



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLOGICA EM MEDICAMENTOS**

PALOMA LEÃO SOUSA

EFEITO TRIPANOCIDA DOS ÁCIDOS BETULÍNICO E OLEANÓLICO

FORTALEZA

2017

PALOMA LEÃO SOUSA

EFEITO TRIPANOCIDA DOS ÁCIDOS BETULÍNICO E OLEANÓLICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Farmácia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. 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)

S698e Sousa, Paloma.
EFEITO TRIPANOCIDA DOS ÁCIDOS BETULÍNICO E OLEANÓLICO / Paloma Sousa. –
2017.
90 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UEPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.

1. Trypanosoma cruzi. 2. terpenos. 3. necrose. 4. autofagia. 5. apoptose. I. Título.

CDD 615.1

PALOMA LEÃO SOUSA

EFEITO TRIPANOCIDA DOS ÁCIDOS BETULÍNICO E OLEANÓLICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em: 27/ 03 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Oliveira de Moraes
Centro Universitário Católica De Quixadá

Prof^a. Dr^a. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC) - Suplente

Dedico,

a Deus, minha força e fé absoluta.

*Aos meus pais, Nazário e Gorete, meu
alicerce, orgulho e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus pais João Nazário e Maria Gorete (*in memoriam*) que sempre se dedicaram, apoiaram e acreditaram em mim.

À minha orientadora professora Dr^a. Alice Maria Costa Martins, não apenas pela sua orientação, mas por toda compreensão, confiança e conhecimento transmitido durante o doutorado.

Ao Professor Dr. Marcos André Vannier dos Santos, a professora Dr^a Maria Jania Teixeira, a professora Dr^a Isabel Cristina Oliveira de Morais, a professora Dr^a Maria de Fátima Oliveira e a professora Dr^a Maria Goretti Rodrigues de Queiroz por contribuir com a avaliação deste trabalho.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais Tiago Sampaio, Jáder Canuto, Louise Tessarolo, Dânya Bandeira, Gdayllon Cavalcante, Clarissa Perdigão, Izabel Justino, Lívia Fernandes, Marcus Felipe, Gabriela Bezerra, Thaiany Rocha, Raissa Lívia, Isabella Evelyn, Mariana Maciel pela ajuda, direta e indireta, na realização desse trabalho, assim como pelo incentivo e apoio nos momentos de desânimo.

Aos amigos Ms. Racquel Oliveira da Silva Souza e Ms. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes pela imensa ajuda proporcionada em todas as etapas deste trabalho.

Às amigas de doutorado Suelen Carneiro e Renata Eleutério por todo conhecimento compartilhado, dedicação, apoio e, principalmente, amizade.

Aos professores e as coordenadoras, professora Dr^a Romélia Pinheiro Gonçalves e professora Dr^a Marta Maria De França Fonteles, do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pela transmissão de seus conhecimentos, atenção e ajuda prestados.

À secretária Jéssica, pela atenção e auxílio.

À todos que fazem parte do Departamento de Farmácia pela cooperação e segurança prestada.

À CAPES pelo apoio financeiro.

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

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

Geraldo Eustáquio de Souza

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e constitui um problema de saúde pública em todo o mundo. O tratamento atual é restrito pelos efeitos colaterais frequentes e pela eficácia limitada do benzonidazol. O ácido betulínico (AB) e ácido oleanólico (AO), são triterpenos, existentes em diversas plantas medicinais e exibem uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo efeito em tripanossomatídeos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tripanocida e mecanismo de ação dos ácidos betulínico e oleanólico em cepa Y de *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. O efeito tripanocida do AB e AO (1,56 - 200 μM) foram avaliadas durante 24, 48 e 72 horas, sob formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. A viabilidade da célula LLCMK2, tratada com AB e AO (200 - 1600 μM), foi avaliada durante 24 h através do teste MTT. Os ensaios de mecanismo de ação foram realizados nas formas epimastigotas tratadas com CI50 do AB e AO durante 24 h, e marcadas com anexina V/7AAD, Rho123, H2DCFDA, Laranja de Acridina e MDC de acordo com as instruções do fabricante e analisadas por citometria de fluxo e microscopia confocal. Os dados foram analisados utilizando ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou teste t Student, * $p \leq 0,05$. O AB inibiu o crescimento de formas epimastigotas em 24h (CI50 = 73,43 μM ; BZ = 218 μM), 48h (CI50 = 119,8 μM ; BZ = 61 μM) e 72h (CI50 = 212,2 μM ; BZ = 16,5 μM) de incubação; inibiu a viabilidade de tripomastigotas (CI50 = 51,88 μM ; BZ = 257 μM) em 24h. O AO inibiu o crescimento de epimastigotas em 24h (CI50 = 11,66 μM ; BZ = 218 μM), 48h (CI50 = 43,15 μM ; BZ = 61 μM) e 72h (CI50 = 43,05 μM ; BZ = 16,5 μM) de incubação; inibiu a viabilidade de tripomastigotas (IC50 = 13,97 μM ; BZ = 257 μM) em 24h. O AB e AO diminuíram o percentual de células infectadas e reduziram o número de amastigotas por células nos tratamentos com 24h e 48 h, respectivamente. Ambos terpenos não apresentaram toxicidade sobre as células LLCMK2 nas concentrações utilizadas. A análise do mecanismo de morte celular do parasito tratado com AB mostrou alterações no potencial da membrana mitocondrial, alterações na integridade da membrana celular, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e detecção de compartimentos ácidos. O tratamento com AO demonstrou detecção de compartimentos ácidos e de vacúolos autofágicos. Nossos resultados demonstram que o AB e AO apresentam efeito tripanocida sobre todas as formas evolutivas de cepa Y de *T. cruzi*, sugerindo que o mecanismo de morte celular do AB é via necrose e do AO via autofagia nas formas epimastigotas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, terpenos, necrose, autofagia, apoptose.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is a public health problem worldwide. Current treatment is restricted by the frequent side effects and limited efficacy of benznidazole. Betulinic acid (BA) and oleanolic acid (OA) are triterpenes found in several medicinal plants and exhibit a wide variety of biological and pharmacological activities, including an effect on trypanosomatids. The objective of the present study was to evaluate the trypanocidal effect and mechanism of action of betulinic and oleanolic acids on *Trypanosoma cruzi* strain Y *in vitro*. Antiproliferative activity of BA and OA (1.56 - 200 μM) were evaluated during 24, 48 and 72 hours on epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*. Viability of LLCMK2 cells, treated with BA and OA (200-1600 μM), was evaluated for 24 h using the MTT assay. The mechanism of action assays were performed on the epimastigote forms treated with IC₅₀ of BA and OA, incubated for 24 h, then labeled with annexin V/7AAD, Rho123, H2DCFDA, Acridine Orange and MDC according to the manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. Data were analyzed using ANOVA with Bonferroni post-test or Student's t-test, * $p \leq 0.05$. BA inhibited the growth of epimastigotes after 24h (IC₅₀ = 73.43 μM ; BZ = 218 μM), 48h (IC₅₀ = 119.8 μM ; BZ = 61 μM) and 72h (IC₅₀ = 212.2 μM ; BZ = 16.5 μM) of incubation and inhibited the viability of trypomastigotes (IC₅₀ = 51.88 μM ; BZ = 257 μM) after 24 h. OA inhibited the growth of epimastigotes after 24 h (IC₅₀ = 11.66 μM , BZ = 218 μM), 48 h (IC₅₀ = 43.15 μM , BZ = 61 μM), and 72 h IC₅₀ = 43.05 μM ; BZ = 16.5 μM) of incubation and inhibited the viability of trypomastigotes (IC₅₀ = 13.97 μM ; BZ = 257 μM) after 24 h. BA and OA decreased the percentage of infected cells and reduced the number of amastigotes per cell 24h and 48h after treatments, respectively. Both terpenes showed no toxicity on LLCMK2 cells at the concentrations used in trypanocidal tests. The analysis of cell death mechanism of the BA-treated parasites showed alterations in mitochondrial membrane potential, changes in cell membrane integrity, increased formation of reactive oxygen species and detection of acidic compartments. The treatment with OA demonstrated the detection of acidic compartments and autophagic vacuoles. Our results demonstrate that BA and OA have a trypanocidal effect on all evolutionary forms of *T. cruzi* Y strain, suggesting that the BA mechanism of cell death occurs through necrosis and that of the OA through autophagy in epimastigote forms.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, terpenes, necrosis, autophagy, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição dos casos de doença de Chagas notificados à WHO, em todo o mundo, 2010-2013.....	19
Figura 2	Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil de 2005 a 2013.....	20
Figura 3	– Diferenciação dos gêneros <i>Panstrongylus</i> , <i>Rhodnius</i> e <i>Triatoma</i>	21
Figura 4	– Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 5	– Representações esquemáticas das organelas das formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 6	– Manifestações clínicas da doença de Chagas.....	29
Figura 7	– Estrutura química do ácido betulínico.....	34
Figura 8	– Estrutura química do ácido oleanólico.....	36
Figura 9	– Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de células LLCMK2 após 24h de tratamento.....	48
Figura 10	– Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	49
Figura 11	– Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	51
Figura 12	– Efeito do ácido betulínico sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h e 48 h de tratamento.....	53
Figura 13	– Efeito ácido betulínico sobre $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	54
Figura 14	– Efeito ácido betulínico sobre o aumento da formação de EROs nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.	56
Figura 15	– Mecanismo de morte celular por necrose após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com ácido betulínico.....	57

Figura 16 – Mecanismo de morte celular por autofagia após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com ácido betulínico.....	58
Figura 17 – Efeito do ácido oleanólico sobre a viabilidade de células LLCMK2 após 24h de tratamento.....	60
Figura 18 – Efeito ácido oleanólico sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	61
Figura 19 – Efeito do ácido oleanólico sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	63
Figura 20 – Efeito do ácido oleanólico sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h e 48 h de tratamento.....	65
Figura 21 – Efeito do ácido oleanólico sobre $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	67
Figura 22 – Efeito do ácido oleanólico sobre o aumento da formação de EROs nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento..	68
Figura 23 – Mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com ácido oleanólico.....	69
Figura 24 – Efeito do ácido oleanólico sobre o aumento da laranja de acridina nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento..	70
Figura 25 – Efeito do ácido oleanólico marcado com MDC nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 3, 6, 12 e 24 horas de tratamento....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antiparasitária do ácido betulínico sobre formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade de células hospedeiras.....	52
Tabela 2 – Atividade antiparasitária do ácido oleanólico sobre formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade de células hospedeiras.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	Amino Actinomicina D
AB	Ácido Betulínico
Anexina V-PE	Anexina V- Ficoeritrina
AO	Ácido Oleanólico
ATP	Adenosina Trifosfato
B2R	Receptor de Bradiquinina
BZ	Benzonidazol
Ca ²⁺	Cálcio
CI ₅₀	Concentração Capaz de Inibir 50% do Crescimento Celular
DC	Doença de Chagas
DCF	Diclorofluoresceína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Densidade Parasitária
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETAR	Receptores de Endotelina
FC	Fator da Correção
FCI	Forma Crônica Indeterminada
FD	Fator de Diluição
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H2DCFDA	2'7'-Diclorodihidrofluoresceína 39
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LIT	Liver Infusion Tryptose
LLCMK2	Célula de Mamíferos <i>Rhesus Monkey Kidney</i>
LNDT	Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais
MDC	Monodansilcadaverina
MTT	Teste do Brometo De 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-II)-2,5difeniltetrazólio
NFX	Nifurtimox

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS/OMS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PS	Fosfatidilserina
Rho123	Rodamina 123
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Surfactante Dodecilsulfato de Sódio
SODs	Superóxido Dismutases
TLRs	Receptores Intracelulares Tipo Toll
UFC	Universidade Federal do Ceará
$\Delta\Psi_m$	Potencial Transmembrânico Mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Doença de Chagas	18
1.2	Vias de transmissão da DC	20
1.3	Biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.4	Fases clínicas da DC	28
1.5	Mecanismos de morte celular em parasitos de Tripanossomatídeos	30
1.6	Tratamento farmacológico da DC	32
1.7	Ácido betulínico e ácido oleanólico	33
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivos Específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Substâncias em estudo e preparo das soluções	38
3.2	Linhagens celulares	38
3.3	Ensaio de citotoxicidade em células LLCMK2	38
3.3.1	<i>Cultivo de células LLCMK2</i>	38
3.3.2	<i>Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em células hospedeiras LLCMK2</i>	39
3.4	Ensaio com formas epimastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i>	40
3.4.1	<i>Cultivo das formas epimastigotas</i>	40
3.4.2	<i>Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas epimastigotas</i>	40
3.5	Ensaio com formas tripomastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i>	41
3.5.1	<i>Cultivo das formas tripomastigotas</i>	41
3.5.2	<i>Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas tripomastigotas</i>	41
3.6	Ensaio com formas amastigotas de cepa Y de <i>T. cruzi</i>	42
3.6.1	<i>Cultivo das formas amastigotas</i>	42
3.6.2	<i>Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas amastigotas</i>	42
3.7	Avaliação do efeito dos ácidos betulínico e oleanólico em	43

	diferentes tipos de morte celular.....	
3.7.1	Avaliação de apoptose e/ou necrose.....	43
3.7.2	Avaliação de autofagia.....	44
3.7.2.1	Laranja de acridina.....	44
3.7.2.2	Monodansilcadaverina (MDC).....	45
3.7.3	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	45
3.7.4	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	46
3.8	Análise estatística.....	46
9	PARTE 1: Estudo <i>in vitro</i> da atividade tripanocida do ácido betulínico em cepa y de <i>T. cruzi</i>.....	47
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico sobre a viabilidade de células LLCMK2.....	48
4.2	Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	48
4.3	Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	50
4.4	Relação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e células hospedeiras.....	51
4.5	Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	52
4.6	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	54
4.7	Determinação do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio.....	55
4.8	Determinação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose.....	56
4.9	Determinação de morte celular por autofagia.....	57
	PARTE 2: Estudo <i>in vitro</i> da atividade tripanocida do ácido oleanólico em cepa y de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico sobre a viabilidade de células LLCMK2.....	60
5.2	Determinação do efeito citotóxico ácido oleanólico em formas	60

	epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	
5.3	Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
5.4	Relação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e células hospedeiras.....	63
5.5	Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
5.6	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial.....	66
5.7	Determinação do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio.....	68
5.8	Determinação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose.....	68
5.9	Determinação de morte celular por autofagia.....	70
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: histórico e epidemiologia

