,55*
BIS 125	5,249 \pm 5,25*
BIS 250	0,0 \pm 0,0*
BIS 500	0,0 \pm 0,0*
BIS 1000	0,0 \pm 0,0*

Legenda: Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Resumo da atividade biológica *in vitro* do (-)- α -bisabolol e do benzonidazol sobre células LLC-MK2 e formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

	Tempo de incubação			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<u>(-)-α-Bisabolol</u>				
CC ₅₀ (LLC-MK2)	528 ± 34 μ M	-	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	285 ± 20 μ M	144,7 ± 8,6 μ M	97,33 ± 3,25 μ M	59,8 ± 4,5 μ M
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	20 ± 3,84 μ M	-	-	-
Sel	26,5	-	-	-
<u>Benzonidazol</u>				
CC ₅₀ (LLC-MK2)	616 ± 51 μ M	-	-	-
IC ₅₀ (Epimastigotas)	218 ± 55 μ M	61 ± 10 μ M	16.5 ± 3 μ M	12.7 ± 2 μ M
LC ₅₀ (Tripomastigotas)	256 ± 77 μ M	-	-	-
<u>Sel</u>	2,4	-	-	-

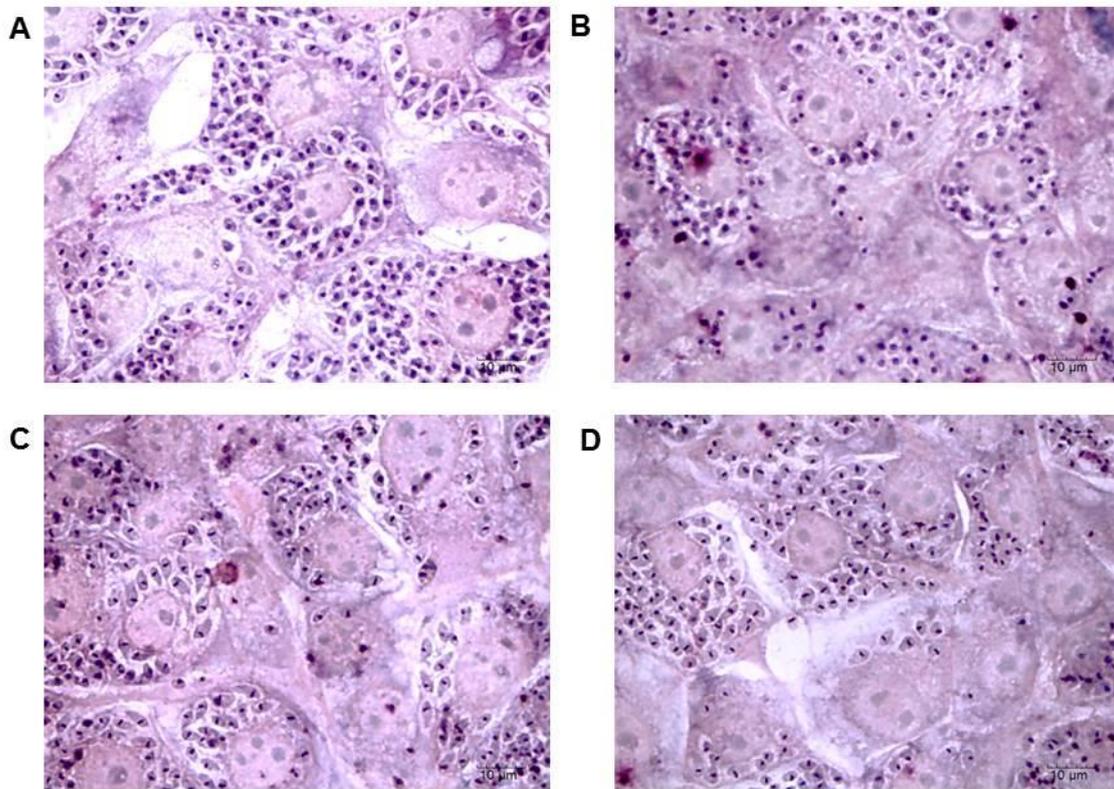
Legenda: CC₅₀ = concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade em células hospedeiras; IC₅₀ = concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das formas epimastigotas; LC₅₀ = concentração capaz de causar morte de 50% das formas tripomastigotas; Sel = Índice de seletividade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Efeito antiamastigota do (-)- α -bisabolol

O efeito antiamastigota do BIS foi avaliado em lâminas contendo células LLC-MK2 infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Após 24 horas de incubação com BIS nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M, as lâminas foram analisadas para contagem do número de células infectadas e a contagem de amastigotas. As figuras 44, 45, 46 e 47 apresentam a fotomicrografia dos grupos experimentais submetidos a esse método.

Figura 41 – Fotomicrografia de células LLC-MK2 infectadas com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y submetidas ao ensaio de atividade anti-amastigota do (-)- α -bisabolol.

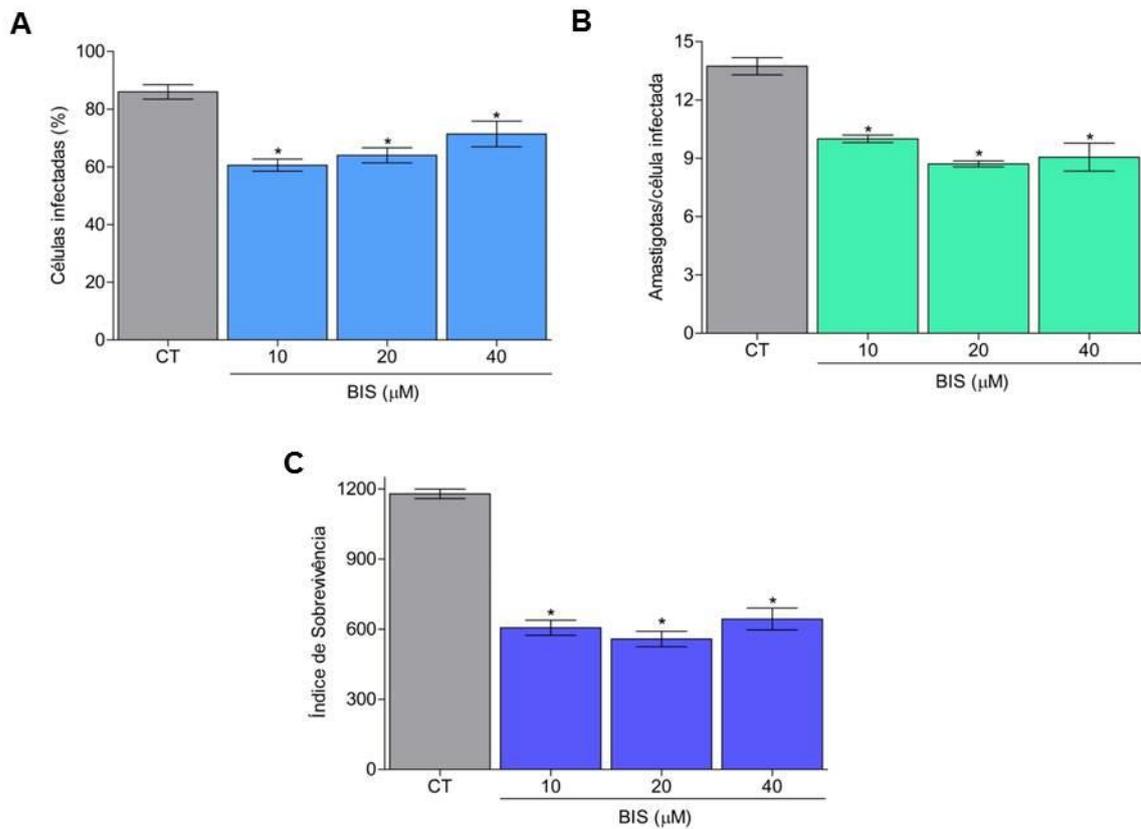


Legenda: (A); Grupo controle; (B-D) grupos tratados com (-)- α -bisabolol nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M, respectivamente. Lâminas obtidas por coloração de Giemsa. Aumento de 200 x, usando Microscópio Nikon Eclipse Nis e Software Nis 4.0.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observada uma redução do percentual de células infectadas (figura 48) e da contagem de amastigotas por célula infectada (figura 49) em relação ao grupo controle. Além disso, houve grande redução do índice de sobrevivência (Sul), conforme apresentado na figura 50. Os valores numéricos (média \pm EPM) para os três parâmetros estão expressos na tabela 6. Não foi observada diferença estatística entre os grupos tratados com as três concentrações de BIS.

Figura 42 – Efeito anti-amastigota *in vitro* do (-)- α -bisabolol.



Legenda: (A) Percentual de células LLC-MK2 infectadas; (B) contagem de amastigotas por célula infectada; e (C) índice de sobrevivência dos grupos experimentais. CT = grupo controle; Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Valores numéricos obtidos no ensaio de atividade antiamastigota *in vitro* do (-)- α -bisabolol.

	Células infectadas (%)	Amastigotas/célula infectada	Índice de sobrevivência (Sul)
<u>Controle</u>	86 \pm 2,52	13,7 \pm 0,44	1179 \pm 21
<u>(-)-α-Bisabolol</u>			
10 μ M	61 \pm 2,1*	10 \pm 0,19*	606 \pm 32*
20 μ M	64 \pm 2,7*	8,7 \pm 0,16*	558 \pm 33*
40 μ M	71 \pm 4,4*	9,1 \pm 0,72*	644 \pm 46*
<u>Benzonidazol</u>			
257 μ M	64,4 \pm 3,6*	9,4 \pm 0,39*	603 \pm 67*
514 μ M	48,8 \pm 5,5*	7,0 \pm 0,8*	371 \pm 27*

Legenda: Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Recuperação de crescimento

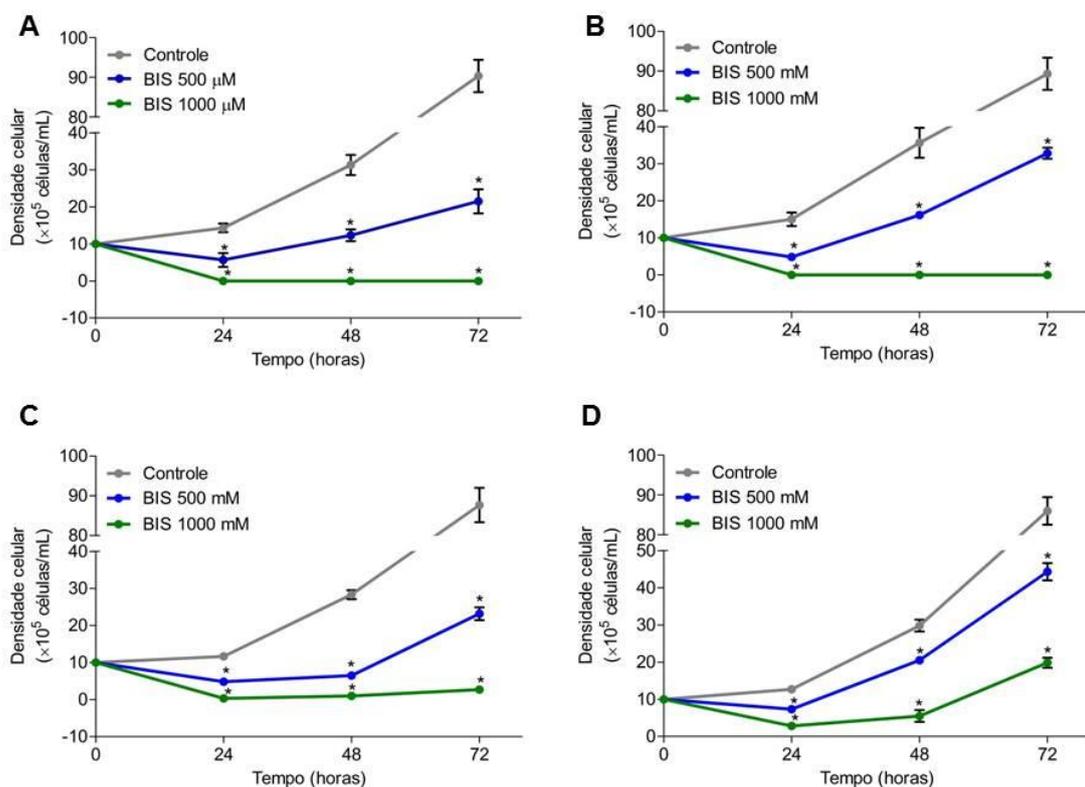
Para observação da indução de morte celular por BIS em pequenos períodos de tempo, epimastigotas foram incubados com as duas concentrações mais altas inicialmente testadas, que demonstraram efeito pronunciado em 24 horas. BIS foi adicionado às culturas por curtos períodos de tempo (15 minutos, 30 minutos, 1 e 2 horas) e, após lavagem, as células foram recultivadas em meio de cultura na ausência de BIS. Os resultados estão apresentados nas figuras 51, 52, 53 e 54 e nas tabela 7 e 8.