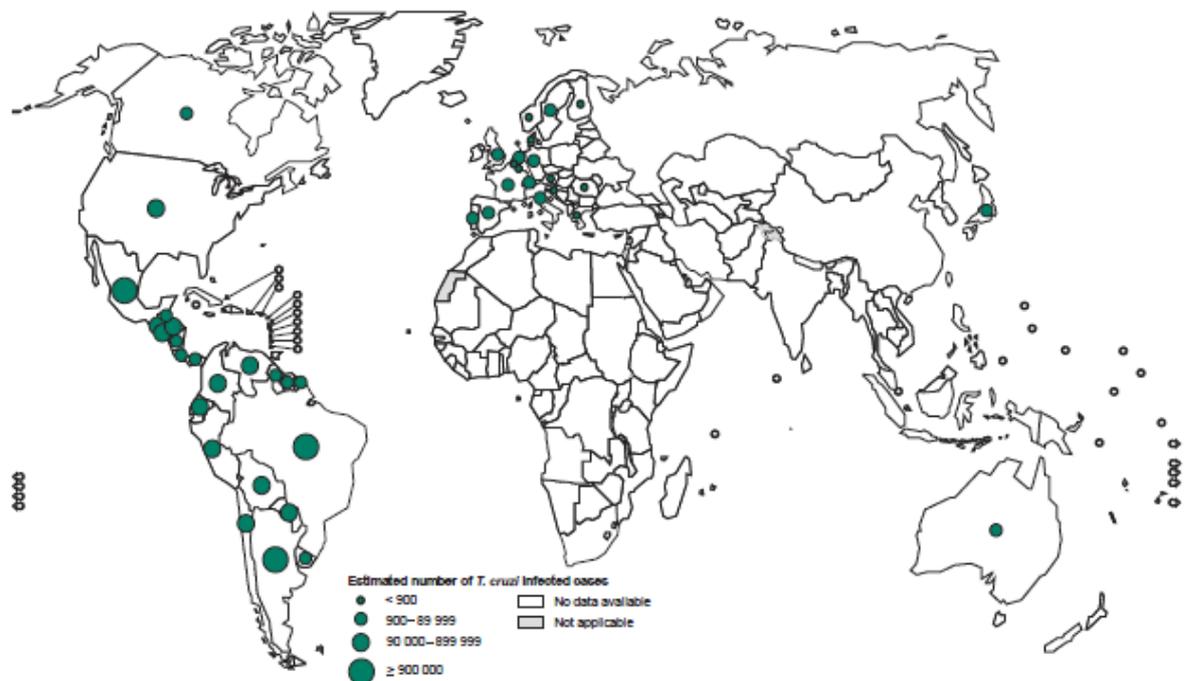
A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, é uma infecção causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934) (CHAGAS, 1909).

Cinco períodos epidemiológicos podem ser considerados na história da doença de Chagas. O primeiro foi após um período pré-hominídeo; um segundo período foi quando os seres humanos iniciaram sua chegada às Américas (26 000-12 000 anos atrás) e contraíram as primeiras infecções acidentais. Um terceiro período iniciou-se a partir do século XVI, com a colonização humana e a agricultura inicial, com o consequente desmatamento e o desenvolvimento das rotas de transporte marítimo, terrestre e ferroviário que contribuíram para o estabelecimento de focos zoonóticos e disseminação da infecção dentro e além das Américas (COURA; VIÑAS, 2010).

Um quarto período iniciou-se no século XX com o primeiro estudo da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), a concepção e implementação de iniciativas de controle para interromper a transmissão da infecção e prestar cuidados às populações afetadas. Ao mesmo tempo, no entanto, com o estabelecimento de rotas de tráfego aéreo, a urbanização e os intercâmbios intercontinentais da população, iniciou-se um quinto período, atual, caracterizado por desafios remanescentes de períodos anteriores, novos desafios e o primeiro controle favorecido por um contexto de transformações econômicas e sociais positivas em muitos países (COURA; VIÑAS, 2010; WHO, 2015).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo a maioria na América Latina (WHO, 2017). A figura 1 demonstra a distribuição mundial da doença de Chagas (Figura 1).

Figura 1. Distribuição dos casos de doença de Chagas notificados à OMS, em todo o mundo, 2010-2013.



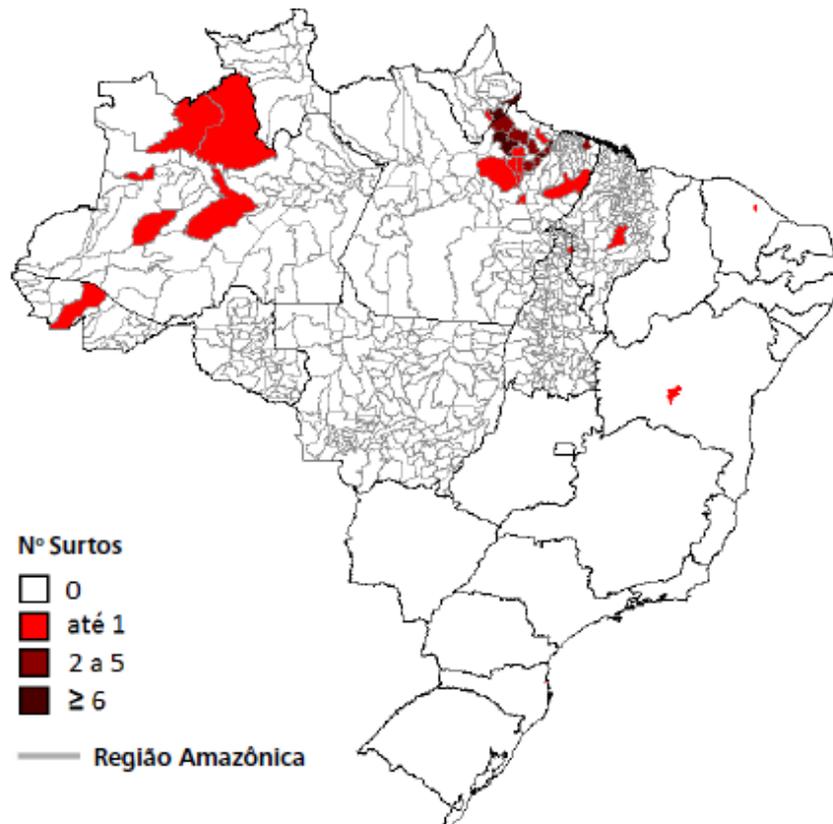
Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/ (Accessed october 17, 2016).

A prevalência da doença de Chagas no Brasil iniciou entre 1975 e 1980, na população rural, com dados de 6,5 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Em 1996 foi estimada para um número de 1,96 milhões de pessoas infectadas e, posteriormente, após 2000, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) estimou o número de pessoas expostas ao risco em áreas endêmicas em 21,8 milhões, sendo de 1,9 milhão o número de pessoas infectadas. Neste estudo, as maiores prevalências foram verificadas em mulheres, maiores de 60 anos, residentes nas regiões Nordeste e Sudeste e em áreas mistas, urbana/rural (DIAS et al., 2016)

No período de 2000 a 2013 foram notificados 1.570 casos de doença de Chagas aguda, oriundos de registros da maioria dos estados brasileiros. A maioria destes casos (1.430, 91,1%) concentrava-se na região Norte, seguida pelas regiões Nordeste (73, 4,7%), Sul (28, 0,2%), Centro-Oeste (27, 1,8%) e Sudeste (12, 0,8%)

(Figura 2). Ressalta-se que o Estado do Pará foi responsável por 75% de todos os casos no país e por 82% dos casos da região Norte (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; DIAS et al., 2016).

Figura 2. Distribuição dos surtos de doença de Chagas aguda ocorridos no Brasil de 2005 a 2013.



Fonte: Sinan e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado em maio/2014. Dados sujeitos a alteração.

Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015.

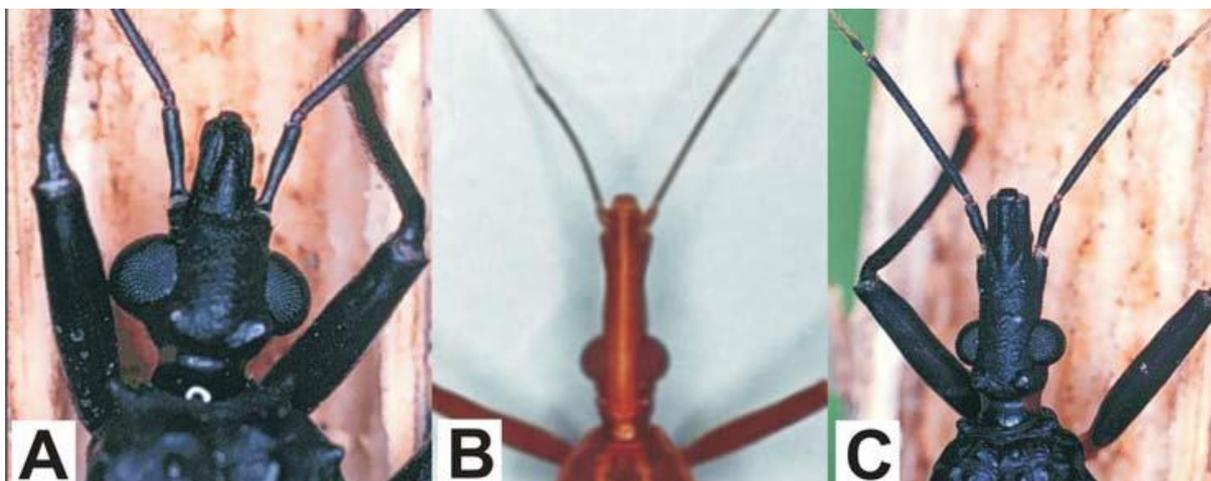
1.2 Vias de transmissão da DC

A doença de Chagas é transmitida aos seres humanos por cinco maneiras. A principal é chamada transmissão vetorial, pelas fezes e/ou urina de insetos hemípteros triatomíneos hematófagos. Entre os mecanismos não-vetoriais, destacam-se a transmissão oral, transfusional, congênita e as causadas por acidente de trabalho (DIAS; AMATO NETO, 2011; COURA, 2015).

A transmissão vetorial é realizada por insetos hemípteros hematófagos chamados triatomíneos. Estes insetos possuem tamanho e cores variadas, sob a

forma de manchas espalhadas em diversas regiões do corpo. Os três gêneros de interesse médico apresentam características anatômicas distintas específicas, que permitem a sua diferenciação. O gênero *Panstrongylus* spp. apresenta cabeça curta, de aspecto “robusto”, com a inserção das antenas na região imediatamente anterior aos olhos; o gênero *Rhodnius* spp. apresenta a cabeça alongada, com a inserção das antenas bem próxima ao ápice da cabeça; e o gênero *Triatoma* apresenta cabeça de tamanho médio, com a inserção das antenas na metade da distância entre os olhos e o ápice da cabeça (ARGOLO et al., 2008; GUARNERI; LORENZO, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Diferenciação dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*.



Fonte: ARGOLO et al., 2008.

Legenda: *Panstrongylus* (A); *Rhodnius* (B); *Triatoma* (C).

As principais espécies de triatomíneos associadas à transmissão vetorial são *T. infestans*, *P. megistus*, *R. prolixus*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*, *T. maculata*, *P. geniculatus*, *R. ecuadoriensis* e *R. pallenscens*, distribuídos na América do Sul e Central, mas o *T. infestans* foi controlado no Uruguai, Chile, Brasil e Paraguai, bem como em cinco províncias da Argentina (ARGOLO et al., 2008). Dados recentes do Ministério da Saúde, de 2007 a 2011, indicam o registro da captura de mais de 770 mil triatomíneos nos contextos locais de domicílios e peridomicílios no país (DIAS et al., 2016).

A transmissão oral está entre as transmissões não vetoriais, sendo uma

rota de infecção em crescimento. É responsável pelos surtos de doença de Chagas aguda associada à ingestão de alimentos contaminados com fezes ou urina de triatomíneos. A infecção através dessa via é crescente, pois mais de 100 espécies de mamíferos servem como reservatórios para o *T. cruzi* (NOYA; GONZÁLEZ, 2015).

Registros epidemiológicos no Brasil remetem que a transmissão oral de *T. cruzi* vem ampliando a sua relevância, registrando surtos ou microepidemias, principalmente, nos estados do Amazonas, Rio Grande do Sul, Pará, Paraíba, Santa Catarina, Bahia e Ceará (DIAS; AMATO NETO, 2011; GILBER et al., 2013). O Ministério da Saúde contabilizou 112 surtos no território nacional entre 2005 e 2013, envolvendo em sua totalidade 35 municípios da Região Amazônica. A fonte provável de infecção foi a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, entre eles: açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu (DIAS et al., 2016).

O terceiro tipo de transmissão de *T. cruzi* é através da transfusão de sangue, a qual teve ampliação pelo processo de expansão para grandes cidades e capitais da doença de Chagas nos países endêmicos na América Latina (DIAS et al., 2016). Essa via transfusional depende de diferentes fatores, tais como a presença do parasito no sangue ou componente transfundido; o estado imunológico do receptor; a qualidade na triagem clínico-epidemiológica; o nível de cobertura da triagem sorológica dos doadores e a sensibilidade dos testes sorológicos empregados (ANGHEBEN et al., 2015; COURA, 2015).

Dados do Ministério da Saúde demonstraram uma redução de mais de 95% da incidência de doença de Chagas por transfusão de sangue em diferentes regiões geográficas do Brasil em 2006 e, com base no ano de 2010, estimaram em 0,18% esta incidência no país (DIAS; AMATO NETO, 2011; DIAS et al., 2016). Registrou-se, também, uma grande redução do risco da transmissão transfusional da doença de Chagas em toda a América Latina (ANGHEBEN et al., 2015).

A transmissão vertical de *T. cruzi* considera basicamente as crianças nascidas de mães infectadas, com a confirmação do parasito no sangue do recém-nascido e/ou a detecção de anticorpos não-maternos na criança após os 9 meses de idade, desde que excluídos outros mecanismos de transmissão (DIAS; AMATO NETO, 2011). Ressalta-se que a transmissão vertical pode ser repetida a cada gravidez, durante todo o período fértil da vida de uma mulher (DIAS; AMATO NETO, 2011; COURA, 2015).

A nível mundial, a prevalência da doença de Chagas congênita tem

variado de 1 a 40%, sendo que aproximadamente 1,8 milhão de mulheres em idade fértil estavam infectadas na América Latina (COURA, 2015). No Brasil, não há registros epidemiológicos para esse mecanismo de transmissão, entretanto apresenta ainda relativa importância, a despeito da ausência de ações sistemáticas de prevenção desta modalidade no país (DIAS et al., 2016).