O contato com BIS por 1 e 2 horas na concentração de 1000 μ M foi capaz de matar 100% dos epimastigotas após 24 horas, o que foi mantido nos tempos de

48 e 72 horas. Além disso, a incubação com a substância na concentração de 500 μM durante os mesmos tempos provocou grande redução da densidade celular. Além disso, no tempo de 2 horas, o percentual de células viáveis no grupo tratado na concentração de 500 μM foi semelhante ao encontrado no ensaio inicial de viabilidade celular. Dessa forma, o tempo de contato com a substância necessário para observação do efeito demonstrado em 24 horas foi de apenas 2 horas.

Em menores tempos (15 e 30 minutos), as duas concentrações de BIS causaram redução da contagem das células. Os resultados indicam que a indução de morte induzida por BIS e/ou a captação dele pelas células acontece rapidamente, sem haver necessidade da presença da substância no meio de cultura durante períodos longos de tempo para observação do efeito.

Figura 43 – Ensaio de recuperação de crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após incubação com (-) α -bisabolol.



Legenda: Os parasitos foram incubados com BIS por (A) 2 horas; (B) 1 hora; (C) 30 minutos; e (D) 15 minutos. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por two-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas após 1 e 2 horas de incubação com BIS.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	#	%	#	%	#	%
Incubação 1 hora						
Controle	15,0 ± 1,80	100 ± 20,8	35,7 ± 4,05	100,0 ± 19,6	89,3 ± 4,06	100 ± 7,9
BIS 500µM	4,83 ± 0,73*	32,2 ± 8,39*	16,2 ± 0,73*	45,3 ± 3,53*	32,8 ± 1,48*	36,8 ± 2,87*
BIS 1000 µM	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
Incubação 2 horas						
Controle	14,3 ± 1,17	100,0 ± 14,10	31,3 ± 2,73	100,01 ± 15,08	90,3 ± 4,06	100,0 ± 7,78
BIS 500µM	5,67 ± 1,88*	39,54 ± 22,70*	12,3 ± 1,59*	39,4 ± 8,79*	21,5 ± 3,25*	23,8 ± 6,24*
BIS 1000 µM	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*

Legenda: BIS = (-)- α -bisabolol; # = densidade celular em valores absolutos ($\times 10^5$ células/mL); % = viabilidade celular em valores percentuais. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Ensaio de recuperação de crescimento de epimastigotas após 15 e 30 minutos de incubação com BIS.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	#	%	#	%	#	%
Incubação 15 min						
Controle	12,7 ± 1,01	100 ± 13,9	29,8 ± 1,59	100 ± 9,23	86,0 ± 3,46	100 ± 6,98
BIS 500µM	7,33 ± 0,73*	57,9 ± 9,93*	20,5 ± 1,04*	68,7 ± 6,04*	44,3 ± 2,33*	51,6 ± 4,70*
BIS 1000 µM	2,83 ± 0,60*	22,4 ± 8,21*	5,50 ± 1,61*	18,4 ± 9,33*	19,8 ± 1,36*	23,1 ± 2,75*
Incubação 30 min						
Controle	11,7 ± 0,88	100 ± 13,1	28,3 ± 1,20	100 ± 7,4	87,7 ± 4,33	100 ± 8,6
BIS 500µM	4,83 ± 0,93*	41,42 ± 13,8*	6,50 ± 1,04*	22,9 ± 6,4*	23,2 ± 1,74*	26,4 ± 3,4*
BIS 1000 µM	0,33 ± 0,17*	2,86 ± 1,5*	1,00 ± 0,29*	3,53 ± 1,8*	2,67 ± 0,60*	3,04 ± 1,19*

Legenda: BIS = (-)- α -bisabolol; # = densidade celular em valores absolutos ($\times 10^5$ células/mL); % = viabilidade celular em valores percentuais. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

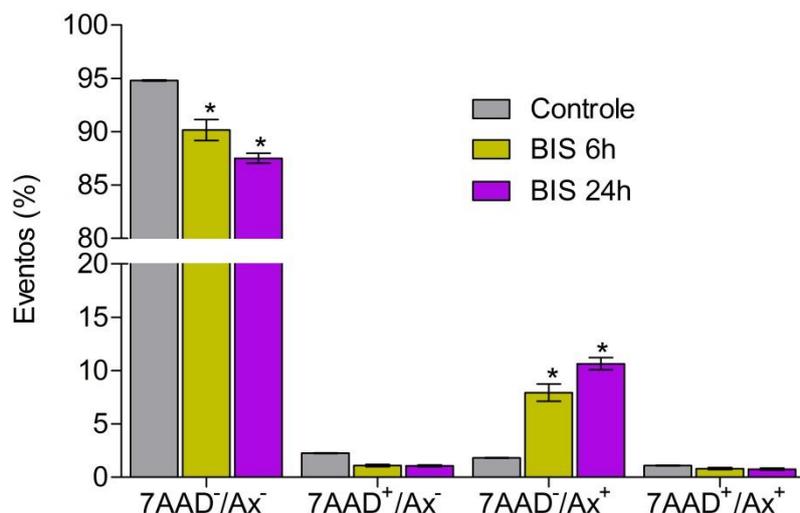
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Avaliação do perfil de morte celular

As formas epimastigotas foram utilizadas para avaliação do perfil de morte celular, através da marcação com anexina V-PE e 7-AAD. Para interpretação dos dados, as células foram divididas em quatro populações celulares: células viáveis, com baixo nível de marcação para ambos os fluorocromos ($7\text{-AAD}^-/\text{Ax}^-$); células necróticas, marcadas apenas com 7-AAD ($7\text{-AAD}^+/\text{Ax}^-$); células apoptóticas, marcadas apenas com anexina V-PE ($7\text{-AAD}^-/\text{Ax}^+$); e células em apoptose tardia, marcadas duplamente ($7\text{-AAD}^+/\text{Ax}^+$).

As células foram incubadas com BIS por 6 e 24 horas na concentração de $285\ \mu\text{M}$, que equivale à IC_{50} em 24 horas. Nesse ensaio, foi observado redução do percentual de células viáveis e aumento do percentual de células marcadas com anexina V-PE, indicando morte celular por apoptose (figura 55 e na tabela 9). Esse aumento também é observado pelo deslocamento das populações celulares, conforme exibido na figura 56, que contém os gráficos *density plot* de dispersão das células.

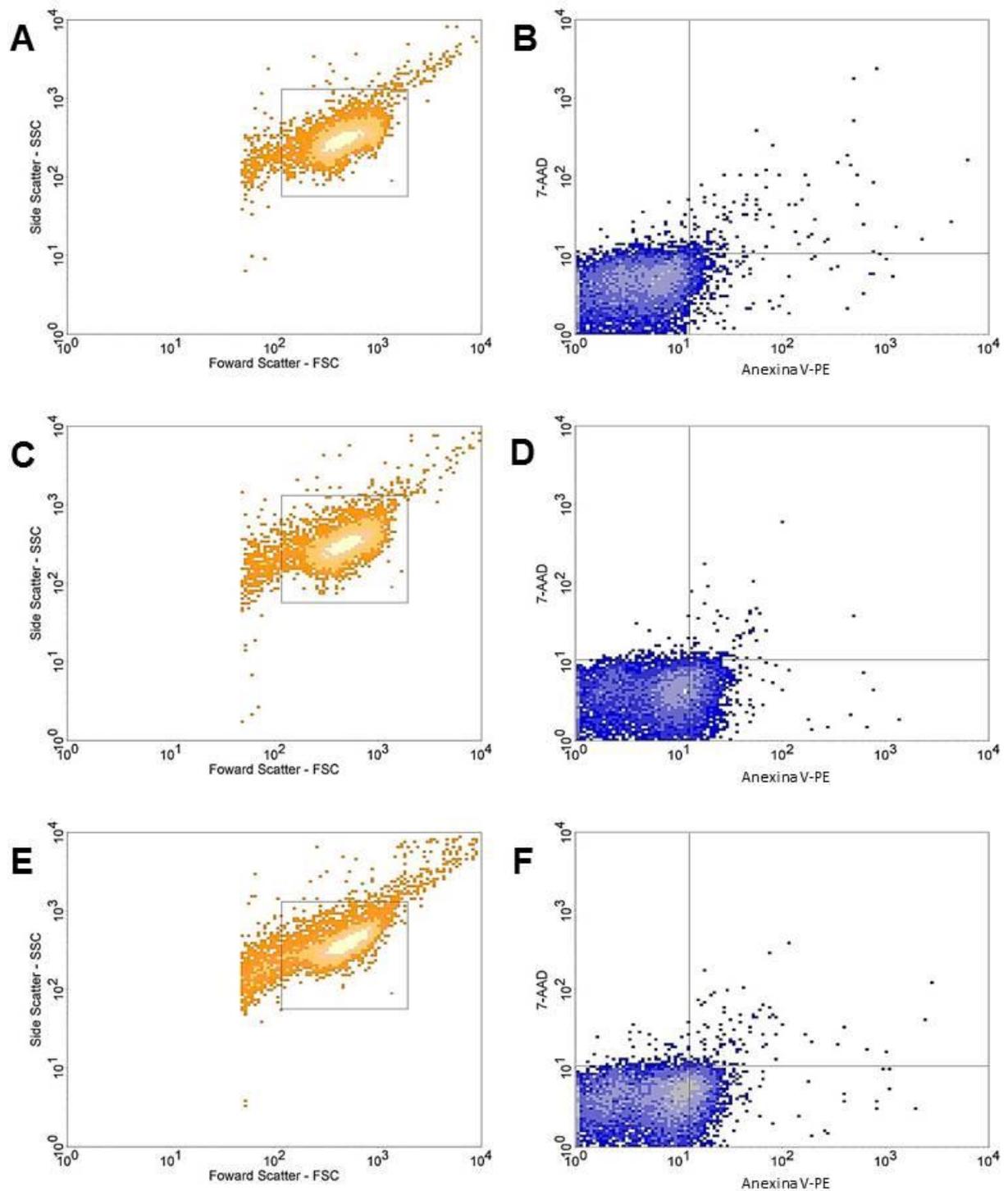
Figura 44 – Potencial apoptótico do (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: $7\text{-AAD}^-/\text{Ax}^-$ = células viáveis; $7\text{-AAD}^+/\text{Ax}^-$ = células necróticas; $7\text{-AAD}^-/\text{Ax}^+$ = células apoptóticas; $7\text{-AAD}^+/\text{Ax}^+$ = apoptose tardia. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 45 – Perfil de morte celular induzido por (-)-bisabolol (285 μ M), avaliado por citometria de fluxo.



Legenda: À esquerda, dispersão das células por tamanho e complexidade; à direita, dispersão de células por intensidade de marcação por anexina V-PE e 7-AAD. (A e B) Grupo controle. (C e D) Grupo tratado com BIS por 6 horas. (E e F) Grupo tratado com BIS por 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Percentual de eventos no ensaio de avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo.