A quinta maneira de transmissão da Doença de Chagas é pouco constatada, pois ocorre através de acidentes em diferentes contextos, tais como, laboratórios, ações de captura do vetor em áreas endêmicas, trabalhos experimentais com mamíferos infectados e culturas, infecção cirúrgica e coleta de sangue a partir de pessoas com infecção aguda. Entretanto, os fatores de risco ocorrem devido ao desconhecimento, desatenção, falta ou mau uso de equipamentos de proteção individual, instalações e equipamentos inadequados, iluminação deficiente, falta de capacitação e não adoção de protocolos técnicos na rotina (COURA, 2015).

De maneira geral, estimativas da OMS (2000 a 2013), demonstram que casos de doença de Chagas no Brasil originários da forma de transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos (68,9%), seguida pela transmissão vetorial em 100 casos (6,4%), outras formas de transmissão (transfusional ou acidental) corresponde a 0,7% dos casos e por transmissão vertical foi de 0,4%, entretanto 372 (23,7%) casos notificados não foram identificados a forma de transmissão (DIAS et al., 2016).

1.3 Biologia do *Trypanosoma cruzi*

Os protozoários da família Trypanosomatidae são importantes patógenos humanos responsáveis por milhões de infecções em todo o mundo. O hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* apresenta-se sob três formas evolutivas diferentes: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Os parasitos são adaptados às necessidades de seu desenvolvimento nos hospedeiros, um invertebrado (triatomíneo) e outro vertebrado (mamíferos, incluindo o homem) (BRENER, 1973).

Durante o ciclo evolutivo de *T. cruzi*, este encontra condições ambientais oscilantes, pois enfrenta reações imunológicas dos hospedeiros de mamíferos e insetos vetores. Deste modo, a adaptação a tais desafios resulta na transmissão do parasito e está interligada com seu próprio processo de diferenciação, uma vez que alguns dos estressores, como pH ácido e privação de nutrientes, desencadeiam a

transição de um estágio de desenvolvimento para outro (JIMENEZ, 2014).

O ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 4) inicia-se quando os invertebrados, triatomíneos, se alimentam em um vertebrado infectado através do repasto sanguíneo que contém tripomastigotas circulantes. No estômago do inseto, a maioria dos tripomastigotas são mortos (TYLER; ENGMAN, 2001), mas os parasitos sobreviventes diferenciam-se em epimastigotas. Estes migram através do intestino médio, onde se dividem e se ligam às membranas perimicrovilares antes da diferenciação em tripomastigotas metacíclicos infectantes. No intestino posterior e no reto, os tripomastigotas metacíclicos livres são misturados com a urina e as fezes, e liberados pela defecação durante o ciclo de alimentação seguinte. A infecção humana comumente ocorre por penetração das formas tripomastigotas em lesões mucosas e epiteliais após a picada e defecação do inseto (TYLER; ENGMAN, 2001; CARADONNA; BURLEIGH, 2011).

O ciclo de invasão e replicação de *T. cruzi* em células hospedeiras é fundamental para a infecção. Inicia-se com a entrada de formas tripomastigotas em células não imunes, desencadeando o fluxo de cálcio (Ca^{2+}) em células hospedeiras que por sua vez estimula a despolimerização transitória do citoesqueleto de actina cortical (RODRIGUEZ et al., 1999) e promove a exocitose de lisossomas. Além de desencadear o fluxo de Ca^{2+} , os tripomastigotas ativam uma série de vias de sinalização em células de mamíferos, incluindo pulsos do nucleotídeo cíclico cAMP (RODRIGUEZ et al., 1999), ativação de tirosina cinase (YOSHIDA et al., 2000; GALLO et al., 2011) e fosfatidil-3-quinase (WOOLSEY et al., 2003), ou ação de tirosina fosfatases (ZHONG et al., 1998).

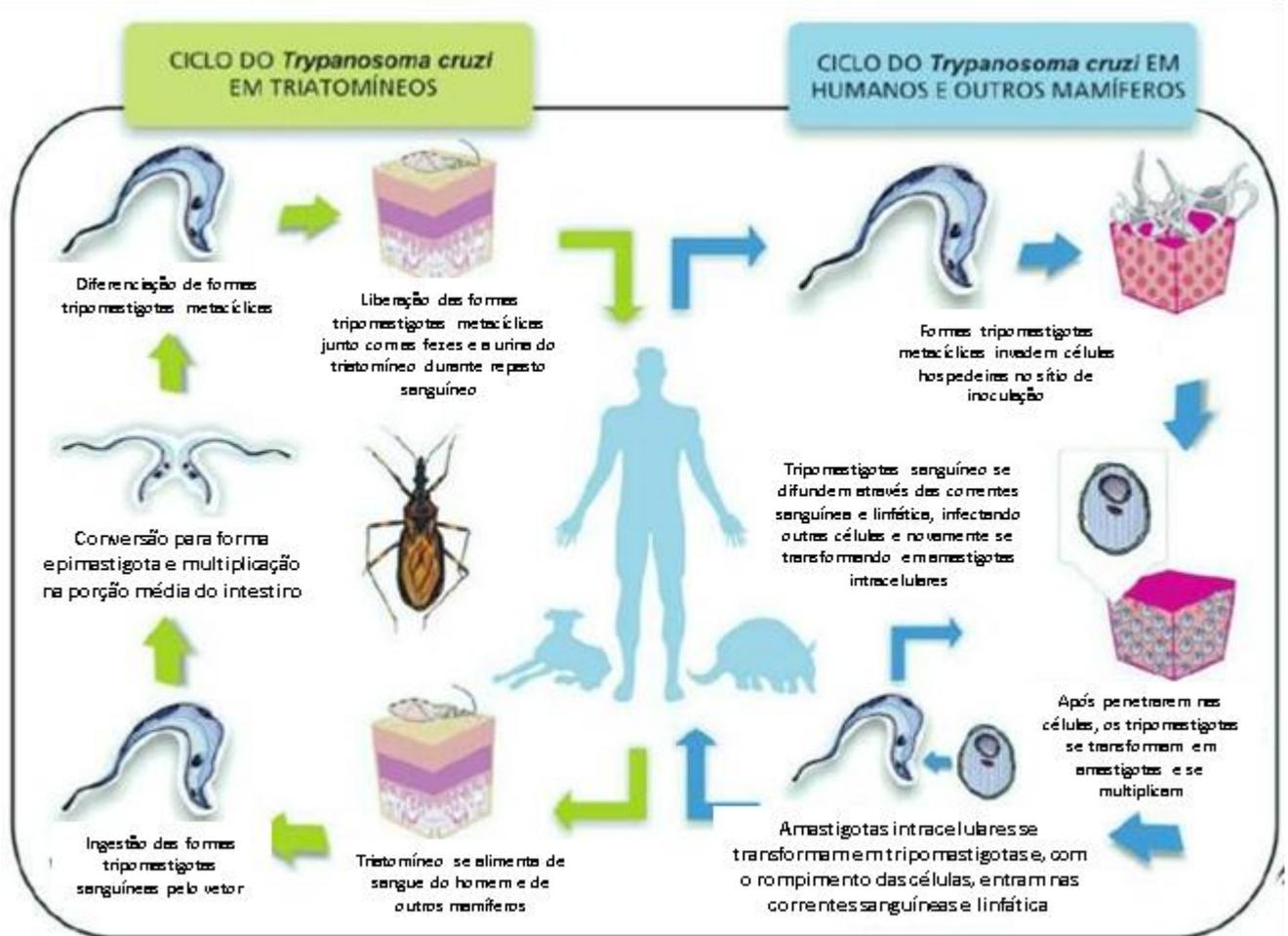
O *T. cruzi* possui um arsenal de proteínas poliméricas de superfície ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), como trans-sialidases, mucinas e outras, para ligar e invadir as células hospedeiras, levando à formação do vacúolo parasitóforo (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Deste modo, os tripomastigotas metacíclicos invadem macrófagos, fibroblastos e células epiteliais no local da inoculação e são inicialmente contidos em um vacúolo parasitóforo endocítico transitório (TYLER; ENGMAN, 2001; JIMENEZ, 2014), o qual permite a sobrevivência do parasito, sendo um mecanismo-chave importante para a ativação que permite ao parasito escapar do fagossoma no citoplasma, onde se diferencia nas formas amastigotas replicativas (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Uma vez no citoplasma, os amastigotas se multiplicam por fissão binária. Como intracelular obrigatório, os amastigotas de *T. cruzi* utilizam claramente a reserva de nutrientes presentes na célula hospedeira; contudo, pouco se sabe sobre a contribuição da célula hospedeira para sustentar o crescimento e a sobrevivência do parasito intracelular. À medida que as amastigotas se acumulam se transformam em tripomastigotas sanguínea. Os parasitos liberados da célula hospedeira disseminam-se por todo o corpo através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para encontrar novas células a fim de invadir. Esse processo é contínuo durante toda vida útil do hospedeiro (NAGAJYOTHI et al., 2012).

As interações moleculares que medeiam o reconhecimento do hospedeiro por *T. cruzi* ainda não foram muito bem definidas, e a complexidade dos eventos é acentuada pelas diferenças existentes entre as cepas e as formas infectivas do parasito (tripomastigotas metacíclica ou sanguícola). Entre os eventos estudados até o momento, a interação entre as glicoproteínas de superfície de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular e o citoesqueleto do hospedeiro parece ser crucial para o sucesso da invasão do parasito (MAEDA et al., 2012).

Embora qualquer célula de mamífero nucleada possa ser parasitada por *T. cruzi*, esses parecem identificar-se mais com as células dos sistemas reticuloendotelial, nervoso e muscular, incluindo o coração (NAGAJYOTHI et al., 2012). Além disso, observações realizadas na última década demonstram que os adipócitos são prontamente invadidos por tripomastigotas e podem servir como um reservatório a partir do qual a infecção pode ser reativada (COMBS et al., 2005).

Figura 4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: ARGOLO et al., 2008.

Ademais, o *T. cruzi* usa várias outras estratégias para atrasar a geração de uma resposta imune eficaz. Assim, o parasito consegue se disseminar através da corrente sanguínea para muitos tecidos durante a fase aguda da doença. Com a estimulação de resposta imune inata, tais como, os receptores intracelulares tipo toll (TLRs) 7 e 9, seguidos pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Essa resposta é importante para o controle da parasitemia e parasitismo tecidual, mas esta resposta imune não consegue eliminar a infecção parasitária, levando à fase crônica da doença de Chagas (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

A morfologia do parasito sofre mudanças conforme a sua forma evolutiva. As formas epimastigotas apresentam forma de fuso (20 - 40 μm de comprimento) e são capazes de se dividir. As formas tripomastigotas têm um comprimento de cerca de 25 μm e um diâmetro de cerca de 1 μm , e não são capazes de replicar. Por último,

a forma amastigota, também conhecido como esferomastigota é apresenta flagelo interiorizado e pode ser obtida a partir de diferentes fontes, demonstrando que elas também são infecciosas às células vertebradas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 2002).

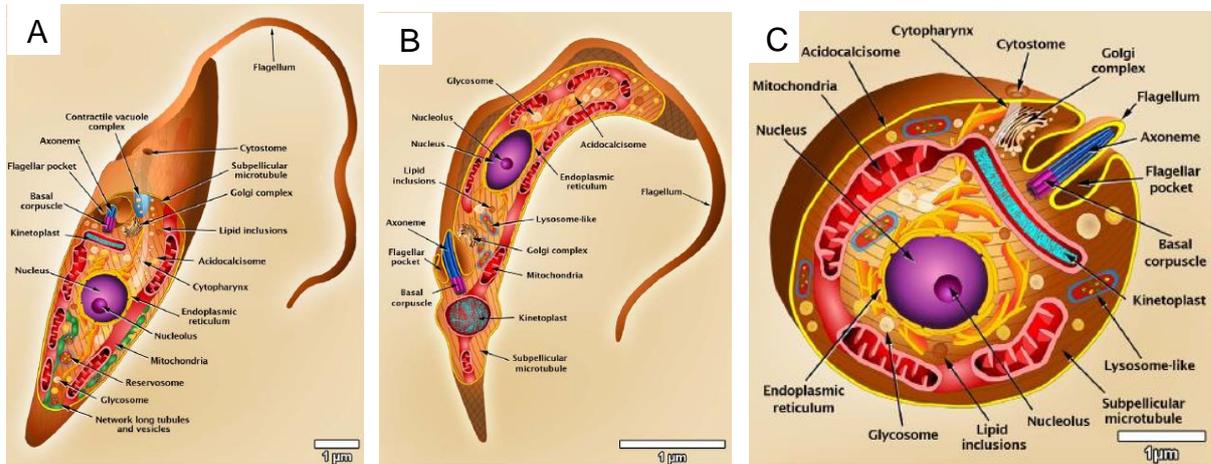
Algumas organelas são importantes para a sobrevivência de *T. cruzi* em seus hospedeiros. O flagelo, que emerge ao longo do parasito, é responsável pela mobilidade das formas tripomastigotas e epimastigotas (DE SOUZA, 2002; ELIAS et al., 2007). *T. cruzi*, assim como outros tripanossomatídeos, possui apenas uma mitocôndria que se estende por todo o corpo celular. Na matriz mitocondrial, encontra-se uma estrutura rica em DNA, que forma o cinetoplasto. Nas formas epimastigotas e amastigotas, o cinetoplasto apresenta uma morfologia similar (STUART et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011).

O núcleo nas formas epimastigotas e amastigotas são semelhantes, apresentando uma forma arredondada e envelope nuclear típico munida de poros. Entretanto, nas formas tripomastigotas o núcleo é alongado e localizado na porção central da célula. A continuidade entre a membrana nuclear externa e o retículo endoplasmático é evidente (DE SOUZA, 2002).

Os reservossomos são organelas particularmente interessantes, pois são encontradas exclusivamente no sub-gênero *Schizotrypanum*, como *T. vespertilionis*, *T. dionisii* e *T. cruzi*. Essas organelas são únicas e apresentam papel central no ciclo de vida de *T. cruzi*, em particular, nos epimastigotas. Além de armazenar macromoléculas e concentrar hidrolases lisossômicas, também degradam e regulam proteínas (SOARES, 1999; DE SOUZA, 2002). Outra organela importante para *T. cruzi*, assim como para outros tripanossomatídeos, são os acidocalcissomas que estão envolvidos em diversas funções, tais como armazenamento de compostos de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e fósforo; homeostase do pH e osmoregulação (DE SOUZA, 2002; MIRANDA et al., 2008).