	Eventos (%)			
	7-AAD ⁻ /Ax ⁻	7-AAD ⁺ /Ax ⁻	7-AAD ⁻ /Ax ⁺	7-AAD ⁺ /Ax ⁺
Controle	94,8 ± 0,14	2,27 ± 0,05	1,82 ± 0,05	1,10 ± 0,08
BIS 6h	90,2 ± 2,21*	1,09 ± 0,24	7,94 ± 1,79*	0,81 ± 0,20
BIS 24h	87,5 ± 1,05*	1,07 ± 0,18	10,65 ± 1,25*	0,77 ± 0,21

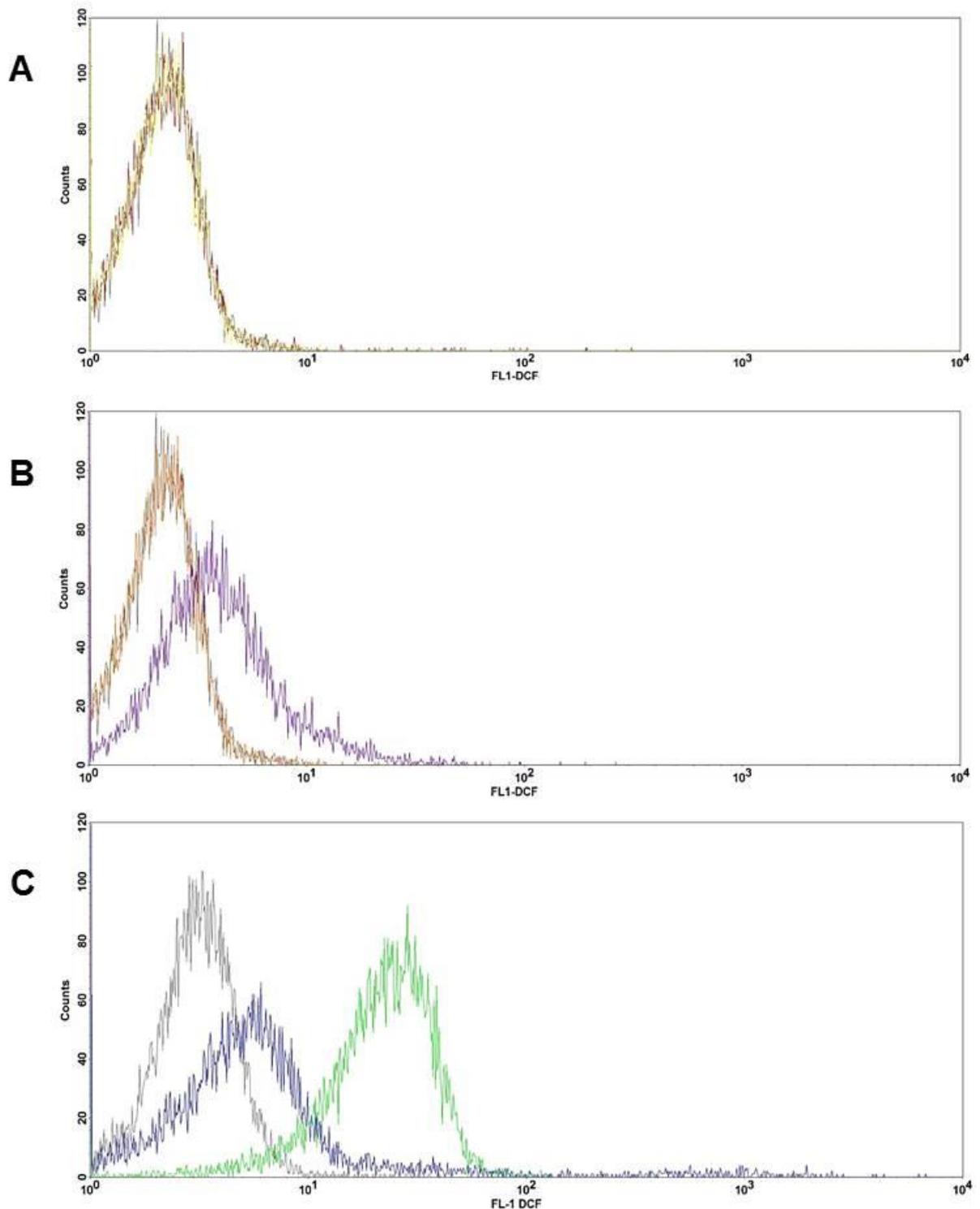
Legenda: BIS = (-)- α -bisabolol; 7-AAD⁻/Ax⁻ = células viáveis; 7-AAD⁺/Ax⁻ = células necróticas; 7-AAD⁻/Ax⁺ = células apoptóticas; 7-AAD⁺/Ax⁺ = células em apoptose tardia. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Medida de EROs citoplasmáticas por citometria de fluxo

As formas epimastigotas marcadas com DCFH-DA foram submetidas à citometria de fluxo para avaliação da intensidade de fluorescência. Pela citometria, os dados foram apresentados por meio de um histograma, demonstrando o desvio das populações celulares à direita (figura 57). Além disso, a intensidade de fluorescência relativa está apresentada na figura 58 e na tabela 10. Foi observado um aumento da intensidade de fluorescência verde a partir de 2 horas de incubação com BIS, indicando aumento na concentração intracitoplasmática de espécies reativas de oxigênio em relação ao grupo controle.

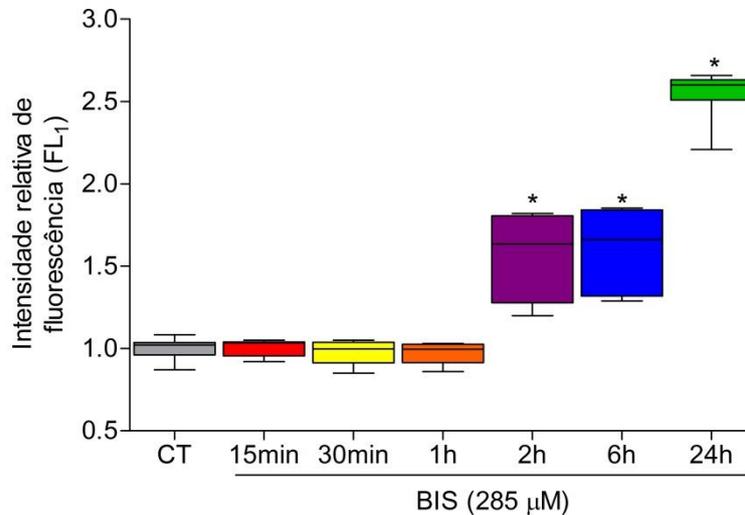
Figura 46 – Histograma de intensidade de marcação com DCFH-DA.



Legenda: DCF-DA = Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína. Em todos os gráficos, a curva de cor cinza representa o grupo controle. As curvas coloridas representam os grupos tratados com (-)- α -bisabolol (285 μ M) por diferentes tempos. (A) Vermelho = 15 minutos; amarelo = 30 minutos; (B) laranja = 1 hora; roxo = 2 horas; e (C) azul = 6 horas; verde = 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 47 – Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre o a produção de espécies reativas de oxigênio intracitoplasmáticas.



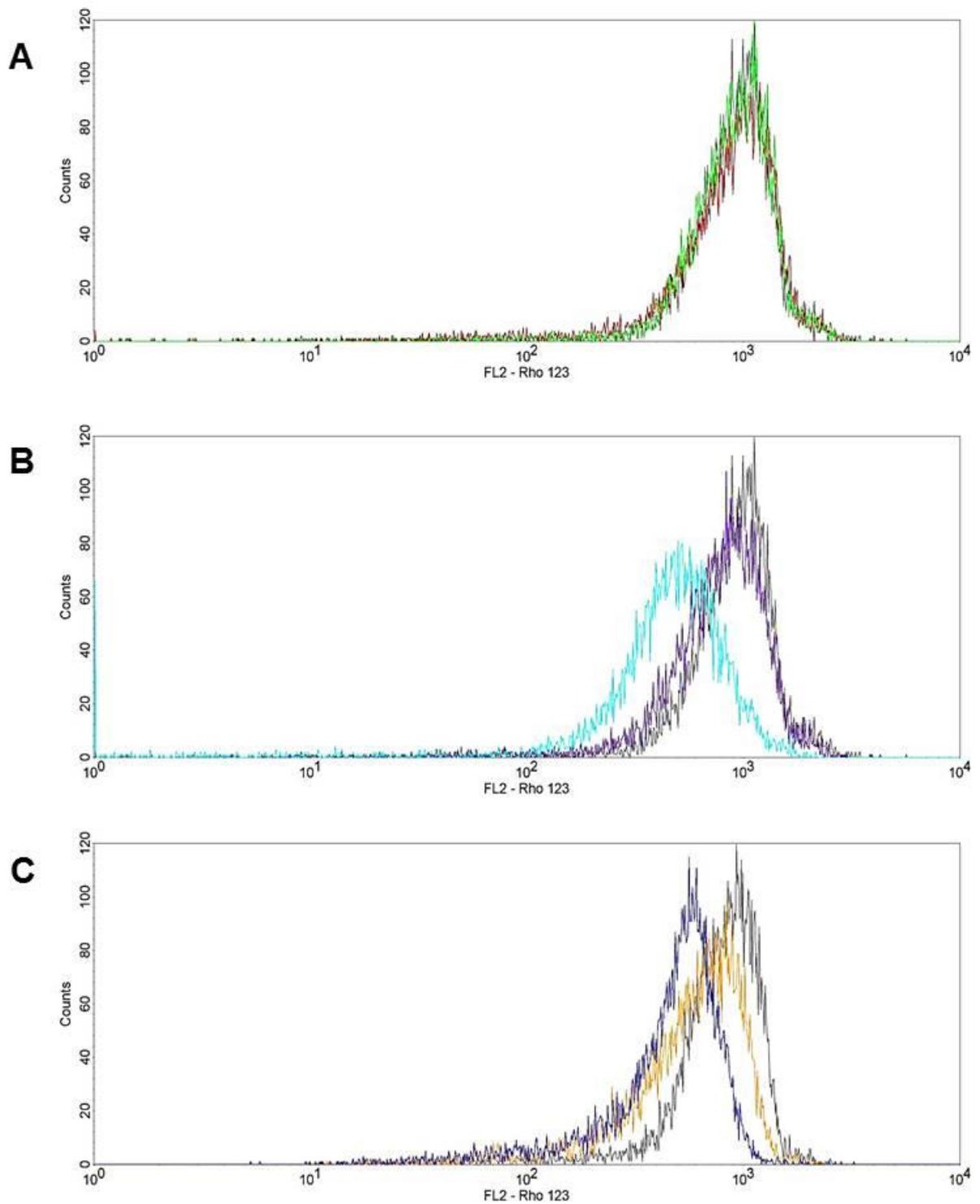
Legenda: CT = grupo controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A rodamina 123 foi utilizada no presente estudo para investigar lesão mitocondrial em *Trypanosoma cruzi* induzida por BIS. As células foram avaliadas após 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 6 e 24 horas de incubação, e foi observado uma redução na intensidade de fluorescência a partir de 2 horas de incubação. Esses dados são visualizados pelo desvio à esquerda dos histogramas de intensidade de marcação com Rho123 (figura 59) e pela redução da intensidade relativa de fluorescência, conforme apresentado na figura 60 e na tabela 10.

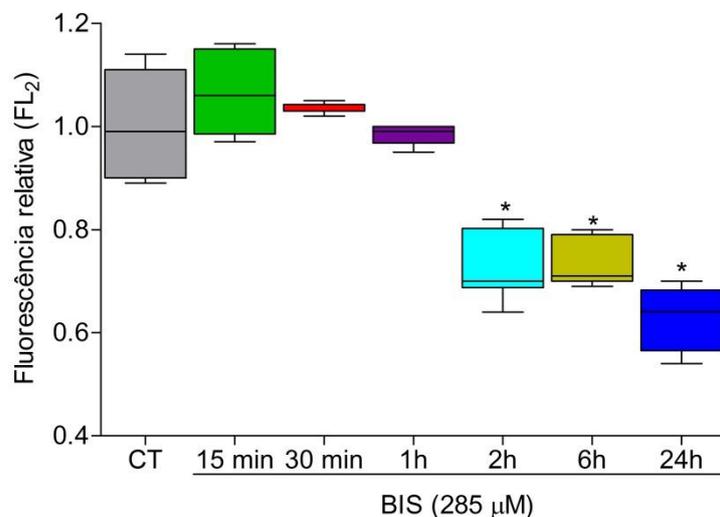
Figura 48 – Histogramas de intensidade de marcação com Rho123.



Legenda: Rho123 = Rodamina 123. Em todos os gráficos, a curva de cor cinza representa o grupo controle. As curvas coloridas representam os grupos tratados com (-)- α -bisabolol (285 μ M) por diferentes tempos. (A) Verde = 15 minutos; vermelho = 30 minutos; (B) roxa = 1 hora; azul claro = 2 horas; e (C) amarelo = 6 horas; azul escuro = 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 49 – Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: CT = grupo controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

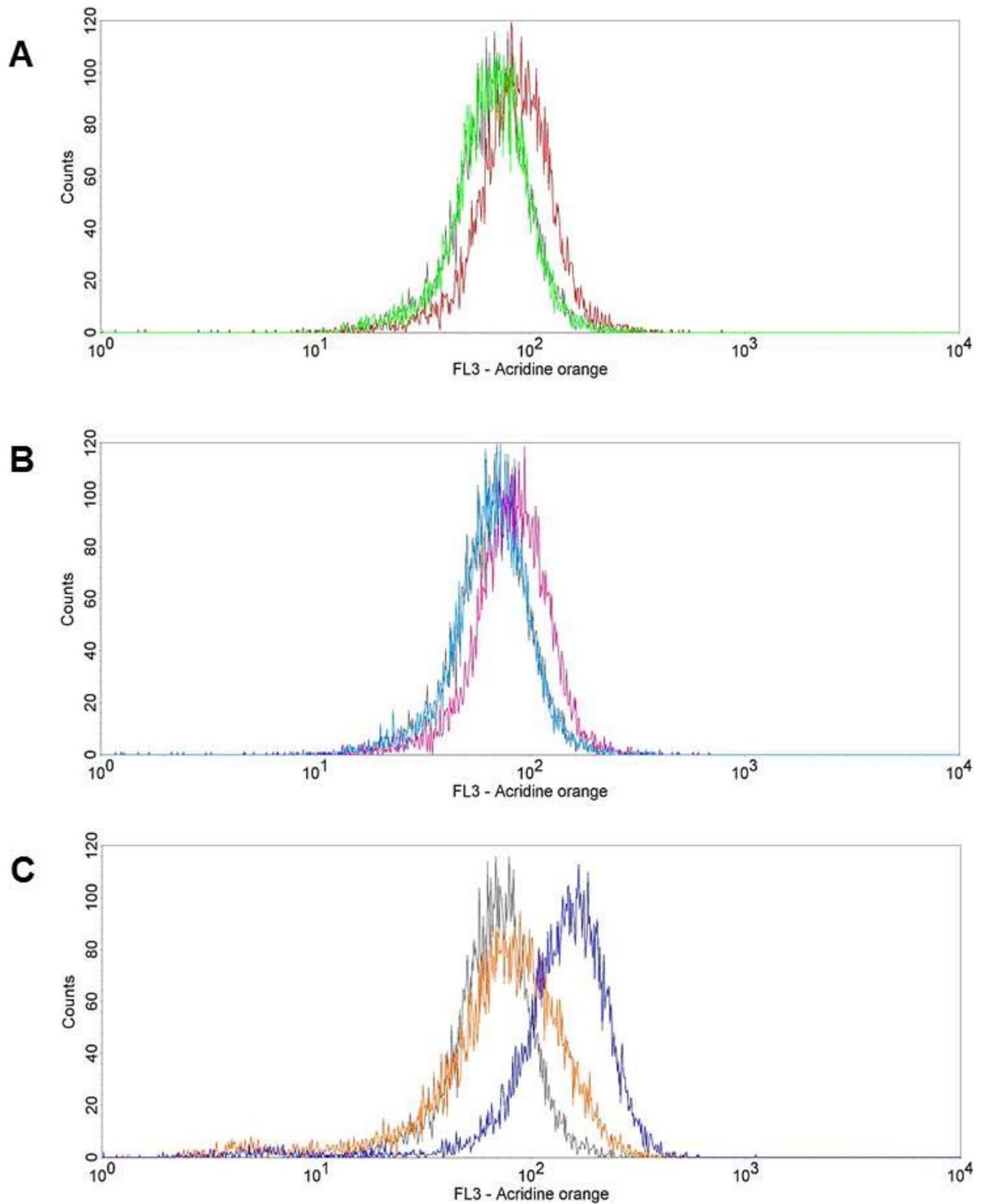
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9 Análise da hipertrofia de reservossomos

A indução de autofagia por BIS foi avaliada a partir da marcação com o corante laranja de acridina (AO), que se acumula em regiões ácidas da célula como os reservossomos, emitindo fluorescência vermelha alaranjada. No presente estudo, as células foram tratadas com BIS (285 μ M) por diferentes períodos de tempo para avaliação da tumefação dos reservossomos.

Não houve alteração significativa de intensidade de marcação com AO nos grupos tratados por 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 6 horas. Apenas após 24 horas de incubação, foi observado aumento na intensidade de fluorescência laranja, conforme apresentado nos histogramas (Figura 61) e no gráfico de intensidade relativa (Figura 62). A tabela 10 apresenta os valores de intensidade relativa de fluorescência.

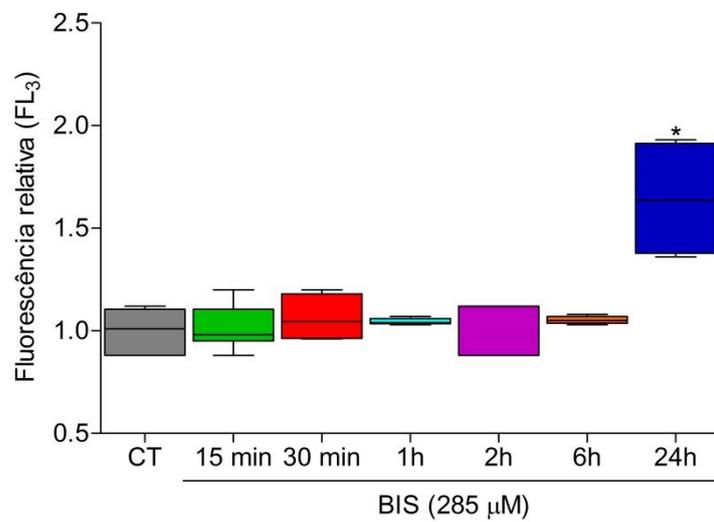
Figura 50 – Histogramas de intensidade de marcação com AO.



Legenda: AO = Laranja de acridina. Em todos os gráficos, a curva de cor cinza representa o grupo controle. As curvas coloridas representam os grupos tratados com (-)- α -bisabolol (285 μ M) por diferentes tempos. (A) Verde = 15 minutos; vermelho = 30 minutos; (B) roxa = 1 hora; azul claro = 2 horas; e (C) amarelo = 6 horas; azul escuro = 24 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 51 – Efeito tempo-dependente do (-)- α -bisabolol sobre os reservossomos de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: CT = grupo controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Intensidade relativa de fluorescência dos experimentos de citometria usando os marcadores DCFH-DA, Rho123 e AO.

	Intensidade relativa de fluorescência		
	FL ₁ (DCFH-DA)	FL ₂ (Rho123)	FL ₃ (AO)
Controle	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,04
15 min	1,00 ± 0,02	1,06 ± 0,03	1,01 ± 0,03
30 min	0,98 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1,06 ± 0,06
1 hora	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,01	1,05 ± 0,01
2 horas	1,56 ± 0,08*	0,73 ± 0,02*	0,98 ± 0,06
6 horas	1,60 ± 0,08*	0,73 ± 0,01*	1,06 ± 0,02
24 horas	2,55 ± 0,04*	0,63 ± 0,01*	1,64 ± 0,09*

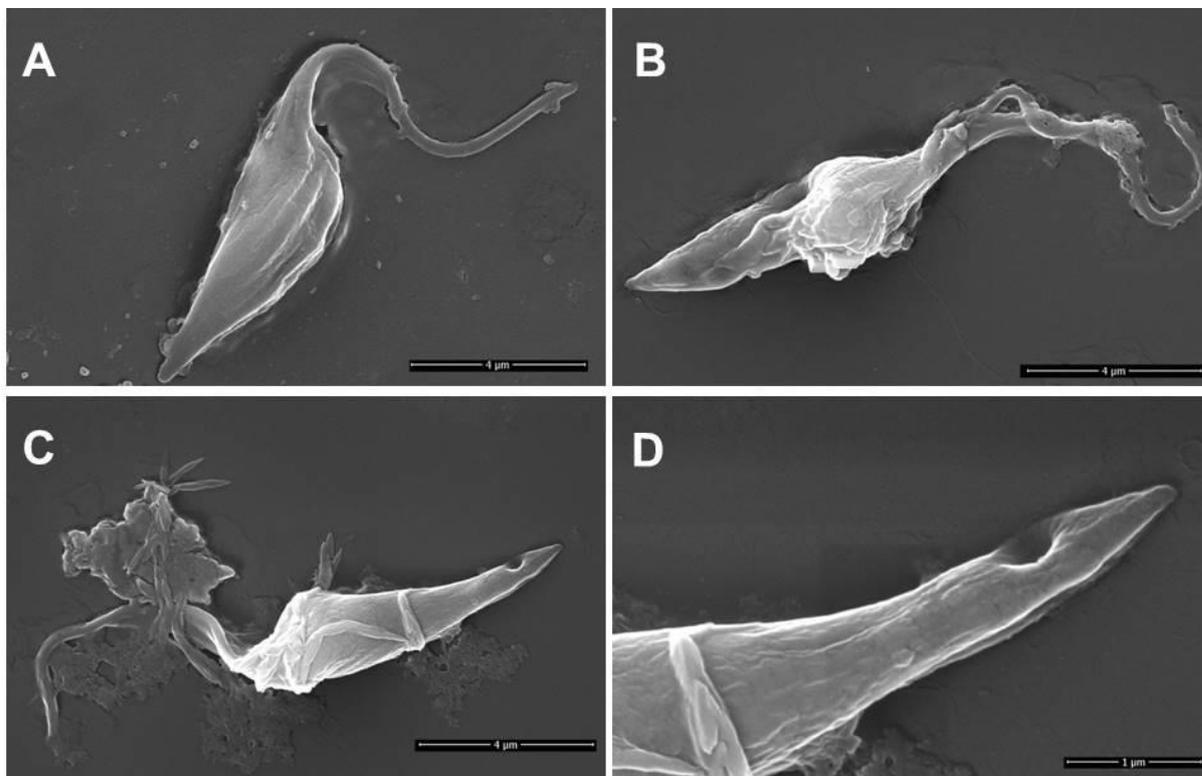
Legenda: DCFH-DA = diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína; Rho123 = Rodamina 123; AO = Laranja de acridina. Os dados foram expressos como média ± EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após 24 horas de tratamento com BIS, as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram processadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Foram observadas alterações ultraestruturais nos grupos tratados com BIS, como alteração no formato típico e aparecimento de poros. As alterações estão expostas na figura 63.

Figura 52 – Alterações ultraestruturais induzidas por (-)- α -bisabolol em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: (A) grupo controle; (B-D) epimastigotas tratados com BIS (285 μ M), demonstrando alterações no formato do parasito (B) e o aparecimento de poros na sua superfície (C) e (D).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.11 Avaliação da influência de H_2O_2 no efeito antiparasitário do BIS

No presente estudo, a catalase foi utilizada com o objetivo de clivar moléculas de H_2O_2 presentes no meio de cultura. O grupo tratado apenas com a catalase não apresentou efeito. Além disso, não foi observada diferença entre o grupo tratado com bisabolol na presença ou ausência da catalase. Esse resultado (tabela 11) sugere que não há participação de H_2O_2 extracelular no efeito biológico de BIS sobre epimastigotas.

Tabela 11 – Ensaio de avaliação da influência de H₂O₂ sobre o efeito antiparasitário de (-)- α -bisabolol.