A Figura 5 mostra uma representação esquemática com aspectos morfológicos das diferentes formas do ciclo evolutivo de *T. cruzi* baseada em microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Figura 5. Representações esquemáticas das organelas das formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: TEIXEIRA et al., 2012.

Legenda: (A) epimastigotas; (B) tripomastigotas e (C) amastigotas. Estas imagens foram feitas com base em micrografias de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

1.4 Fases clínicas da DC

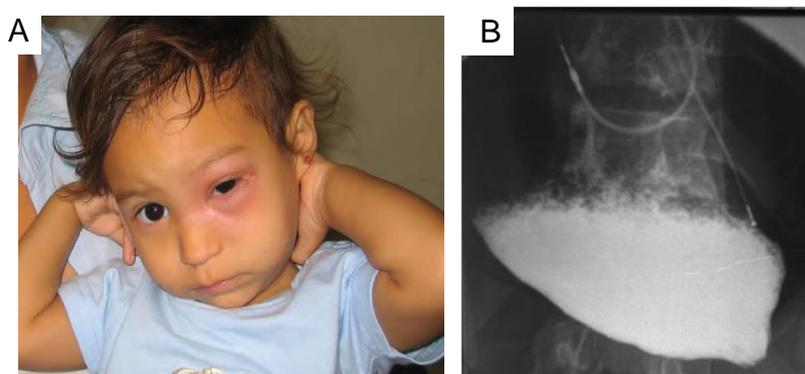
A doença de Chagas é caracterizada por duas principais fases clínicas: aguda e crônica. O diagnóstico durante a fase aguda inicial ou fase crônica precoce proporciona uma oportunidade crítica, mas limitada no tempo, para detectar e tratar os doentes com medicamentos antiparasitários. O diagnóstico precoce pode prevenir diagnóstico errado, levando a morbidade, consequente mortalidade e possíveis coinfeções e co-morbidades na fase crônica (WHO, 2015).

Os sintomas da fase aguda da doença de Chagas (Figura 6A) são leves e inespecíficos, tais como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em casos raros, pode ocorrer um edema prolongado periorbital unilateral e indolor, nomeado por sinal de Romaña, que indica inoculação local do parasito ou um nódulo cutâneo, popularmente denominado de chagoma (HENAO-MARTÍNEZ, 2015). A grande maioria das infecções agudas não são detectadas, e nesta fase é comum a resposta imune conseguir controlar a replicação parasitária e, assim, os sintomas se resolvem espontaneamente e a parasitemia desaparece em 4 a 8 semanas (HENAO-MARTÍNEZ, 2015; LONGO; BERN, 2015).

A maioria dos pacientes permanecem assintomáticos; contudo, estima-se

que 20 a 30% das pessoas infectadas por *T. cruzi* têm progressão ao longo de anos para cardiomiopatia chagásica crônica (Figura 6B). Os primeiros sinais da cardiomiopatia chagásica são bradicardia sinusal e juncional, fibrilação atrial, bloqueios atrioventriculares e taquicardia ventricular (RASSI et al., 2009; VIOTTI et al., 2013). Eventualmente ocorre a progressão para cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva. Além disso, são comuns na cardiomiopatia chagásica avançada aneurismas do ventrículo esquerdo. Os pacientes podem ter derrames ou outros eventos tromboembólicos como resultado da formação de trombos (SABINO et al., 2013; LONGO; BERN, 2015).

Figura 6. Manifestações clínicas da doença de Chagas.



Fonte: WHO, 2014; DIAS et al., 2016.

Legenda: (A) fase aguda (sinal de Romaña) e (B) fase crônica (radiografia de cardiopatia chagásica crônica).

A doença de Chagas crônica digestiva afeta predominantemente o esôfago, cólon ou ambos. As manifestações da doença esofágica variam de transtornos de motilidade assintomáticos a megaesôfago grave, com sintomas incluindo disfagia, odinofagia, refluxo esofágico, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação. A doença de Chagas gastrintestinal é menos frequente do que a cardiomiopatia, sendo mais comum no sul da América do Sul do que no norte da América do Sul, América Central e México (PINAZO et al., 2010).

Além das duas principais formas de manifestações clínicas, estudos demonstram que existe a forma crônica indeterminada (FCI), a qual tem particular relevância, por ser a forma clínica de maior prevalência na doença de Chagas, além do evidente caráter benigno e do baixo potencial evolutivo em curto e médio prazos

(DIAS et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial da fase aguda da doença de Chagas é realizado por exame parasitológico. É o mais indicado nesta fase, sendo definido pela presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* através de esfregaço de sangue periférico corado com Giemsa e/ou por reação em cadeia de polimerase (PCR). Também se realiza a detecção de anticorpos IgM. Na fase crônica, o diagnóstico é essencialmente sorológico, considera-se anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, e deve ser realizado utilizando-se um teste com elevada sensibilidade em conjunto com outro de alta especificidade. O diagnóstico diferencial com outras doenças (por exemplo, leishmaniose visceral, doenças autoimunes, entre outras) deve ser considerado (DIAS et al., 2016; LONGO; BERN, 2015).

1.5 Mecanismos de morte celular em tripanossomatídeos

Um dos fatores de importância central para a homeostasia celular, de todos organismos multicelulares, é a morte celular. Esta desempenha um papel fundamental na morfogênese, fisiologia e defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo bem caracterizada em eucariotas superiores. A princípio, divide-se em 3 tipos principais (apoptose, autofagia e necrose) (LOCKSHIN; ZAKERI, 2001), mas a literatura demonstra constantemente novos subtipos.

A apoptose é descrita como um processo regulado de auto-morte envolvido em diversas doenças. Entre as características apoptóticas em células de mamíferos, detascam-se a clivagem proteolítica por caspases, encolhimento celular, fragmentação internucleossômica do DNA, exposição a fosfatidilserina (PS), formação de core citoplasmáticos, formação de corpos apoptóticos e perda do potencial da membrana mitocondrial com liberação de citocromo c ao citosol (SAMUILOV; OLESKIN; LAGUNOVA, 2000; GUIMARAES; LINDEN, 2004).

A morte celular autofágica envolve o sistema autofagossoma-lisossômico, no qual os autofagosomas são vesículas de membrana dupla responsáveis pelo engolfamento de componentes citoplasmáticos e após a fusão autofagossoma-lisossoma, é formado um autofagolisossoma, onde os resíduos celulares são digeridos (BURSCH, 2001; LOCKSHIN; ZAKERI, 2001). A autofagia é crucial para manter o equilíbrio metabólico e a reciclagem de estruturas celulares durante o crescimento e desenvolvimento celular e a desregulação de tal equilíbrio inicia um

caminho de morte (KLIONSKY et al., 2016).

A necrose é descrita como morte celular não-apoptótica. A interação apoptose e necrose é modulada em resposta a estímulos diferentes, sendo observada sob condições de inibição química ou genética da apoptose (ZONG; THOMPSON, 2006). As características deste tipo de morte envolvem alterações significativas nas mitocôndrias, incluindo a despolarização mitocondrial, a depleção de adenosina trifosfato (ATP), a geração de espécies reativas de oxigênio, a perda de homeostase do cálcio, a vacuolização citoplasmática e, em última instância, a degradação da membrana plasmática (DUNAI; BAUER; MIHALIK, 2011).

Referente aos tripanossomatídeos várias características apoptóticas foram relatadas nas últimas duas décadas, demonstrando o aparecimento do fenótipo apoptótico em tripanossomatídeos. Dentre as identificadas, relatam-se a perda de potencial transmembrânico mitocondrial, liberação de citocromo c, externalização de PS e condensação e fragmentação de DNA. Como em outros tripanossomatídeos patogênicos, características apoptóticas também foram identificadas em *T. brucei* em condições não fisiológicas, como incubação com fármacos, citocinas ou EROs (PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2012; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2015).

A primeira evidência autofágica morfológica foi descrita em tripanossomatídeos por microscopia eletrônica de *T. brucei* há quarenta anos (VICKERMAN; TETLEY, 1977). No *T. cruzi*, foi relatada a participação da organela reservossomo na formação de autofagolisossomos em formas epimastigotas (MENNA-BARRETO et al., 2009; DUSZENKO et al., 2011). Entretanto, atualmente, muitos estudos descreveram a formação recorrente de autofagossomas em tripanossomatídeos patogênicos tratados com diferentes classes de fármacos (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2015).

Contudo, a necrose ainda é pouco estudada em protozoários, especialmente devido à sua concepção de ser sempre o ponto final da morte celular, culminando na geração de componentes apoptóticos sem membrana. A característica necrótica mais típica é a ruptura da membrana plasmática que leva à perda da homeostase celular e consequente lise celular como resultado de um estímulo mecânico ou químico (ZONG; THOMPSON, 2006). Deste modo, independente do mecanismo de morte celular que é induzido, uma elevada percentagem de fármacos naturais ou sintéticos anti-tripanosomatídeos apresentam

um mecanismo de ação (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2015).

1.6 Tratamento farmacológico da DC

As únicas duas opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da doença de Chagas permanecem as mesmas desde que foram desenvolvidas há aproximadamente 50 anos. São dois derivados nitrados: nifurtimox, produzido em 1967, e o benzonidazol, introduzido na terapêutica em 1972 (LONGO; BERN, 2015; BERMUDEZ et al., 2016). Ambos os compostos compartilham algumas características: maior tolerância por crianças, maior eficácia na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, maior toxicidade em adultos, eficácia limitada na fase crônica e muitos efeitos adversos (BERMUDEZ et al., 2016).

O benzonidazol (BZ) ou N-benzil-2- (2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida é um derivado de 2-nitroimidazol. Recomenda-se que seja administrado por via oral durante 60 dias numa dose diária de 5 a 7 mg/kg para adultos e 10 mg/kg para crianças (WHO, 2015). A baixa solubilidade do BZ combinada a um tratamento de altas doses durante um longo período de tempo desencadeia diversas reações adversas, que incluem, hipersensibilidade (variando de erupções sensíveis à luz a dermatite exfoliativa), supressão da medula óssea (trombocitopenia, neutropenia, agranulocitose) e neuropatia periférica (VIOTTI et al., 2013; BERMUDEZ et al., 2016; SALOMÃO; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2016).

O Nifurtimox (NFX) ou 1,1-dióxido de (RS)-3-metil-N-[(1E)-(5-nitro-2-furil) metileno] tiomorfolin-4-amina deve ser administrado, segundo a OMS, nas doses de 8 - 10 mg/kg/dia, dividido em três doses para adultos; e de 15 - 20 mg/kg/dia, dividido em quatro doses para crianças durante 60 - 90 dias (WHO, 2015). Seus efeitos adversos predominantes são alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor abdominal), mas 30% dos pacientes também podem sofrer perturbações do sistema nervoso central, como polineurite, confusão ou convulsões locais ou generalizadas e até psicose, quando o tratamento é interrompido. Alguns pacientes, também podem desenvolver erupções cutâneas (VIOTTI et al., 2013; BERMUDEZ et al., 2016; SALOMÃO; MENNA-BARRETO; CASTRO, 2016).

O NFX, primeiro a ser indicado para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas, mostrou maior toxicidade e efeitos adversos do que o BZ, assim o tratamento com NFX pode representar um risco maior, principalmente, referente a

insuficiência cardíaca (BERMUDEZ et al., 2016). Deste modo, o NFX por ser considerado muito tóxico teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil. Contudo tem sido o pilar da terapia para a doença de Chagas nos Estados Unidos (CANÇADO, 2002; BERMUDEZ et al., 2016). O benzonidazol é o fármaco indicado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da doença de Chagas na maioria dos países endêmicos, inclusive no Brasil (CANÇADO, 2002; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Embora estes fármacos possam atingir uma taxa de cura de 76% nos casos agudos da doença de Chagas, sua eficiência é menor nas infecções crônicas, onde a porcentagem de cura é de cerca de 8% (CANÇADO, 2002). A baixa eficiência está associada principalmente à existência de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA et al., 1998; TOLEDO et al., 2004; WILKINSON et al., 2008; FRANCO et al., 2015), o que enfatiza a importância de selecionar novos medicamentos e / ou alvos para o tratamento da doença de Chagas.

1.7 Ácido betulínico e ácido oleanólico

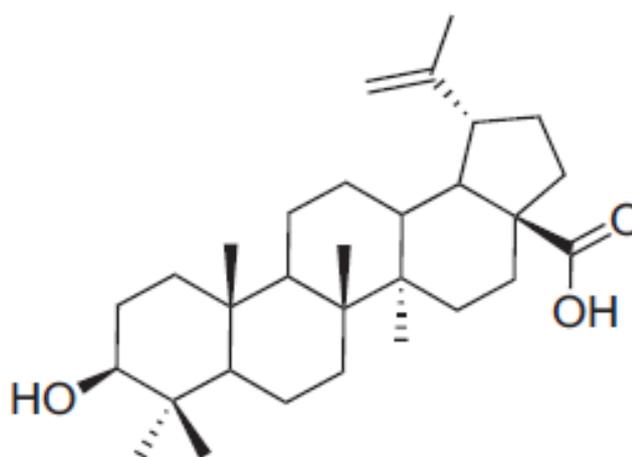
O uso de espécies vegetais para a cura de doenças retoma ao início da civilização e, em várias culturas, produtos botânicos eram empregados para essa finalidade. As plantas medicinais, como recurso terapêutico, despertam o interesse para as investigações no intuito de desenvolver fitoterápicos (HALBERSTEIN, 2005). Vários produtos naturais de diferentes classes estruturais têm se mostrado ativos contra o *T. cruzi* e o rastreamento de extrato vegetal é uma estratégia válida que está sendo explorada atualmente para a descoberta de produtos tripanocidas naturais (NIBRET; WINK, 2011; BORGES et al., 2012). Afim de melhorar a potência de semi-sintéticos ou sintéticos de produtos naturais, vários estudos continuam a desempenhar um papel importante na descoberta e desenvolvimento de fármacos para aplicações biológicas/medicinais.

O grupo terpeno compreende mais de 30.000 compostos conhecidos, sendo apenas 4000 classificados como substâncias triterpenoides cíclicas. Estes incluem o triterpenoides livres, saponinas e fitoesteróis. Cada um destes compostos possui seis unidades de isopreno diferentes e podem ser isolados a partir de várias fontes (ALI-SEYED et al., 2015). Um grande avanço durante a última década tem

sido a síntese de derivados de triterpenóides naturais, tais como, ácidos betulínico e oleanólico, objetos do nosso estudo, ambos triterpenoides ubíquos no reino vegetal, particularmente, de ervas medicinais, e que, também, são uma parte integrante da dieta humana (ZHAO et al., 2015).