	Viabilidade celular (%)
Controle	100 \pm 7,31
Catalase (25 μ g/mL)	107 \pm 5,17
BIS (285 μ M)	51,1 \pm 4,46*
BIS + CAT	51,8 \pm 5,1*

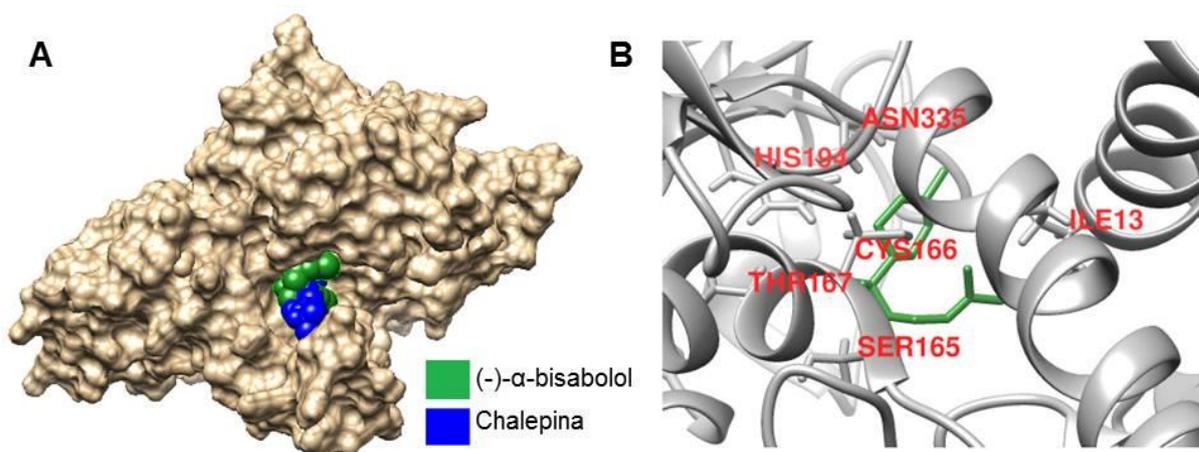
Legenda: BIS = (-)- α -bisabolol; CAT = catalase. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa do grupo BIS+CAT em relação ao grupo BIS.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.12 *Docking* molecular

A previsão teórica da interação entre *tcGAPDH* foi realizada por *docking* molecular. Foi observado, conforme mostrado na figura 64, o local de interação encontrado para BIS foi o mesmo ocupado pela chalepina, que é um forte inibidor de *tcGAPDH*. Adicionalmente, BIS apresentou interação com os resíduos ILE13, SER165, CYS166, HIS194 e ASN335, presentes no centro catalítico da enzima, em distância menor do que 3Å. Dessa forma, o resultado é um forte indicativo de que BIS pode interferir na atividade enzimática de *tcGAPDH* por ligação ao centro catalítico dessa enzima.

Figura 53 – Acoplamento molecular teórico do (-)- α -bisabolol sobre a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* por *docking* molecular.



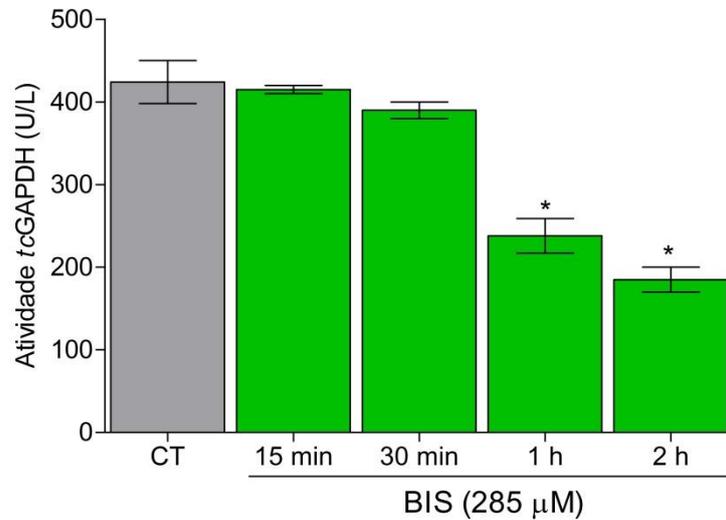
Legenda: (A) Posição de maior escore de (-)- α -bisabolol (BIS) no sítio ativo de TcGAPDH. A posição da chalepina obtida de dados cristalográficos também é mostrada para comparação; (B) indicação dos resíduos de aminoácidos em contato mais próximo com BIS (distância de contato menor que 3Å) na conformação de maior escore.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.13 Inibição da enzima *tcGAPDH in vitro*

A confirmação do resultado demonstrado no ensaio de *docking* enzimático foi realizada pela determinação da atividade enzimática da GAPDH específica de *T. cruzi*. Foi realizado ensaio com parasitos tratados com BIS utilizando um reagente comercial. Como resultado, foi observado que o tratamento com BIS após 1 hora e 2 horas foi capaz de reduzir a atividade enzimática de *tcGAPDH* de forma significativa, concordando com o ensaio computacional. Os resultados podem ser observados na figura 65 e na tabela 12.

Figura 54 – Efeito inibitório do (-)- α -bisabolol sobre a atividade enzimática da GAPDH de *Trypanosoma cruzi*.



Legenda: CT = grupo controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 – Atividade enzimática de tcGAPDH após tratamento com (-)- α -bisabolol.

	Atividade tcGAPDH (U/L)
Controle	424 \pm 26
BIS 15 min	415 \pm 5
BIS 30 min	390 \pm 10
BIS 1h	238 \pm 21*
BIS 2h	185 \pm 15*

Legenda: tcGAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase específica de *Trypanosoma cruzi*; BIS = (-)- α -bisabolol. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Mesmo com o amplo avanço científico e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de muitas doenças, a doença de Chagas permanece sendo uma doença de tratamento precário. Os poucos fármacos disponíveis no arsenal terapêutico possuem baixa eficácia e alta toxicidade (COSTA et al., 2011).

Produtos naturais são fontes importantes de novos fármacos, de forma que mais da metade dos fármacos usados na atualidade são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais (CHEUKA et al., 2016). Várias classes químicas, como chalconas, flavonoides e terpenos, tem demonstrado efeitos biológicos diversos, despertando interesse biotecnológico.

O presente trabalho vem ampliar o conhecimento, através da investigação da atividade antiparasitária de uma substância proveniente de óleos essenciais de plantas da biodiversidade brasileira. Os óleos essenciais são misturas orgânicas de alta riqueza química, com alta diversidade química. As principais moléculas presentes nessas misturas tem estrutura terpênica, e muitas delas possuem bioatividades importantes, como atividade antimicrobiana (DOS SANTOS et al., 2015), antioxidante (MAURYA et al., 2014), antineoplásica (FRIKECHE et al., 2015) e anticolinesterásica (MAKWANA et al., 2015). O (-)- α -bisabolol é um sesquiterpeno que está presente no óleo essencial de diversas plantas, como camomila, sálvia, candeeiro e arnica (BUIRAGO et al., 2015).

Recentemente, BIS tem sido explorado por alguns pesquisadores como uma possível nova substância leishmanicida, e tem demonstrado resultados promissores em diferentes modelos experimentais. BIS demonstrou efeito antiparasitário sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MORALES-YUSTE et al., 2010). Mais recentemente, outros artigos apresentam efeito leishmanicida *in vitro* de BIS sobre *L. amazonensis* (ROTTINI et al., 2015) e *L. tropica* (CORPAS-LÓPEZ et al., 2016).

Em outro trabalho realizado por CORPAS-LÓPEZ et al. (2015), BIS demonstrou efeito promissor como substância ativa para tratamento oral de leishmaniose visceral em camundongos. Esse resultado é de grande importância, pois, pela primeira vez foi descrito o efeito *in vivo* de BIS sobre parasitos. Esses dados confirmam ainda que esse sesquiterpeno apresenta boa biodisponibilidade *in vivo*, corroborando com outros autores que testaram bioatividades dessa substância

por via oral. Dentre elas, destacamos as atividades nefroprotetora (SAMPAIO et al., 2016), gastroprotetora (BEZERRA et al., 2009) e antinociceptiva (LEITE et al., 2011).

Além disso, um trabalho recente demonstrou o efeito do bisabolol livre e encapsulado em uma nanopartícula sobre formas sanguíneas de *Trypanosoma evansi* (BALDISSERA et al., 2016). Todos esses achados levaram nosso grupo de pesquisa a investigar o efeito dessa substância sobre as principais formas de vida de *T. cruzi*, uma vez que os gêneros *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp. apresentam diversas similaridades em sua biologia celular, ciclo biológico e morfologia (WHEELER; SUNTER; GULL, 2016).

Para esse trabalho, foi selecionada a cepa Y de *T. cruzi*, que tem como uma das principais características ser moderadamente resistente ao benzonidazol (CHERKESOVA et al., 2014). Dessa forma, essa cepa constitui um bom modelo para investigação do efeito tripanocida de substâncias bioativas. Além disso, todos os modelos experimentais utilizados nesse trabalho dispensam a utilização de animais de laboratório, seguindo a tendência de reduzir a utilização desses animais por questões éticas. A partir da observação de efeitos biológicos *in vitro*, as substâncias consideradas promissoras devem ser selecionadas para realização de estudos *in vivo* (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). Dentre eles, os protocolos utilizando células cultivadas e os modelos computacionais representam estratégias centrais para este fim (JAIN et al., 2014; UNCITI-BROCETA et al., 2015).

Inicialmente, a citotoxicidade de BIS sobre células de mamíferos foi avaliada, para auxiliar a definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios com *T. cruzi*. Foram utilizadas as células LLC-MK2, que são células epiteliais renais de macaco. Essas células constituem uma linhagem bem estabelecida e amplamente utilizadas para obtenção de formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (ADADE et al., 2013; LIMA et al., 2016; SOARES et al., 2011), por possuírem boa adesão e permitirem alto percentual de internalização e infecção com formas parasitárias.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o método do MTT, que avalia a capacidade metabólica de células expostas a substâncias bioativas e/ou condições de *stress* (MOSMANN, 1983). É um método de fácil execução e boa reprodutibilidade, e avalia a atividade enzimática de desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais (SUMANTRAN, 2011). Por esse método, foi observado que BIS apresentou efeito citotóxico somente nas duas maiores concentrações (1000 e 500

μM), tendo sido obtida $\text{CC}_{50} = 528 \mu\text{M}$. Em estudos semelhantes, BIS também apresentou citotoxicidade sobre células de mamíferos, em concentrações variáveis.

Em fibroblastos da linhagem L929, foi estimada $\text{CC}_{50} = 1148,32 \mu\text{M}$ (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015). Em macrófagos J774, foi encontrado efeito citotóxico mais evidente, com $\text{CC}_{50} = 14,82 \mu\text{g/mL}$, equivalente a $66,7 \mu\text{M}$ (ROTTINI et al., 2015). Esses resultados demonstram as diferenças existentes entre a susceptibilidade de diferentes linhagens celulares, de acordo com características como o tecido de origem e a espécie. Conseqüentemente, as informações referentes aos estudos de citotoxicidade devem ser cuidadosamente interpretadas, levando em consideração principalmente a aplicação destinada àquela substância ou método (CAVALIERI et al., 2011).

A partir dos dados obtidos, BIS foi avaliado sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*, que são as formas de vida no intestino superior dos vetores invertebrados (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). Apesar de não serem as formas de vida infectantes, são amplamente utilizadas em modelos experimentais para triagem de substâncias tripanocidas (ZINGALES et al., 1997). Adicionalmente, são facilmente cultivadas, sem a necessidade de uso de animais de laboratório ou cultivo com outras linhagens celulares. Essa linhagem celular é ainda de fácil aplicação em estudos de avaliação de mecanismo de ação antiparasitária.

BIS foi capaz de inibir a proliferação de formas epimastigotas de maneira crescente e concentração-dependente. Após 24 horas, foi observado efeito nas 3 maiores concentrações (1000, 500 e $250 \mu\text{M}$), com 100% de inibição na maior concentração. Esse efeito aumenta com o tempo de incubação, de forma que, após 48 e 72 horas, o percentual de viabilidade celular estava reduzido até a concentração de $62,5 \mu\text{M}$. No último dia analisado (96 horas de incubação), todas as concentrações apresentaram viabilidade celular reduzida em relação ao grupo controle. Esse efeito crescente também foi observado pela redução progressiva dos valores de IC_{50} .

Os resultados obtidos para formas epimastigotas impulsionaram o interesse em testar o efeito do BIS sobre as formas infectantes de *T. cruzi*. Durante o ciclo de vida, as formas tripomastigotas estão presentes na corrente sanguínea do homem e de outros hospedeiros vertebrados (BERN, 2015). Estão presentes durante a fase aguda da doença e, em modelos in vitro, são formas não-replicativas.