Ácido betulínico (ácido 3 β -hidroxi-lup-20 (29) -en-28-óico, AB) (Figura 7), um ácido pentacíclico de tipo lupano triterpeno é amplamente distribuído no reino vegetal. Johann Tobias Lowitz foi o primeiro a isolar a forma reduzida do AB a partir de plantas em 1788 e descobriu que ele era um constituinte de destaque na casca externa de árvores de bétulas branca (BAG; DASH, 2011). Também pode ser obtido a partir de betulina (lup-20 (29) -en-3 β , 28 diol), um triterpeno isolado da mesma espécie de AB. Existem três posições reativas (isto é, grupo hidroxil secundário em C-3, um grupo hidroxil primário em C-28 e uma ligação dupla C-C em C-20) sobre a estrutura da betulina, e novos derivados podem ser produzidos através de modificações químicas dessas estruturas. Quando o grupo hidroxil C-28 é oxidado para um grupo carboxilo, a betulina pode ser rapidamente convertida em ácido betulínico, sendo este o método utilizado atualmente pela indústria (ALAKURTTI et al., 2006; BAG; DASH, 2011).

Figura 7. Estrutura química do ácido betulínico.



Ácido Betulínico

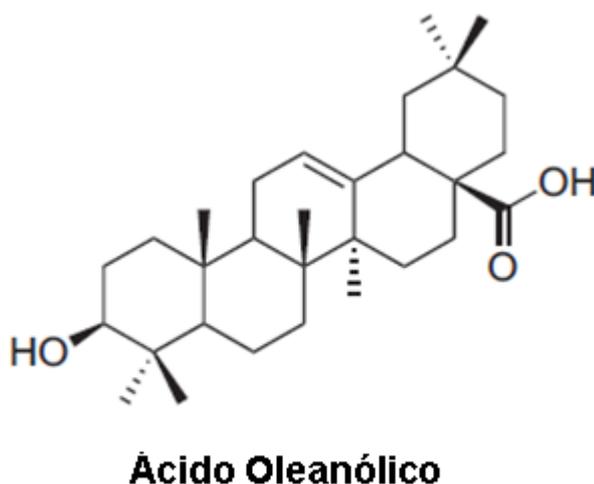
Fonte: BERO et al., 2013.

A literatura demonstra diversas propriedades biológicas que já foram avaliadas para o ácido betulínico: anti-inflamatória, antioxidante, anti-HIV (LEE; KIM;

PARK, 2015), anti-angiogênica, anti-proliferativa e citotóxica para várias células cancerosas (ALI-SEYED et al., 2016), incluindo o câncer da mama (LUO et al., 2016.), pulmão (DAS et al., 2012), próstata (REINER et al., 2013) e pele (DRĄG-ZALESIŃSKA et al., 2015). Além disso, também apresenta efeitos antiparasitários, tais como, anti-malária (INNOCENTE et al., 2012; SILVA et al., 2014); atividade leishmanicida (ALAKURTTI et al., 2010; SOUSA et al., 2014), atividade anti-esquistossomática (SPIVAK et al., 2014), atividade anti-trichomonas vaginalis (HÜBNER et al., 2016) e atividade antiprotozoária (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010).

O ácido oleanólico (2-ciano-3, 12-dioxo-oleana-1,9 (11) -dien-28-óico, AO) (Figura 8) é um triterpeno pentacíclico natural amplamente distribuído em alimentos, ervas e quase 200 tipos de plantas (WANG; JIANG, 1992; POLLIER; GOOSSENS, 2012). Popularmente o ácido oleanólico é utilizado na China como um medicamento de venda livre para transtorno hepático (LIU, 1995; POLLIER; GOOSSENS, 2012). Estudos demonstram que este apresenta diversas bioatividades, tais como, anti-tumoral (LIU 2005; TIAN et al., 2017), antioxidante (SOMOVA et al., 2003; WANG et al., 2010), antiinflamatória (SINGH et al., 1992; LEE et al., 2012; CÓRDOVA et al., 2014), hepatoprotetora (SHENG; SUN 2011), hipoglicêmica (CASTELLANO et al., 2013). Além disso, recentemente demonstrou efeitos leishmanicida (GHOSH; KAR; BERA, 2016) e antimalária (SIBIYA; MABANDLA; MUSABAYANE, 2016).

Figura 8. Estrutura química do ácido oleanólico.



Previamente, foi demonstrado que derivados do ácido betulínico inibem o crescimento de formas epimastigotas da cepa Tulahuen de *T. cruzi* (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010) e reduz a viabilidade de formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (MEIRA et al., 2016). Foi também demonstrado a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* do ácido oleanólico sobre as formas tripomastigotas da cepa Bolívia de *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2010; 2013) e sobre as formas tripomastigotas de *T. brucei* (CRETTON et al., 2015). Nesse contexto, o presente estudo apresenta os efeitos dos ácidos betulínico e oleanólico sobre todas as formas evolutivas da cepa Y de *T. cruzi* e, principalmente, o seu mecanismo de morte celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito tripanocida e mecanismo de ação dos ácidos betulínico e oleanólico em cepa Y de *Trypanosoma cruzi in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em células LLCMK2;
- Avaliar o efeito dos ácidos betulínico e oleanólico nas formas evolutivas, epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Investigar o possível mecanismo de morte celular induzido pelas substâncias em estudo nas formas epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Investigar se ocorrem alterações do potencial transmembrânico mitocondrial induzido pelas substâncias em estudo nas formas epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;
- Investigar se ocorre aumento de espécies reativas de oxigênio induzido pelas substâncias em estudo nas formas epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDR) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Universidade Federal do Ceará (UFC) com colaboração da Central Analítica - UFC para as análises em microscopia confocal.

3.1 Substâncias do estudo e preparo das soluções

O ácido betulínico (AB) e ácido oleanólico (AO) foram obtidos da Sigma-Aldrich™ (St. Louis, EUA). O benzonidazol (BZ), fármaco de referência com teor de pureza de 99,31%, foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) e utilizado como controle positivo.

Para a realização dos ensaios biológicos, o AB, AO e BZ foram diluídos em solução estéril de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% na concentração de 1600 µM (AB e AO) e 2 mg/mL (BZ). Foram realizadas diluições seriadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) estéril para produzir as concentrações de trabalho. As diluições foram realizadas para garantir concentração máxima de 0,5% de DMSO.

3.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de mamífero LLCMK2 (epiteliais de rim de *Rhesus monkey kidney*) e formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.3 Ensaio de citotoxicidade em células LLCMK2

3.3.1 Cultivo de células LLCMK2

O teste de citotoxicidade em células de mamíferos foi realizado com o objetivo de determinar as concentrações de trabalho ideais para os ensaios de atividade antiparasitária e para comparar a seletividade das substâncias testadas em

relação ao parasito e as células de mamíferos.

As células LLCMK2 foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) composto de glutamina (0,58 g/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (0,11 g/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, acrescentado de penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal (SBF). A linhagem celular foi mantida em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, sendo observada diariamente em microscópio óptico invertido, até atingirem confluência.

3.3.2 Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em células LLCMK2

A citotoxicidade em células LLCMK2 foi determinada através do teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT), ensaio utilizado na quantificação da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

O teste baseia-se na reação colorimétrica de conversão do MTT em sal de formazan. O MTT, sal de cor amarelada, é internalizado nas células viáveis e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Esses cristais são solubilizados por um agente surfactante adicionado em seguida, e os produtos finais são analisados por espectrofotometria a 570 nm. A intensidade da cor violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.

Para a realização desses ensaios, as células LLCMK2 foram centrifugadas e quantificadas em câmara de Neubauer. Em seguida, foram subcultivadas na concentração 1×10^5 células/mL em meio DMEM completo em placas de 96 poços e incubadas a 5% de CO₂ e 37°C por 24h para a adesão e proliferação celular na superfície da placa. Posteriormente, as células foram tratadas com AB e AO nas concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 µM e incubadas, sob as mesmas condições, por 24h. Como controle negativo as células foram tratadas com PBS e controle positivo com BZ. Em seguida, 100 µL do meio da cultura foram retirados, 10 µL de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram acrescentados e, 4h depois, foram adicionados 90 µL do agente surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17h de

incubação foi realizada a leitura em leitor de placa (Asys Expert Plus®) a 570nm.

Com os resultados obtidos, foi determinado a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI_{50}) estimada por regressão não-linear e o percentual de parasitos viáveis calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{Absorbância do tratado} / \text{Absorbância do controle PBS}) \times 100$$

3.4 Ensaios com formas epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

3.4.1 Cultivo das formas epimastigotas

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Liver infusion tryptose), de acordo com Camargo (1964). O meio LIT é composto de cloreto de sódio (4 g/L), cloreto de potássio (0,4 g/L), fosfato de sódio anidro (8 g/L), triptose (5 g/L), infusão de fígado (5 g/L), glicose (4 g/L), hemina (25 mg/L), suplementado com 10% SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em garrafas plásticas estéreis e mantidas em incubadora a 28°C.

3.4.2 Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas epimastigotas

A citotoxicidade das substâncias em estudo nas formas epimastigotas foram realizadas por meio do método de contagem em câmara de Neubauer (LIMA et al., 2016).

A cultura de epimastigotas foi quantificada no sétimo dia após repique, período em que atinge a fase log de crescimento, e uma suspensão foi subcultivada em placa de 96 poços na concentração final de 10^6 parasitos/mL. Em seguida, a cultura foi tratada com AB e AO nas concentrações 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 µM, PBS (controle negativo), BZ (controle positivo) e mantidas por 24, 48 e 72 horas em incubadora a 28°C. A viabilidade celular, o crescimento e as alterações morfológicas da cultura, foram quantificados em câmara de Neubauer por microscopia óptica. Os parasitos foram considerados viáveis por observação de motilidade e manutenção de forma característica.

Com o resultado obtido, foi determinado a densidade parasitária (DP), utilizando a fórmula abaixo, e estimada a CI_{50} .

$$DP \text{ (n}^{\circ} \text{ parasitos/mL)} = \text{contagem} \times 5 \times FC \times FD$$

FC é o fator da correção da câmara de Neubauer (10^4) e FD o fator de diluição utilizado para a contagem. A partir desses resultados foram calculadas percentual de parasitos viáveis para cada concentração testada, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (DP / \text{Média do controle PBS}) \times 100$$

3.5 Ensaios com formas tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

3.5.1 Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas

A cultura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi mantida por meio de infecções consecutivas de células LLCMK2 (ANDREWS; COLLI, 1982). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² na densidade 2×10^5 células/mL utilizando meio DMEM a 10% SBF em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas as células foram infectadas com suspensão de tripomastigotas na concentração de 10^7 parasitos/mL e mantidas no meio DMEM a 2% de SBF, trocado diariamente. Os tripomastigotas que eclodiram no 6^o dia da infecção foram utilizados nos ensaios, enquanto os coletados no 7^o dia foram utilizados para a infecção de novas garrafas.

3.5.2 Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas tripomastigotas

No sexto dia de infecção, o meio das garrafas infectadas foi removido e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* contendo os tripomastigotas foi ressuscitado em DMEM a 10% de SBF. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e subcultivados em placa de 96 poços na densidade de 10^6 parasitos/mL (LIMA et al., 2016). Em seguida, a

cultura foi tratada com AB e AO nas concentrações 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 μM , PBS (controle negativo), BZ (controle positivo) e mantidos por 24 horas em incubadora a 5% de CO_2 e 37°C . Para avaliar viabilidade celular os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

Com os resultados obtidos, foram determinados o percentual de parasitos viáveis para cada concentração testada e estimada a CI_{50} , como descrito previamente. Além disso, foi determinado o índice de seletividade, através da seguinte fórmula (NWAKA; HUDSON, 2006; ROMANHA et al., 2010):

$$\text{Índice de Seletividade} = \text{CI}_{50} \text{ LLCMK2} / \text{CI}_{50} \text{ Tripomastigota}$$

3.6 Ensaios com formas amastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

3.6.1 Cultivo das formas amastigotas

Para a cultura das formas amastigotas de *T. cruzi*, as células LLCMK2 foram subcultivadas em meio DMEM a 10% de SBF na densidade de 10^5 células/mL em placas estéreis de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. A placa foi incubada em atmosfera a 5% de CO_2 e 37°C por 24h para que a cultura atingisse estágio de semiconfluência. Após esse período, a cultura foi infectada com suspensão de tripomastigotas na densidade de 5×10^6 parasitos/mL em meio DMEM a 2% de SBF e incubada por 48h sob as mesmas condições.

3.6.2 Determinação da citotoxicidade dos ácidos betulínico e oleanólico em formas amastigotas

Passado o período de infecção, as células LLCMK2 infectadas foram lavados com PBS para remover os parasitos não interiorizados e, em seguida, tratadas com a CI_{50} de AB (25,94 μM) e AO (13,97 μM) obtidas no experimento com as formas tripomastigotas tratados por 24h. Como controle negativo as células foram tratadas com PBS e controle positivo foram tratadas com BZ. Após 24h e 48 h de incubação, as lamínulas foram retiradas da placa, lavadas com PBS, fixadas com solução de Bouin e coradas com Giemsa (LIMA et al., 2016).

O número de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectadas foram determinados por contagem randômica de 300 células em microscópio óptico. Os resultados dos ensaios foram expressos em porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por células. O efeito sob amastigota foi também estimado pelo cálculo do índice de sobrevivência, definido como na fórmula abaixo:

$$\text{Índice de Sobrevivência} = \% \text{ cels. infectadas} \times (\text{n}^\circ \text{ de amastigotas} / \text{cels. infectadas})$$

3.7 Avaliação do efeito dos ácidos betulínico e oleanólico em diferentes tipos de morte celular

A avaliação do tipo de morte celular em formas epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* foi realizada pela investigação de alterações celulares indicativos de morte por necrose, apoptose ou autofagia; e pela análise da alteração do potencial da membrana mitocondrial, aumento das espécies reativas de oxigênio e detecção de compartimentos acídicos e autofágicos por citometria de fluxo e microscopia confocal.

3.7.1 Avaliação de apoptose e/ou necrose

Amino actinomicina D (7-AAD) e anexina V- ficoeritrina (Anexina V-PE) são sondas fluorescentes específicas para marcação de alterações de membrana plasmática, afim de diferenciar a morte parasitária em apoptose ou necrose. A anexina V-PE liga-se fortemente a fosfatidilserina, um fosfolipídio interno da membrana plasmática, que é externalizado no estágio inicial da apoptose, sendo utilizado como marcador desse tipo de morte celular. O 7-AAD liga-se a cadeias de DNA celular, mas é impermeável à membrana celular íntegra, assim é um sinalizador importante da perda de integridade da membrana caracterizando morte celular por necrose (WLODKOWIC et al., 2011).

As formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com CI_{50} de AB (73,43 μ M), AO (11,66 μ M) e PBS (controle) por 24h em placas de 24 poços. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 5

minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com PBS e outras duas vezes com tampão de ligação (0,01 M hepes/NaOH, pH 7,4, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂), sendo finalmente ressuspensionado com 100 µL do mesmo com 5 µL 7-AAD e Anexina V- PE (10 µg/mL) e incubados por 15 minutos ao abrigo da luz (BD Pharmingen™, usando um kit comercial – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I). Após esse período, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação para a análise no citômetro (FACSCalibur®, BD Pharmigen) utilizando, no mínimo 10⁴ células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA). O percentual de células marcadas com cada fluorocromo ou não marcadas foi obtido para análise estatística (DELAVARI et al., 2014; KESSLER et al., 2013).

3.7.2 Avaliação de autofagia

3.7.2.1 Laranja de acridina

Laranja de acridina é um corante de compartimentos ácidos, assim, está entre os métodos mais antigos para a indicar morte celular por autofagia (KLIONSKY et al., 2016). Nas células coradas com laranja de acridina, o citoplasma e o núcleo fluorescem verde-claro e vermelho escuro, respectivamente, enquanto que os compartimentos ácidos fluorescem em vermelho vivo. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez e/ou ao volume do compartimento ácido celular (PAGLIN et al., 2001).

As formas epimastigotas (1 x 10⁶ parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com CI₅₀ de AB (73,43 µM), AO (11,66 µM) e PBS (controle) por 24h em placas de 24 poços. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com PBS, ressuspensionado em 500 µL do mesmo com 2,5 µL de laranja de acridina (10 µg/mL) e incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas duas vezes, resuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) utilizando, no mínimo 10⁴ células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA). Ademais, os parasitos também foram analisados por microscopia de laser confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha). A intensidade de fluorescência foi determinada pela média geométrica e para comparação, foi realizada uma relação entre a intensidade de fluorescência dos

teste em relação ao controle.

3.7.2.2 *Monodansilcadaverina (MDC)*

MDC é um composto fluorescente seletivo para vacúolos autofágicos. É utilizado para monitorar a autofagia, já que este, se acumula, preferencialmente, em vacúolos autofágicos devido a uma combinação de aprisionamento de íons e interações específicas com os lipídios da membrana (MUNAFÓ; COLOMBO, 2001; KLIONSKY et al., 2016).

As formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com CI_{50} de AO (11,66 μ M) e PBS (controle) por 24h em placas de 24 poços. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com PBS, ressuspensos com 100 μ L da MDC (100 μ M) por 1 hora. Em seguida, os parasitos foram lavados com PBS e fixados em 4% de paraformaldeído por 40 minutos. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 20 μ L e colocado sobre lâminas para adesão dos parasitos. As lâminas foram analisadas por microscopia de laser confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha) (MENNA-BARRETO et al., 2009).

3.7.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O fluorocromo Rodamina 123 (Rho123) é um corante catiônico que se acumula no espaço intermembranar de mitocôndrias viáveis, emitindo fluorescência vermelha. Lesão mitocondrial provoca a redução do acúmulo desse corante, que passa para o citoplasma, onde emite fluorescência verde (BARACCA et al., 2003)

As formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com CI_{50} de AB (73,43 μ M), AO (11,66 μ M) e PBS (controle) por 24h em placas de 24 poços. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com PBS, ressuspensos em 100 μ L do mesmo com 5 μ L de Rho 123 (10 μ g/mL) (Sigma®) e incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, os parasitos foram lavados duas vezes, resuspensos em PBS e analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmingen) utilizando, no mínimo 10^4 células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA). Ademais, os parasitos

também foram analisados por microscopia de laser confocal LSM 710 (Zeiss, Alemanha). A intensidade de fluorescência foi determinada pela média geométrica e para comparação, foi realizada uma relação entre a intensidade de fluorescência dos grupos teste em relação ao grupo controle negativo através da redução da emissão de fluorescência vermelha.

3.7.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O 2',7'-diclorodihidrofluoresceína 39 (H2DCFDA) avalia a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de outros peróxidos, tais como, peróxidos lipídicos, o qual é oxidado ao composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) sendo utilizado como marcador para o estresse oxidativo da célula (CATHCART; SCHWIERS; AMES 1983).

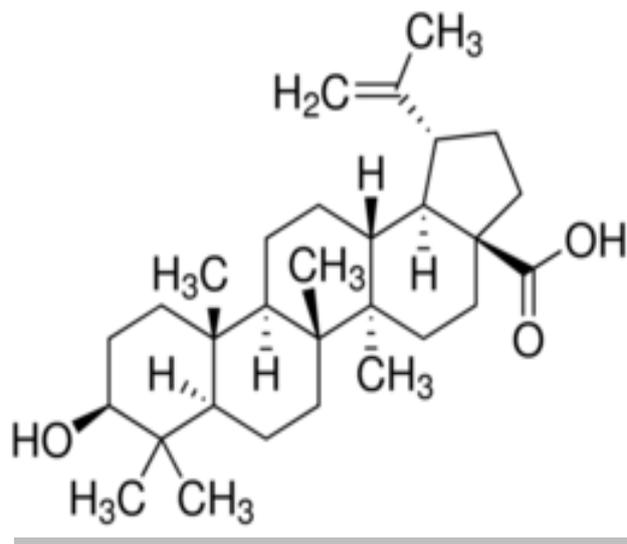
As formas epimastigotas (1 x 10⁶ parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com CI₅₀ de AB (73,43 µM), AO (11,66 µM) e PBS (controle) em placa de 24 poços. Após 3 horas de incubação, adicionou-se 10 µL de H2DCFDA (2 mM) e a placa foi mantida ao abrigo da luz até o fim do período de tratamento (24 horas). Por fim, as células foram lavadas duas vezes, resuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) utilizando, no mínimo 10⁴ células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA). A intensidade de fluorescência foi determinada pela média geométrica e para comparação, foi realizada uma relação entre a intensidade de fluorescência dos grupos teste em relação ao grupo controle negativo através da redução da emissão de fluorescência.

3.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. e, para comparação de dados, foram utilizados ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou teste t Student, considerando p<0,05 como critério de significância. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism versão 5.0 e o Microsoft Excel 2010.

PARTE 1

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO BETULÍNICO EM
CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

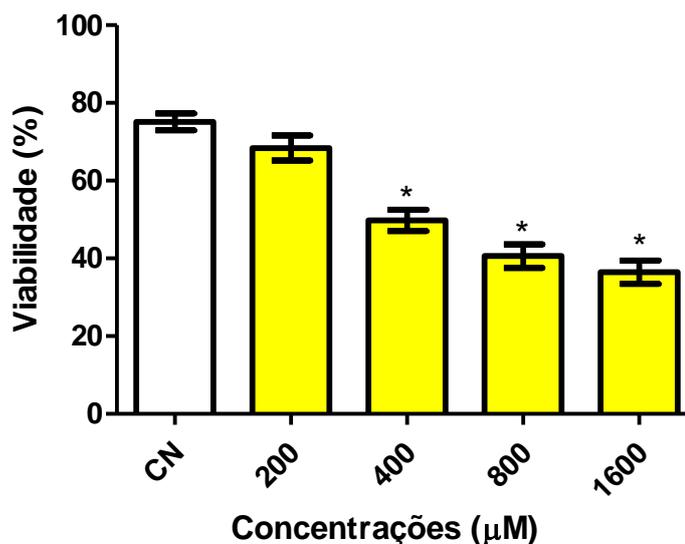


4 RESULTADOS

4.1 Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico sobre a viabilidade de células LLCMK2

O AB, incubado por 24 h nas concentrações 1,56 a 1600 μM , causou uma redução na viabilidade das células LLCMK2, a partir da concentração de 400 μM (Figura 9). Deste modo, este resultado incentivou a continuidade do trabalho, possibilitando a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios tripanocidas de formas intracelulares seguintes.

Figura 9 - Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de células LLCMK2 após 24h de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

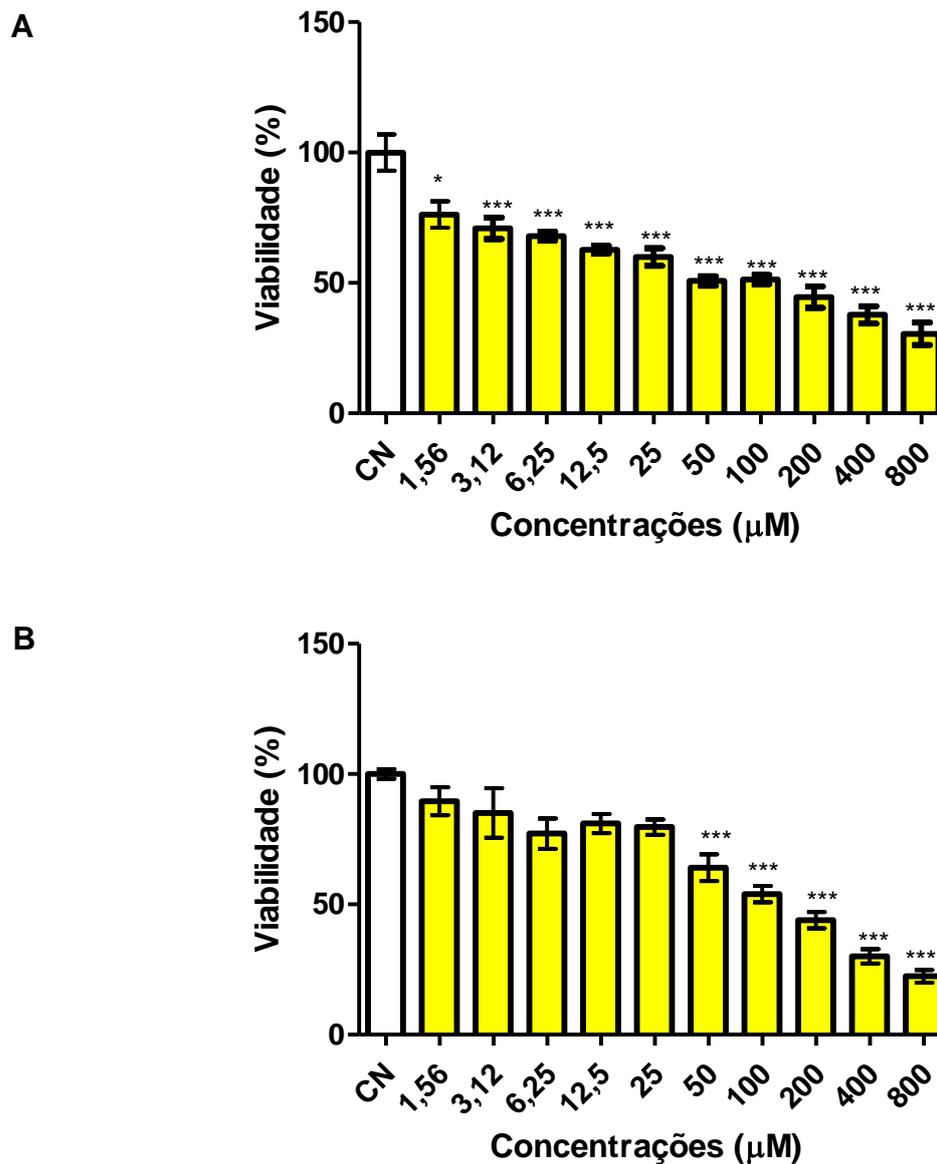
Legenda: AB diminuiu a viabilidade das células LLCMK2 nas concentrações de 400, 800 e 1600 μM . (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

4.2 Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

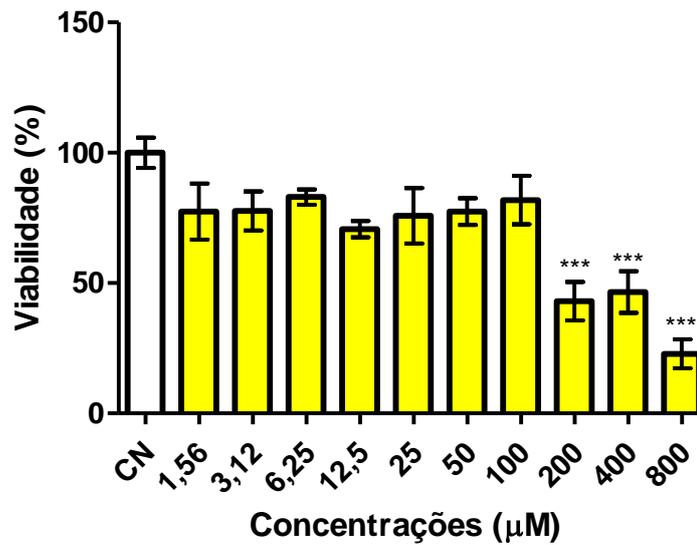
O AB apresenta efeito tripanocida em formas epimastigotas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados demonstram que no tempo de 24 horas o AB

foi dose-dependente por inibir todas as concentrações avaliadas (1,56 a 800 μM). Entretanto, o efeito tripanocida nos tempos de 48 e 72 horas só ocorreu nas maiores concentrações (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento.