No presente trabalho, as formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLC-MK2 infectadas. Esse modelo possui algumas vantagens, como o rendimento do processo e a possibilidade de estocagem das células obtidas (ANDREWS; COLLI, 1982; CHUNG et al., 1997). Outra característica interessante é a redução do sofrimento animal, uma vez que a obtenção de tripomastigotas de ratos ou camundongos envolve alto índice de mortalidade desses animais, bem como necessidade de punção cardíaca para coleta dos tripomastigotas sanguíneos (BALDISSERA et al., 2016).

BIS demonstrou efeito sobre formas tripomastigotas de forma mais potente do que observado para formas epimastigotas. Todas as concentrações testadas apresentaram efeito tripanocida após 24 horas de tratamento. Além disso, os grupos tratados nas concentrações mais altas (250, 500 e 1000 μM) apresentaram 100% de efeito (dados não mostrados). É importante ressaltar que o valor de LC_{50} obtido (20 μM) é aproximadamente 40 vezes inferior ao obtido para epimastigotas após 24 horas.

Efeito semelhante foi encontrado para outras substâncias terpênicas. Deidroleucodina e helenalina, lactonas sesquiterpênicas isoladas respectivamente das partes aéreas de *Gaillardia megapotamica* e *Artemisia douglassiana* Besser, causaram apoptose em formas epimastigotas de *T. cruzi*, além de fragmentação de DNA em formas epimastigotas e tripomastigotas (JIMENEZ et al., 2014). Psilostacina e psilostacina C, isoladas de espécies do gênero *Ambrosia* spp, também apresentam efeito tripanocida, conforme por SÜLSEN et al. (2016).

Terpenos de origem natural também tem sido utilizado como protótipos para o desenvolvimento de substâncias tripanocidas. Alguns exemplos incluem o artesunato, sintetizado a partir da artemisina presente nas folhas de *Artemisia annua* (OLIVERA; POSTAN; GONZÁLEZ, 2015); moléculas derivadas do eremantolídeo C isolado de *Lychnophora trichocarpha* (SAÚDE-GUIMARÃES; RASLAN, 2014); e derivados sintéticos da cinaropicina, presente nas folhas de *Cynara scolymus* L. (USUKI et al., 2014). Todas as substâncias citadas possuem efeito sobre formas de vida de *T. cruzi* e constituem estratégias de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e seguros.

Ainda sobre o efeito de BIS sobre formas tripomastigotas, observamos que o valor de LC_{50} encontrado no presente trabalho foi próximo ao encontrado por outros

autores para formas promastigotas de *Leishmania* sp. Para *L. infantum*, foi obtido $LC_{50} = 49,2 \mu\text{M}$ (MORALES-YUSTE et al., 2010); para *L. tropica*, $22,6 \mu\text{M}$ (CORPAS-LÓPEZ et al., 2016); e para *L. amazonensis*, $36,2 \mu\text{M}$ (ROTTINI et al., 2015).

Para que uma substância seja considerada promissora como fármaco citotóxico, é importante que ele apresente seletividade sobre as células-alvo, sem lesão celular expressiva sobre as células do hospedeiro (PEÑA; SCARONE; SERRA, 2015). Dessa forma, decidiu-se avaliar o índice de seletividade (Sel) de BIS sobre *Trypanosoma cruzi* em relação a células LLC-MK2, usada como hospedeira nesse trabalho.

É considerado por alguns autores que substâncias com $\text{Sel} > 10$ são consideradas promissoras e podem ser direcionada para estudos posteriores de avaliação de mecanismo de ação (KESSLER et al., 2013; MONDAL et al., 2013; TELES et al., 2015). No presente trabalho, foi obtido $\text{Sel} = 26,5$. BIS apresentou valores de Sel para *Leishmania* sp. compatíveis com os observados para esse trabalho. Dessa forma, BIS se mostra promissor como substância ativa e/ou protótipo de atividade antiparasitária em tripanossomatídeos.

Em hospedeiros vertebrados, as formas tripomastigotas são formas não-replicativas, de forma que necessitam invadir células e se diferenciar em células amastigotas, que sobrevivem ao ambiente intracelular e são capazes de se multiplicar (OLMO et al., 2015). Assim, as substâncias consideradas para atividade antichagásicas devem ser submetidas à avaliação do efeito anti-amastigota. Esses resultados podem sugerir a eficácia de uma substância de interesse sobre as formas crônicas da DC.

Nesse trabalho, o efeito anti-amastigota foi avaliado por um método previamente descrito por alguns autores (FONSECA-BERZAL et al., 2013; MASSARICO SERAFIM et al., 2014), desenhado para selecionar novas substâncias bioativas como opção para o tratamento de formas crônicas de doenças causadas por tripanossomatídeos reduzindo o uso de animais de laboratório. O nível de infectividade de uma substância pode ser avaliado principalmente pelo número de células infectadas e pelo número de amastigotas presentes nessas células.

BIS foi testado sobre formas amastigotas em três concentrações, selecionadas a partir do ensaio de atividade sobre tripomastigotas. Foram

selecionadas as concentrações referentes à LC_{50} (20 μ M), a metade e o dobro dessa concentração. Em todas as concentrações testadas, BIS foi capaz de reduzir tanto o percentual de células infectadas como a quantidade de amastigotas por célula infectada. Não foi observada diferença de efeito anti-amastigota entre as três concentrações testadas, indicando que, nessa faixa de concentração, não existe uma relação concentração-efeito. É importante ressaltar que esses resultados foram encontrados em concentrações que não causaram efeito citotóxico sobre células hospedeiras, indicando que BIS foi capaz de impedir a proliferação intracelular de amastigotas sem lesão da célula hospedeira.

Adicionalmente, o efeito anti-amastigota foi expresso por meio da estimativa do índice de sobrevivência (Sul), que tem sido utilizado para comparar o efeito de diferentes substâncias tripanocidas e leishmanicidas (LIMA et al., 2016; TESSAROLO, 2016). O Sul é utilizado como estimativa matemática da capacidade de uma substância em remover parasitos de uma célula hospedeira (DUTRA et al., 2005).

A partir dos dados obtidos nos estudos iniciais, decidiu-se avaliar o mecanismo de ação antiparasitária de BIS, utilizando formas epimastigotas. Inicialmente, foi avaliado o efeito da substância sobre a indução de morte em *T. cruzi* após pequenos períodos de tempo, através do ensaio de recuperação de crescimento. Foi verificado que, após apenas alguns minutos de incubação, BIS induziu a ativação de mecanismo de morte celular nos parasitos, que aconteceu mesmo após remoção da substância. Esses resultados demonstram que BIS é capaz de induzir rapidamente mecanismos irreversíveis de morte celular. Além disso, é possível ainda que BIS seja rapidamente internalizado pelas células, conforme é observado por Darra et al. (2008) para células leucêmicas. Nesse trabalho, é demonstrado que o efeito antineoplásico de BIS está associado à rápida internalização celular.

Em seguida, o mecanismo de morte celular foi avaliado utilizando os corantes fluorescentes 7-AAD e anexina V/PE (KUMAR et al., 2015). Esse método permite a divisão de células suspensas em diferentes populações: células viáveis, que não estão marcadas por nenhum dos fluorocromos; as células necróticas, marcadas unicamente com 7-AAD; e as células apoptóticas, marcadas unicamente com Ax/PE. As células com marcação dupla são consideradas em apoptose tardia (ou em

necrose secundária), uma vez que não é possível determinar se a marcação com Ax/PE representa externalização de fosfatidilserina ou a marcação interna devido a lesão da membrana celular (MELLO et al., 2014).

Após 6 e 24 horas de incubação, foi observado que BIS causou marcação de células com Ax/PE, indicando externalização de fosfatidilserina. Essa molécula é um fosfolípido presente no folheto interno da membrana celular em células viáveis. Quando as células são induzidas a entrar em apoptose, há a externalização de fosfatidilserina, com o objetivo de sinalizar a fagocitose dessas células (ATALE et al., 2014).

Concordando com nossos resultados, foi previamente descrito o efeito pró-apoptótico do bisabolol sobre algumas linhagens celulares. BIS foi capaz de induzir apoptose em células HEPG2 através das vias intrínseca e extrínseca (CHEN et al., 2010a). Células leucêmicas primárias também foram incubadas com BIS, demonstrando lesão mitocondrial e apoptose (DA SILVA et al., 2010). Além disso, BIS causou degradação de DNA em escada, lesão mitocondrial e clivagem de PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) em células de glioma (CAVALIERI et al., 2004), alterações características da apoptose. Em parasitos, também foi previamente observado efeito pró-apótico de BIS, conforme descrito para *Leishmania major* e *L. tropica* (CORPAS-LÓPEZ et al., 2016), através de interferência na função mitocondrial e *stress* oxidativo.

Após revisão de literatura, foi observado que a ocorrência de *stress* oxidativo e alteração da função mitocondrial estão comumente associadas com o efeito biológico do bisabolol. Por isso, foram realizadas análises por citometria de fluxo para avaliar a participação desses mecanismos no efeito tripanocida do BIS. Foram realizados experimentos tempo-dependente, com o objetivo de investigar a sequência de eventos que causam morte das células de *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliação do *stress* oxidativo citoplasmático, foi utilizado o DCFH-DA, que é internalizado pelas células e convertido em produto fluorescente na presença de espécies reativas de oxigênio no citoplasma (SILVEIRA, 2004). Não foi observada alteração após os primeiros minutos de incubação (15, 30 e 60 minutos). A partir das 2 horas, foi observado aumento da intensidade de fluorescência, demonstrando indução de *stress* oxidativo. Esse efeito progride à medida que o tempo de incubação aumenta.

Em seu ciclo biológico, *T. cruzi* precisa lidar com diferentes microambientes redox, por conta de habitar compartimentos biológicos bastante distintos. Dessa forma, esse parasito possui um extenso e diferenciado mecanismo de detoxificação, que atua com o objetivo de protegê-lo do ataque de moléculas oxidantes (IRIGOÍN et al., 2008). Nesse contexto, um dos principais alvos farmacológicos que tem sido estudado para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos é a interferência nesses mecanismos antioxidantes (GUDDAT, 2011).

Algumas enzimas detoxificantes tem se destacado na pesquisa farmacológica como alvos para novos fármacos, como a tripanotiona redutase, que realiza a reciclagem das moléculas de tripanotiona. Essa molécula exerce em parasitos a mesma função da glutathione humana (KHAN, 2007). Outros exemplos incluem a peroxirredoxina e a superóxido dismutase dependente de Ferro (Fe-SOD) (PIACENZA et al., 2012). Combinados, esses mecanismos são essenciais para manutenção da viabilidade celular de *T. cruzi*. Nossos achados indicam que BIS parece interferir de maneira efetiva sobre o *status* redox desse parasito.

Os experimentos tempo-dependentes realizados utilizando rodamina 123 demonstraram resultado semelhante ao encontrado com DCF. A partir de 2 horas, observou-se redução do acúmulo de corante nas mitocôndrias, indicando perda de integridade da membrana mitocondrial. Essa organela, participando do processo de produção de energia, é de extrema importância para a sua sobrevivência (JOHNSON et al., 1980). Além disso, perturbações na função mitocondrial estão associadas a mecanismos específicos de morte celular.

A morte celular por apoptose é considerada por muitos autores como um mecanismo importante para a interferência de substâncias ativas. Em relação às vias de indução de apoptose, a lesão mitocondrial é o principal evento relacionado à ativação de apoptose pela via intrínseca (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017). A indução de lesões críticas no metabolismo celular provoca lesão da membrana mitocondrial, com consequente liberação de material pó-apoptótico para o citosol, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (CHRISTENSEN et al., 2013). Esses eventos promovem a ativação de metacaspases em *Trypanosoma cruzi* e conseqüentemente o gatilho de mecanismos apoptóticos efetores.

Como citado anteriormente, os efeitos biológicos de BIS em alguns modelos

experimentais estão associados com lesão mitocondrial e indução de apoptose pela via intrínseca, como observado para linhagens de célula de câncer, a exemplo de linhagem celular de leucemia HL60 (BASURCO et al., 1995) e de glioblastoma (DARRA et al., 2008). Adicionalmente, efeito semelhante foi identificado para espécies de *Leishmania* sp. (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015, 2016; ROTTINI et al., 2015).

Além dos eventos necróticos e apoptóticos clássicos, são identificados mecanismos de morte celular que não se classificam como necrose ou apoptose, como a autofagia. De forma fisiológica, a autofagia é considerada o mecanismo mais utilizado por células eucarióticas para reciclagem de proteínas e organelas (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Durante esse processo, porções do citoplasma são captadas por vesículas, chamadas de autofagossomas. Essas vesículas se fundem aos lisossomos, com subsequente destruição do conteúdo vesicular por hidrolases lisossomais (KRYSKO et al., 2008).

Dessa forma, um dos eventos que caracterizam a autofagia é o aumento do tamanho de vesículas acídicas, como resposta à fusão entre autofagossomas e lisossomos. Em *T. cruzi*, as estruturas responsáveis pela função lisossomal são chamadas de reservossomos (PORTO-CARREIRO et al., 2000). A utilização da laranja de acridina é de grande utilidade, uma vez que esse corante é capaz de emitir fluorescência específica em compartimentos acídicos.

Foi observado aumento da marcação com laranja de acridina apenas após 24 horas de incubação com BIS. Esse resultado sugere que, apesar de não estar associada ao mecanismo de ação primário do bisabolol sobre *T. cruzi*, a autofagia pode estar envolvida de forma tardia. Ainda, não é claro se a autofagia pode ser causada diretamente pela ação do bisabolol ou de maneira secundária à formação de corpos apoptóticos.

Quando as formas epimastigotas tratadas com bisabolol foram submetidas à avaliação por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas alterações estruturais na sua topografia. Uma das principais alterações observadas foi o aparecimento de deformações na membrana plasmática, com o aparecimento de estruturas semelhantes a poros.

Não é comum a observação de lesões de membrana associadas a apoptose, uma vez que perda da integridade de membrana é característica de outros

mecanismos de morte celular, como necrose e autofagia (KRYSKO et al., 2008). As imagens obtidas estão em concordância com o resultado obtido com laranja de acridina. Dessa forma, como a análise por MEV foi realizada após 24 horas de incubação, é possível que esse resultado reflita os estágios tardios de morte celular induzidos por BIS.

Com o objetivo de investigar a participação de peróxido de hidrogênio no efeito biológico de *T. cruzi*, foi realizado ensaio de bloqueio farmacológico com catalase. Essa enzima está ausente em tripanossomatídeos e, em alguns casos, essa deficiência enzimática é considerada importante para a ação antiparasitária de substâncias bioativas (BOVERIS et al., 1980).

No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa nas células tratadas com BIS na presença de catalase. Esse resultado sugere que não existe a participação de H₂O₂ no efeito, e sim de outras espécies reativas de oxigênio. Entretanto, uma limitação desse método é que a catalase adicionada fica restrita ao ambiente extracelular. Dessa forma, é possível que o peróxido de hidrogênio produzido dentro da célula não esteja disponível para ação da catalase. Para esclarecimento dessa questão, pode ser realizado estudo de expressão recombinante da enzima em *T. cruzi* (JIA et al., 2016).

Em seguida, foi investigado o efeito do bisabolol sobre a atividade enzimática da enzima GAPDH de *T. cruzi*. Ela foi escolhida por se tratar de uma enzima essencial para a sobrevivência de *T. cruzi* em formas tripomastigotas e amastigotas (NICHOLLS; LI; LIU, 2012). Além disso, é considerada um alvo farmacológico promissor para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos seletivos, uma vez que é uma enzima drasticamente diferente da encontrada em hospedeiros vertebrados (MENEZES et al., 2003b).

Foi realizada uma abordagem *in silico*, com o objetivo de avaliar de forma teórica a interação de BIS com a enzima. O resultado obtido demonstrou possível ligação, com interação de BIS em resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico. Além disso, o local de ancoragem de BIS na enzima foi semelhante ao ocupado pela chalepina, um potente inibidor de *tc*GAPDH. Esse resultado sugere que BIS é capaz de interferir na atividade dessa enzima.

Apesar de se conhecer a importância da GAPDH no metabolismo de *T. cruzi*, o mecanismo da reação catalisada por essa enzima não é completamente

esclarecido. As principais teorias sobre esse possível mecanismo levam em consideração a conformação do substrato gliceraldeído-3-fosfato e a ligação a aminoácidos específicos no sítio catalítico da enzima (REIS et al., 2013).

Em todos eles, a ligação do substrato à enzima acontece por ataque nucleofílico do resíduo CYS166 ao carbono C1 de G3P (REIS et al., 2013). Dessa forma, esse resíduo é considerado essencial para a atividade enzimática. A interação teórica de BIS com esse resíduo constitui um dado importante, que pode indicar que esse terpeno seja um potencial inibidor. Adicionalmente, foi observado por Silva et al. (2010) que um grupo de compostos de rutênios doadores de óxido nítrico provocam efeito tripanocida por nitrosilação do resíduo CYS166 presente em *tcGAPDH*, com consequente inibição enzimática.

Entretanto, o ensaio de *docking*, por constituir um modelo computacional, possui algumas limitações, não sendo capaz isoladamente de comprovar a real inibição enzimática de BIS sobre *tcGAPDH* (PIERCE et al., 2014). Dessa forma, foi realizada o isolamento e determinação da atividade dessa enzima após tratamento com BIS, para confirmar o resultado obtido pelo método de *docking* molecular. O resultado obtido corroborou com os dados computacionais, tendo sido confirmado que BIS causou inibição enzimática após 1 e 2 horas de incubação.

Por fim, o presente trabalho caracterizou pela primeira vez o efeito antiparasitário do (-)- α -bisabolol sobre as formas de vida de *Trypanosoma cruzi in vitro*. O presente trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos, bem como de ferramentas farmacológicas úteis no desenvolvimento científico e tecnológico no campo de estudo.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o álcool sesquiterpeno (-)- α -bisabolol apresenta efeito antiparasitário sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, com alta seletividade e baixa toxicidade em células hospedeiras. Seu efeito biológico está associado à indução de apoptose com aumento de espécies reativas de oxigênio intracelulares e alteração do potencial transmembrânico mitocondrial. Além disso, a indução de autofagia parece estar associada de forma tardia. Por fim, BIS demonstrou a capacidade de inibir a atividade enzimática de *tcGAPDH*, o que pode estar relacionado a seu efeito antiparasitário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C. M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.

ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids : Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 178–187, 2010.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1385, p. 103–110, 2015.

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 195–206, 2012.

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

ANTUNES, A. P. et al. Benznidazole therapy for Chagas disease in asymptomatic *Trypanosoma cruzi* -seropositive former blood donors: evaluation of the efficacy of different treatment regimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 713–720, 2016.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita. In: **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**. [s.l: s.n.]. p. 175–196.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE. Obtenção de Células de Camundongo para estudos in vitro em cultivo primário. In: **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**. [s.l: s.n.]. p. 288–314.

ARCHANA, M.; YOGESH, T. L.; KUMARASWAMY, K. L. Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. **Indian journal of cancer**, v. 50, n. 3, p. 274–83, 2013.

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

BALDISSERA, M. D. et al. A nanotechnology based new approach for Trypanosoma evansi chemotherapy: In vitro and vivo trypanocidal effect of (-)- α -bisabolol.

Experimental Parasitology, v. 170, p. 156–160, 2016.

BALDISSERA, M.; GRANDO, T.; SOUZA, C. Nerolidol nanospheres increases its trypanocidal efficacy against Trypanosoma evansi: New approach against diminazene aceturate resistance and toxicity. **Experimental**, v. 166, p. 144–149, 2016.

BASURCO, B. et al. Antigenotoxicity, Cytotoxicity, and Apoptosis Induction by Apigenin, Bisabolol, and Protocatechuic Acid Jaouad. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 276–283, 1995.

BERN, C. Chagas' Disease. **The new england journal of medicine**, v. 375, n. 5, p. 456–466, 2015.

BEZERRA, S. B. et al. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP⁺ channels. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 6, p. 1403–1406, 2009.

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

BRAGA, K. M. DA S. et al. CITOMETRIA DE FLUXO: HISTÓRICO, PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES EM PESQUISA. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 305–319, 2016.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.

BREITMAIER, E. Terpenes: importance, general structure and biosynthesis. In: **Terpenes**. [s.l: s.n.].

BUISSON, J.; BASTIN, P. Flagellum Structure and Function in Trypanosomes. In: SOUZA, W. DE (Ed.). . **Structures and Organelles in Pathogenic Protists**. Rio de Janeiro: Springer, 2008. p. 63–86.

BUITRAGO, A. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of Vismia macrophylla leaves and fruits collected in Tachira-Venezuela. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 2, p. 375–377, 2015.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease

with Benznidazole. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 44, p. 29–37, 2002.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 533–542, 2010.

CASTRO, S. L. DE et al. Avaliação de Parâmetros Parasitológicos e de Mortalidade. In: ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. DE (Eds.). . **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 219–236.

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

CAVALIERI, E. et al. Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 45, 2011.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Research and Development: Is There Light at the End of the Tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2016.

CHELESKI, J. et al. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Protein Expression and Purification**, v. 76, n. 2, p. 190–196, 2011.

CHEN, W. et al. α -Bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NF κ B. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 247–254, 2010a.

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

CHERKESOVA, T. S. et al. Sequence variation in CYP51A from the γ strain of

Trypanosoma cruzi alters its sensitivity to inhibition. **FEBS Letters**, v. 588, n. 21, p. 3878–3885, 2014.

CHEUKA, P. et al. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2016.

CHRISTENSEN, M. E. et al. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 138–145, 2013.

CHUNG, M. C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 10, p. 1127–1131, 1997.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. (-)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, p. 150615150117007, 2015.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. The sesquiterpene (-)- α -bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 21, n. 10, p. 1071–81, 2016.

CORRÊA, J. M. DA et al. Estimated Chagas' Disease mortality rate and cardiac and digestive sequelae incidence rate, Brazil, 2008 Estimativa de taxa de mortalidade e taxa de incidência de sequelas cardíacas e digestivas por doença de Chagas no Brasil, 2008*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde, Dez 2014**, v. 23, n. 4, p. 711–720, 2014.

COSTA, E. G. et al. Acute Chagas Disease in the Brazilian Amazon: Epidemiological and clinical features. **International Journal of Cardiology**, p. 8–10, 2017.

COSTA, M. et al. Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Biological Sciences**, 2011.

COSTARELLI, L. et al. In Vivo Effect of α -Bisabolol, a Nontoxic Sesquiterpene Alcohol, on the Induction of Spontaneous Mammary Tumors in HER-2/neu Transgenic Mice. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 409–418, 2010.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background

article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl, n. August, p. 113–122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

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

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

CUNHA-E-SILVA, N. et al. Reservosomes: Multipurpose organelles? **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 325–327, 2006.

CUNHA-FILHO, M. et al. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasília Med**, v. 49, n. 4, p. 279–283, 2012.

DA SILVA, A. P. et al. Antitumor activity of (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2987–2993, 2010.

DARRA, E. et al. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 113–123, 2008.

DAVANÇO, M. G. **FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2015.

DE LANA, M.; MARTINS-FILHO, O. A. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. (-)- α -Bisabolol inhibits preferentially electromechanical coupling on rat isolated arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 37–45,

2014.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicação e preparação de amostras**. Porto Alegre: [s.n.].

DEGENHARDT, J. et al. Attracting friends to feast on foes: Engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 169–176, 2003.

DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na molestia de Chagas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 35, n. 2, p. 335–345, 1940.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25, p. 7–86, 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. DE A. Artigo de Opinião / Opinion Article Mecanismos alternativos de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção Alternative transmission mechanisms of Trypanosoma cruzi in Brazil and proposals for their prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(3):375-379**, v. 44, n. 3, p. 375–379, 2011.

DIKALOV, S.; GRIENGLING, K. K.; HARRISON, D. G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. **Hypertension**, v. 49, p. 717–727, 2007.

DO BRASIL, P. E. A. A.; CASTRO, R.; DE CASTRO, L. Commercial enzyme-linked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 1–+, 2016.

DOCAMPO, R. et al. New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 305, p. 69–113, 2013.

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

DOS SANTOS, N. O. et al. Assessing the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants - Eremanthus erythropappus (Asteraceae), Plectrantuns barbatus, and P. amboinicus (Lamiaceae). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8440–8452, 2015.