C



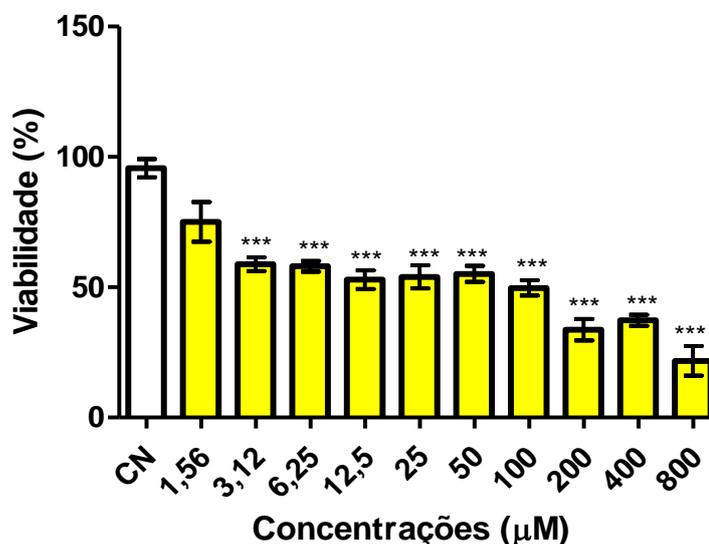
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: AB inibiu a viabilidade das formas epimastigotas de *T.cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de tratamento. (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

4.3 Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O AB inibiu a viabilidade das formas tripomastigotas após 24 horas de incubação. Os resultados demonstraram que o AB apresentou efeito a partir da concentração de 3,12 µM de maneira dose-dependente (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do ácido betulínico sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: AB diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

4.4 Relação do efeito citotóxico do ácido betulínico sobre formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e células LLCMK2

Os resultados de citotoxicidade do AB sobre as células LLCMK2 demonstraram que a concentração capaz de inibir 50% da cultura (CI_{50}) foi de 391,8 μ M, enquanto a CI_{50} do BZ foi 615 μ M. O benzonidazol é mais citotóxico que o AB nas células LLCMK2. O resultado do efeito tripanocida do AB sobre as formas epimastigotas apresentou que a CI_{50} foi de 73,43 μ M em 24 h, de 119,8 μ M em 48 h e de 212,2 μ M em 72h de tratamento; para formas tripomastigotas apresentou $CI_{50\%}$ foi de 51,88 μ M. Enquanto a CI_{50} do BZ foi 218 μ M em 24 h, 61 μ M em 48 h e 16,5 μ M em 72h de tratamento em formas epimastigotas e 257 μ M em formas tripomastigotas (Tabela 1).

Utilizando os valores de CI_{50} do AB e BZ em células LLCMK2 e tripomastigotas, foram calculados os índices de seletividade, que representa a seletividade de cada uma das substâncias ao parasito em relação à célula hospedeira. O índice para AB foi 7,5 e para BZ 2,3, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1

Atividade antiparasitária do ácido betulínico sobre formas evolutivas de *T. cruzi* e citotoxicidade de células hospedeiras.

	Epimastigota (<i>T. cruzi</i>)		Tripomastigota (<i>T. cruzi</i>)		LLCMK2 ^a		IS	
	AB Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AB Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AB Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AB	BZ
24 h	73,43*±0,09	218 ±55	51,88*±0,14	257±20	391,8*±0,05	616±51	7,5	2,3
48 h	119,8*±0,06	61 ±10	-	-	-	-	-	-
72 h	212,2*±0,13	16,5 ±3	-	-	-	-	-	-

Fonte: elaborada pelo autor.

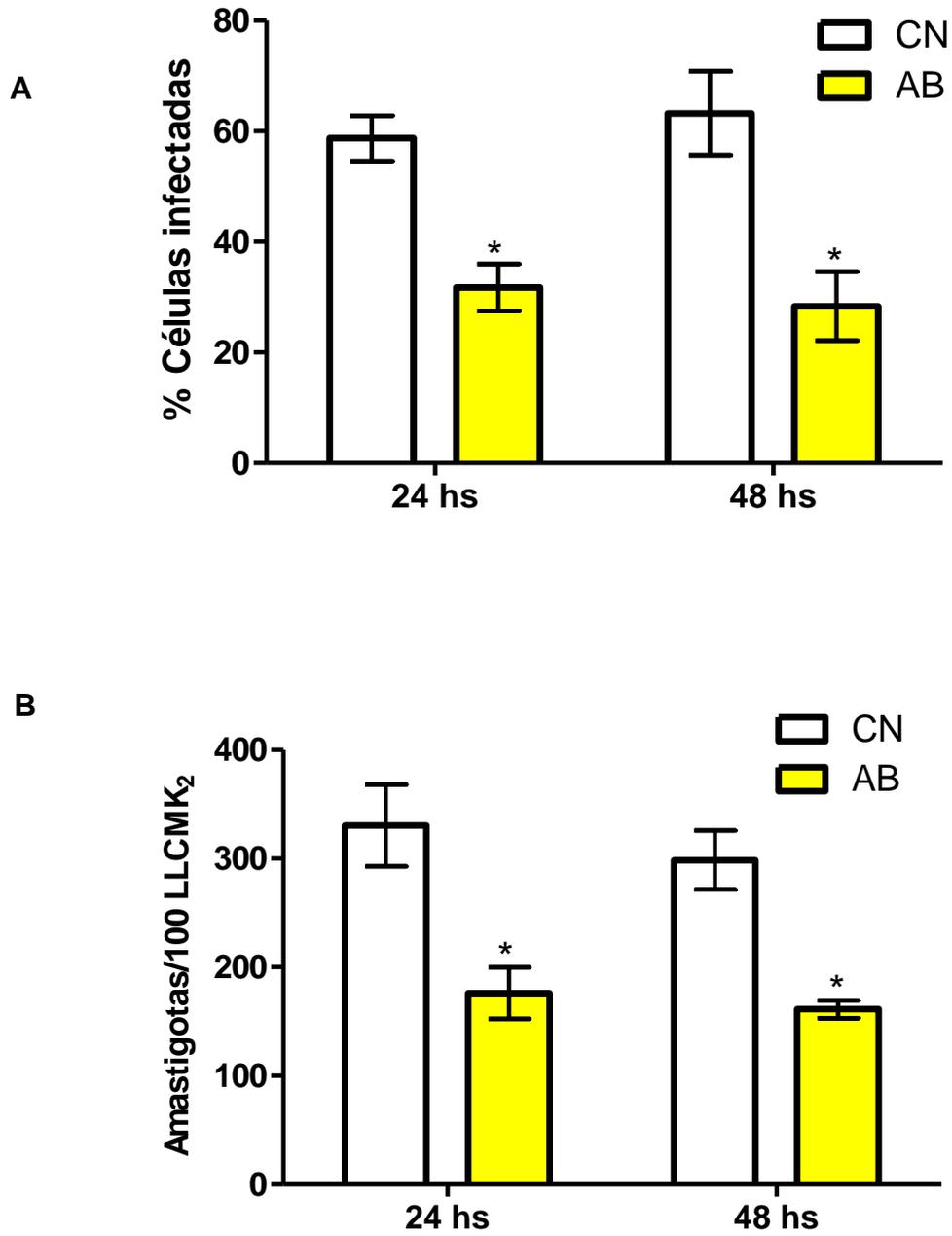
Legenda: AB = ácido betulínico. BZ = benzonidazol. Cl₅₀ = concentração inibitória a 50%. IS = Índice seletividade. DP = Desvio padrão. Os valores são médias ± E.P.M. de três experiências independentes realizadas em triplicata. * Significativamente diferente do controle (ANOVA e pós-teste de Bonferroni, * p <0,05).

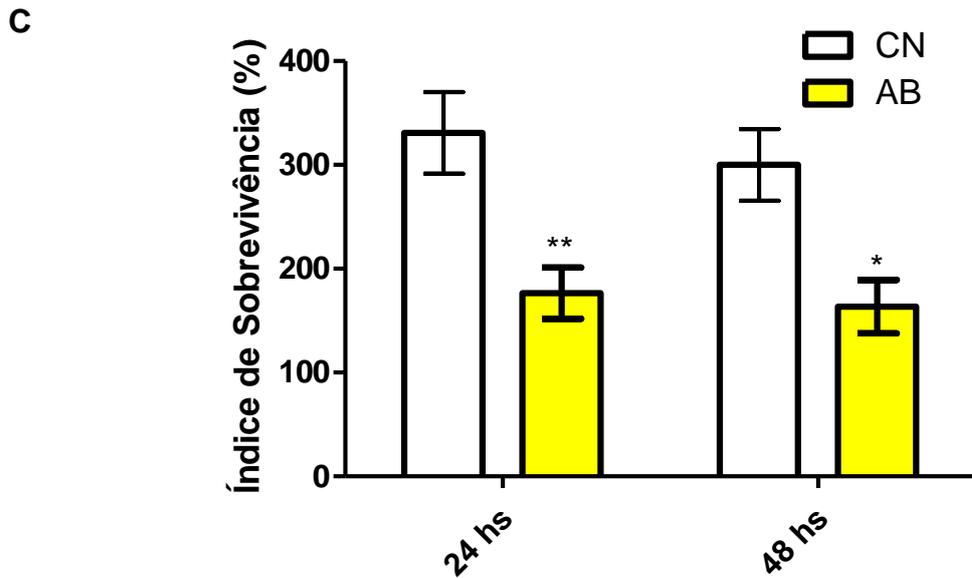
^a viabilidade celular de LLCMK2 determinada 24 h após o tratamento.

4.5 Determinação do efeito citotóxico do ácido betulínico em formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para investigar o efeito do AB em forma intracelular de *T. cruzi* foi realizado ensaio utilizando concentrações não tóxicas para as células hospedeiras LLCMK2 e a concentração correspondente à metade da Cl₅₀ encontrada para formas tripomastigotas em 24h. Os resultados mostram que com 24 e 48 horas o tratamento com AB na concentração de 25,94 μM reduziu em 53% e 40% o percentual de células infectadas (Figura 12A) e 41% e 49% do número de amastigotas por células, respectivamente (Figura 12B). O efeito tripanocida também foi comprovado pelo índice de sobrevivência das formas amastigotas, como mostrado na figura 12 C.

Figura 12. Efeito do ácido betulínico em formas amastigotas de *T. cruzi* após 24h e 48 h de tratamento.





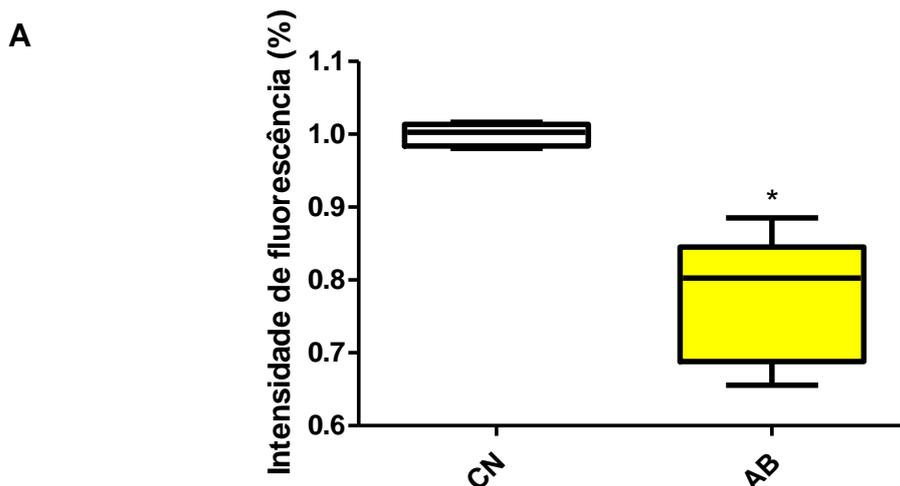
Fonte: elaborada pelo autor.

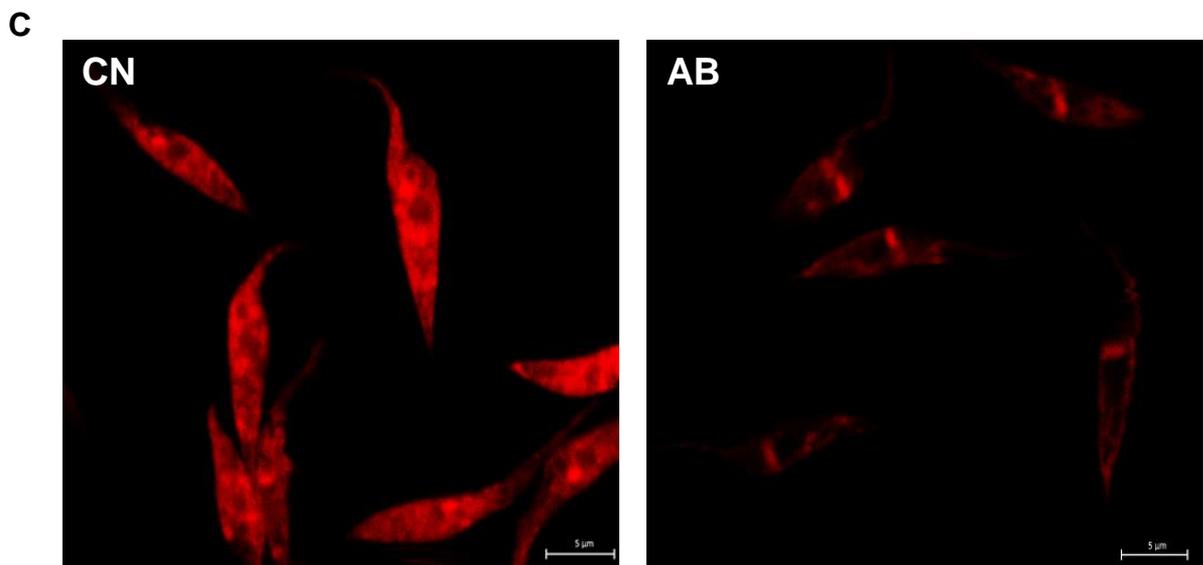
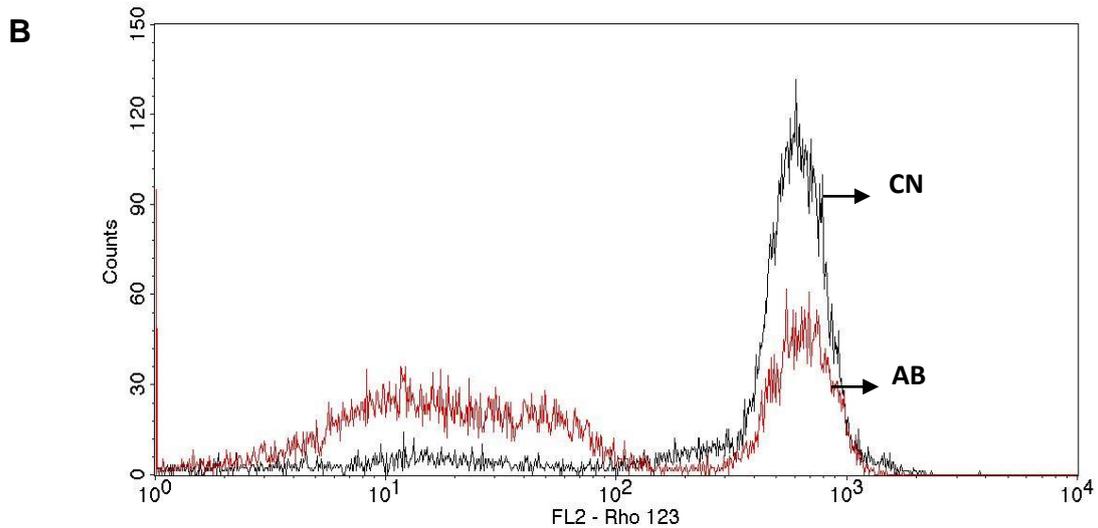
Legenda: AB diminuiu o percentual de células infectadas (A); AB reduziu o número de amastigotas por células (B); AB diminuiu o percentual de índice de sobrevivência (C). (CN = controle negativo; AB= ácido betulínico). Os dados foram expressos como percentual \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

4.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Formas epimastigotas tratadas com CI_{50} de AB ($73,43 \mu\text{M}$) após 24 horas de incubação foram marcadas com Rodamina 123 e analisadas por citometria de fluxo (Figura 13 A, B). Os resultados demonstraram redução da intensidade de fluorescência vermelha nas culturas tratadas com AB, indicando despolarização mitocondrial (Figura 13 C).