- DUTRA, J. M. F. et al. Role of small GTPases in Trypanosoma cruzi invasion in MDCK cell lines. **Parasitology Research**, v. 96, n. 3, p. 171–177, 2005.
- FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina Clínica**, v. 148, n. 3, p. 125–131, 2017.
- FONSECA-BERZAL, C. et al. Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on Trypanosoma cruzi epimastigotes and amastigotes expressing β -galactosidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 17, p. 4851–4856, 2013.
- FRIKECHE, J. et al. Research on the immunosuppressive activity of ingredients contained in sunscreens. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 3, p. 211–218, 2015.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.
- GUDDAT, L. Drug targets for the treatment of protozoan parasitic diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 1–2, 2011.
- HARRIS, M. T.; MITCHELL, W. G.; MORRIS, J. C. Targeting protozoan parasite metabolism: glycolytic enzymes in the therapeutic crosshairs. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1668–1678, 2014.
- HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 2012.
- <http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-how%20it%20works-Diagram.jpg>.
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/235474?lang=pt®ion=BR>.
- <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-7.aspx#documentation>. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-7.aspx#documentation>>.
- <https://www.einstein.yu.edu/research/facilities/facs/page.aspx?id=22637>. Disponível em: <<https://www.einstein.yu.edu/research/facilities/facs/page.aspx?id=22637>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad>. Disponível em:

<<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

IANNI, B. M.; MADY, C.; PAULO, S. Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas . É Eficaz o Tratamento Etiológico ? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. n^o 1, p. 59–61, 1998.

IRIGOÍN, F. et al. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–742, 2008.

JAIN, V. et al. Cationic Nanoemulsions Bearing Ciprofloxacin Surf-Plexes Enhances Its Therapeutic Efficacy in Conditions of *E. coli* Induced Peritonitis and Sepsis. **Pharmaceutical Research**, p. 2630–2642, 2014.

JIA, X. et al. Cloning, Expression, and Characterization of a Novel Thermophilic Monofunctional Catalase from *Geobacillus* sp. CHB1. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

JIANG, S. et al. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel-induced apoptosis. **Planta Medica**, v. 77, n. 10, p. 1005–1012, 2011.

JIMENEZ, V. et al. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: A new therapeutic target? **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 11, p. 1411–1418, 2014.

JOHNSON, L. V et al. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Froc. Natl. Acad. Sc. USA Cell Biology**, v. 77, n. 2, p. 990–994, 1980.

JURBERG, J. et al. **Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas)** Rio de Janeiro FIOCRUZ, , 2014.

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

KHAN, M. O. F. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug target insights**, v. 2, n.

1999, p. 129–146, 2007.

KIM, J. et al. Enhanced topical delivery of small hydrophilic or lipophilic active agents and epidermal growth factor by fractional radiofrequency microporation.

Pharmaceutical Research, v. 29, n. 7, p. 2017–2029, 2012.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497–506, 2012.

KOLLIKER-FRERS, R. A. et al. Chagas disease prevalence in pregnant women: Migration and risk of congenital transmission. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 9, p. 895–901, 2016.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205–221, 2008.

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

Laboratório de Triatomíneos - FIOCRUZ. Disponível em:

<http://www.cpqrr.fiocruz.br/laboratorios/lab_triato/Triatomineos_Figura1.html>.

Acesso em: 3 dez. 2017.

LANA, M. DE; TAFURI, W. L. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. (Eds.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 85–108.

LATTES, R.; LASALA, M. B. Chagas disease in the immunosuppressed patient.

Clinical Microbiology and Infection, v. 20, n. 4, p. 300–309, 2014.

LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M. L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1–2, p. 81–96, 2002.

LEITE, G. D. O. et al. (-)-Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 208–211, 2011.

LIANG, Y. et al. Antitumor activity of the protein and small molecule component fractions from *Agrocybe aegerita* through enhancement of cytokine production.

Journal of medicinal food, v. 17, n. 4, p. 439–46, 2014.

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

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 7, p. 545–550, 2001.

LUQUETTI, A. et al. **Doença de Chagas - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e de saúde pública**. Brasília: [s.n.].

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 344–378.

MAKWANA, R. et al. The Effect of Phytocannabinoids on Airway Hyper-Responsiveness, Airway Inflammation, and Cough s. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS J Pharmacol Exp Ther**, v. 353, p. 169–180, 2015.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas**, v. 43, n. 5, p. 483–485, 2010.

MARCHIORI, E. Chagas disease : a tropical infection of interest to the radiologist. **Radiol Bras**, v. 49, n. 6, p. 2016–2017, 2016.

MARÍN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L. Forma crônica cardíaca. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 266–296.

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

MARTINS, A. V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi* : An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45–58, 2012.

MASSARICO SERAFIM, R. A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 418–425, 2014.

- MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. In: **Essays In Biochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 51p. 15–30.
- MAURYA, A. K. et al. α -(-)-bisabolol Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production and Ameliorates Skin Inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–81, 2014.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (*Matricaria recutita* L.). **PHYTOTHERAPY RESEARCH**, v. 20, p. 519–530, 2006.
- MCKEAN, P. G.; GULL, K. The Flagellar Pocket of Trypanosomatids: A Critical Feature for Cell Morphogenesis and Pathogenicity. In: SOUZA, W. DE (Ed.). . **Structures and Organelles in Pathogenic Protists**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. p. 87–114.
- MELLO, C. P. et al. Bothropoides insularis venom cytotoxicity in renal tubular epithelia cells. **Toxicon**, v. 88, p. 107–114, 2014.
- MELO, C. S.; GRECO, O. T. Carlos Chagas , o Imortal. **Relampa**, v. 22, n. 2, p. 50–51, 2009.
- MENEZES, I. R. et al. 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. **J Comput Aided Mol Des**, v. 17, n. 5–6, p. 277–290, 2003a.
- MENEZES, I. R. et al. 3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural products for glycosomal GAPDH of *Trypanosoma cruzi*. **J Comput Aided Mol Des**, v. 17, n. 5–6, p. 277–290, 2003b.
- MENEZES, R. R. P. P. B. et al. Antibacterial and Antiparasitic Effects of *Bothropoides lutzi* venom. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 1, p. 71–74, 2012.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 40, p. 157–168, 2009.
- MINTSERIS, J. et al. Integrating statistical pair potentials into protein complex prediction. **Proteins**, v. 69, p. 511–520, 2007.
- MONDAL, S. et al. In Vitro susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania*

donovani amastigote stages to andrographolide nanoparticle: Role of vitamin e derivative TPGS for nanoparticle efficacy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 279–281, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA ROCHA, N. F. et al. Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: The possible involved pharmacological mechanisms. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 63–71, 2010.

NAVARRO, M. et al. Cross-sectional, descriptive study of Chagas disease among citizens of Bolivian origin living in Munich, Germany. **BMJ open**, v. 7, n. 1, p. e013960, 2017.

NETO, V. A. et al. Observações sobre o TESA blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 534–535, 2005.

NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J. P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 8, p. 674–679, 2012.

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

OLIVERA, G. C.; POSTAN, M.; GONZÁLEZ, M. N. Effects of artesunate against *Trypanosma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 26–31, 2015.

OLMO, F. et al. Synthesis and evaluation of in vitro and in vivo trypanocidal properties of a new imidazole-containing nitrophthalazine derivative. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 106–119, 2015.

ORTÍ-LUCAS, R. M. et al. Impact of chagas disease in Bolivian immigrants living in Europe and the risk of stigmatization. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 2014.

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. p. 3154–3170, 2016.

PAVÃO, F. et al. Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1–3, p. 13–17, 2002.

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

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PEREIRA, T. P. **EFEITO TRIPANOCIDA DA L-AMINO ÁCIDO OXIDASE ISOLADA DO VENENO DA Bothrops marajoensis**. FORTALEZA: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2015.

PEREZ-MOLINA, J. A et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. {[Review]} [45 refs]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PETHERICK, A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1174–1174, 2011.

PETTERSEN, E. et al. UCSF Chimera -a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIACENZA, L. et al. Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 120521095928000, 2012.

PIERCE, B. G. et al. ZDOCK server: Interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. **Bioinformatics**, v. 30, n. 12, p. 1771–1773, 2014.

POKORNÝ, J. et al. Targeting mitochondria for cancer treatment - two types of mitochondrial dysfunction. **Prague medical report**, v. 115, n. 3–4, p. 104–19, 2014.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: Do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saude Publica**, v. 37, n. 1, p. 107–115, 2003.

PORTO-CARREIRO, I. et al. Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 11, p. 858–

869, 2000.

RAIMUNDO, S. M.; MASSAD, E.; YANG, H. M. Modelling congenital transmission of Chagas' disease. **BioSystems**, v. 99, n. 3, p. 215–222, 2010.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, maio 2010.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

REIS, M. et al. The catalytic mechanism of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* elucidated via the QM/MM approach. **Phys. Chem. Chem. Phys. Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 15, p. 3772–3785, 2013.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). . **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 297–343.

RIGO, A.; VINANTE, F. The antineoplastic agent α -bisabolol promotes cell death by inducing pores in mitochondria and lysosomes. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 21, n. 8, p. 917–27, 2016.

ROTTINI, M. M. et al. In vitro evaluation of (-)- α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66–72, 2015.

SAMPAIO, T. L. **EFEITO NEFROPROTETOR DO (-)- α -BISABOLOL NA LESÃO RENAL AGUDA EM MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO** Fortaleza Universidade Federal do Ceará, , 2016.

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

SANGENIS, L. H. C. et al. First Report of Acute Chagas Disease By Vector Transmission in Rio De Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 361–4, 2015.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; RASLAN, D. S. Complete assignments of NMR data and assessment of trypanocidal activity of new eremantholide C derivatives. v. 86, p. 1563–1571, 2014.

SCHITTINI, A. V. **CONSTRUÇÃO DE VETORES LENTIVIRAIS PORTANDO O GENE DA GFP SOB O CONTROLE DE PROMOTORES CARDÍACOS PARA A TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS INDUZIDAS A DIFERENCIAR EM CARDIOMIÓCITOS.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SEKI, T. et al. Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2199–2205, 2011.

SHERLOCK, Í. A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 21–40.

SILVA, J. J. N. et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: Enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 260–269, 2010.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812–822, 2004.

SOARES, R. O. A et al. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 381–387, 2011.

SOUSA, W. **Structures and Organelles in Pathogenic Protists.** Rio de Janeiro: Springer, 2010.

SOUZA, W. DE. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 88–126.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. Suppl. 1, p. 89–100, 2009.

SÜLSEN, V. P. et al. Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin C on *trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

SUMANTRAN, V. N. Cellular Chemosensitivity assays: An Overview. In: **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. [s.l: s.n.]. v. 731p. 219–236.

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

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. 1–13, 2012.

TELES, C. B. G. et al. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 165, 2015.

TESSAROLO, L. D. **ESTUDO IN VITRO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE BENZONIDAZOL EM CARBONATO DE CÁLCIO SOBRE CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi***. Fortaleza PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, , 2016.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, 2014.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 811–832, 2001.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. **Cell Signal**, v. 23, n. 2, p. 317–323, 2011.

UNCITI-BROCETA, J. D. et al. Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004942, 2015.

UNO, M. et al. α -Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation. v. 590, p. 583–589, 2016.

USUKI, T. et al. Antitrypanosomal structure-activity-relationship study of synthetic cynaropicrin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 3, p. 794–798, 2014.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of

mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, 2017.

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

VASOO, S.; PRITT, B. S. Molecular diagnostics and parasitic disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, n. 3, p. 461–503, 2013.

VILA, R. et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2510–2514, 2010.

WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 28–34, 2010.

WHEELER, R. J.; SUNTER, J. D.; GULL, K. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. **Journal of cell science**, v. 129, n. 4, p. 854–867, 2016.

WHO. **Global Health Observatory Map Gallery**. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png>. Acesso em: 4 fev. 2017.

WHO. **History of Chagas Disease**. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/epidemiology/epidemiology_history/en/>.

WHO. **Epidemiology**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 255–262, 2012.

YANG, L. et al. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 1, p. 29–36, 2012.

ZARGARAN, A. et al. Potential effect and mechanism of action of topical chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) oil on migraine headache: A medical hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 83, n. 5, p. 566–569, 2014.

ZHANG, E. et al. Newly developed strategies for multifunctional mitochondria-

targeted agents in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 3–4, p. 140–146, 2011.

ZINGALES, B. et al. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 811–814, 1997.