Figura 13 - Efeito ácido betulínico sobre $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.





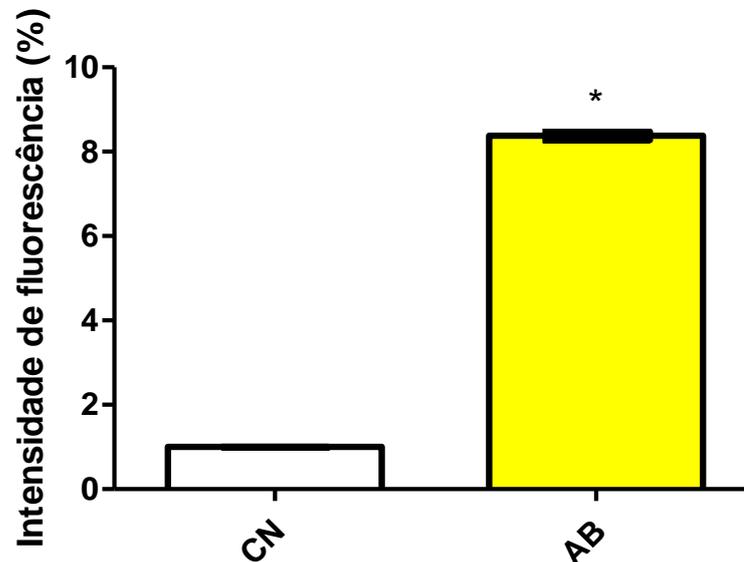
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial marcado por Rodamina 123 na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} de AB. Gráfico (A); Histograma (B); Microscopia confocal (C). (CN = controle negativo; AB = ácido betulínico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

4.7 Determinação do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio

Culturas da forma epimastigota, após 24h de tratamento com a CI_{50} de AB (73,43 μ M) foram marcadas com H2DCFDA e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados demonstram aumento no percentual de intensidade de fluorescência, indicando aumento na formação de EROs nas culturas tratadas com AB (Figura 14).

Figura 14 - Efeito ácido betulínico sobre o aumento da formação de EROs nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



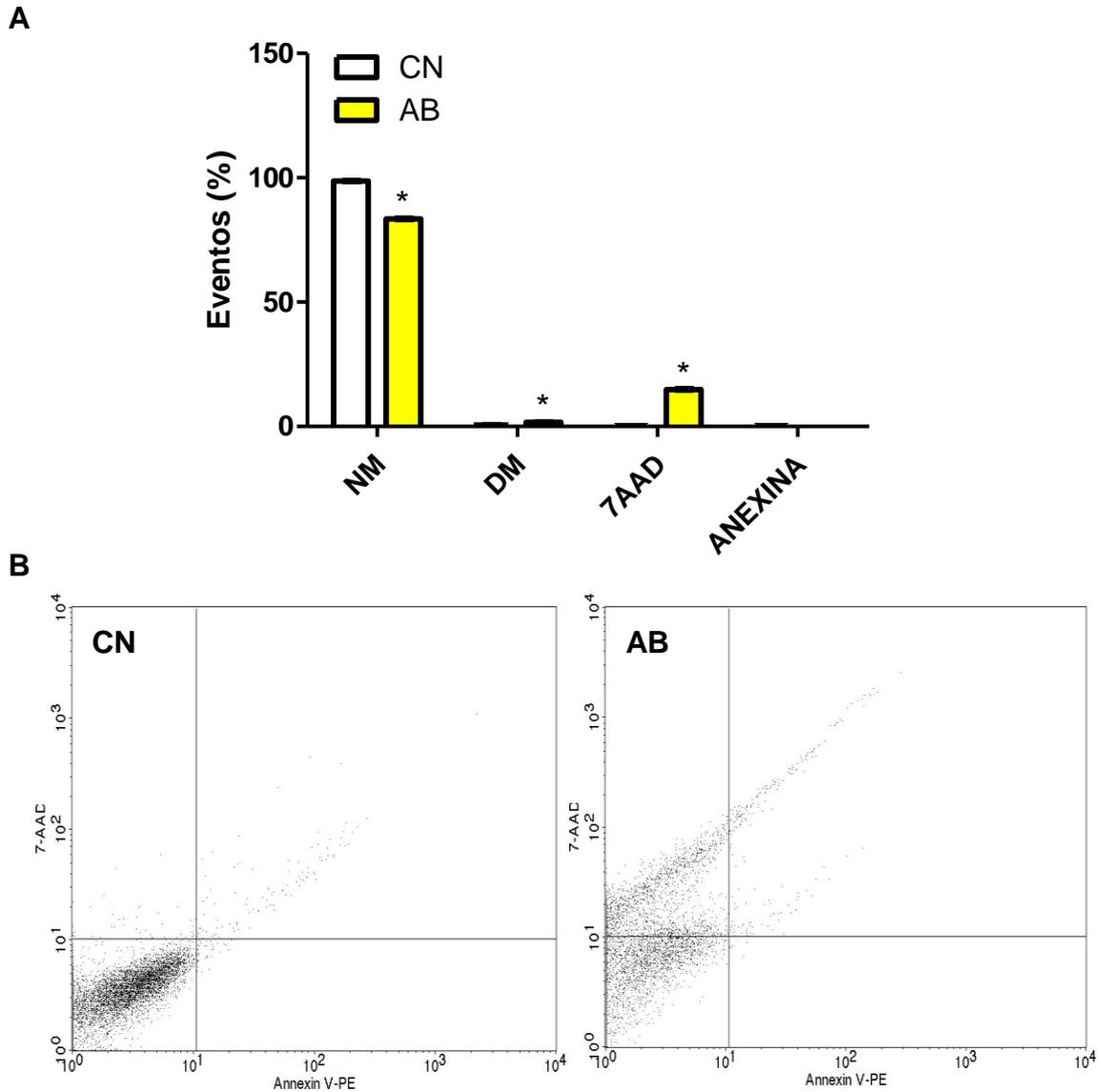
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do aumento de espécies reativas de oxigênio marcado por H2DCFDA na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} de AB. (CN = controle negativo; AB = ácido betulínico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

4.8 Determinação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose

Culturas da forma epimastigota, após 24h de tratamento com a CI_{50} de AB (73,43 μ M) foram marcadas com 7-AAD/Anexina V-PE e analisadas por citometria de fluxo. A análise revelou baixa marcação nos parasitos sem nenhum tratamento (controle) e nenhuma alteração nos parasitos marcados com Anexina V-PE, marcador de apoptose, entretanto apresentou aumento significativo de, aproximadamente, 30% na marcação com 7-AAD, marcador de necrose (Figura 15).

Figura 15 - Mecanismo de morte celular por necrose após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com ácido betulínico.



Fonte: elaborada pelo autor.

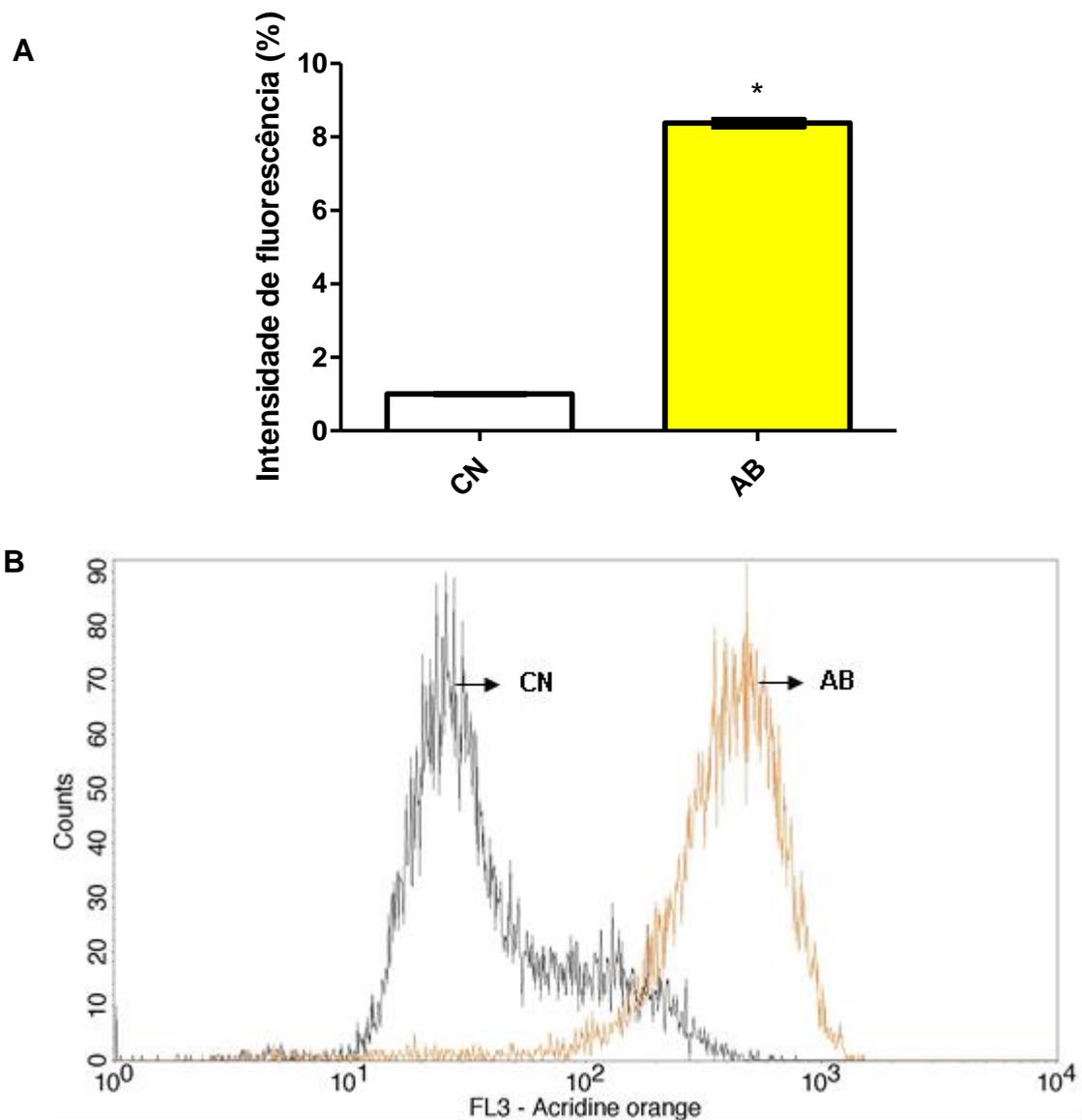
Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} do AB. Gráfico (A); Histograma (B). (NM= não marcado; 7-AAD= marcado com 7-amino actinomicina D; Anexina V-PE= marcados com anexina V- ficoeritrina; DM= marcado com 7-AAD e Anexina V-PE; CN = controle negativo; AB = ácido betulínico). Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

4.9 Determinação de morte celular por autofagia

Culturas de epimastigotas, após 24h de tratamento com a CI_{50} de AB

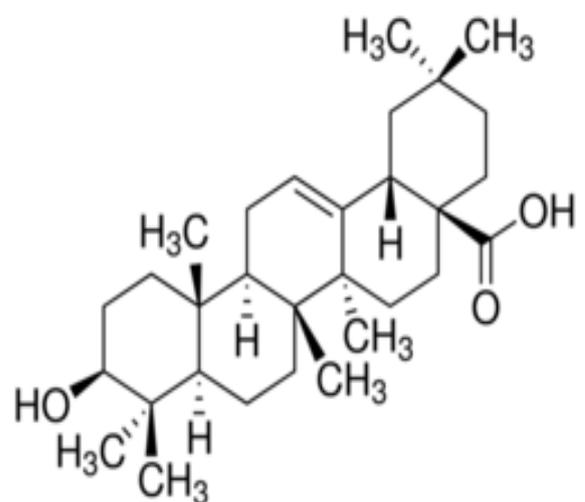
(73,43 μM) foram marcadas com laranja de acridina e analisadas por citometria de fluxo. A análise revelou aumento no percentual de intensidade de fluorescência nas culturas tratadas com AB, demonstrando a presença de compartimentos acídicos (Figura 16).

Figura 16 - Mecanismo de morte celular por autofagia após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com ácido betulínico.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular marcado por laranja de acridina na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} de AB. Gráfico (A); Histograma (B). (CN = controle negativo; AB = ácido betulínico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

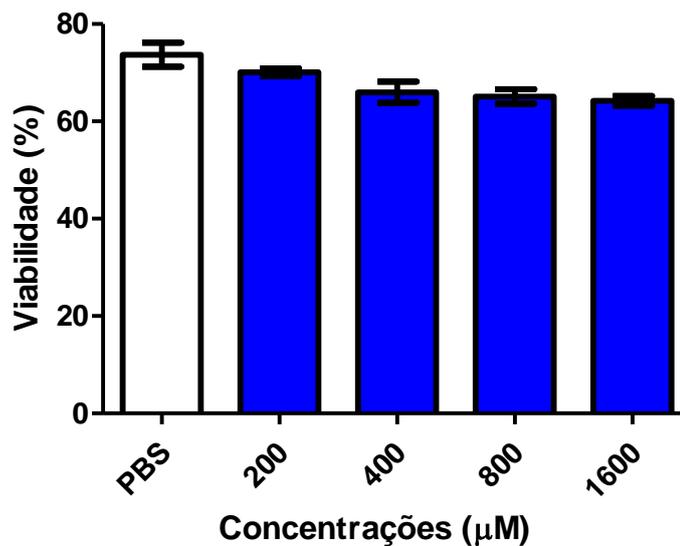
PARTE 2**ESTUDO IN VITRO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DO ÁCIDO OLEANÓLICO EM
CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi***

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico sobre a viabilidade de células LLCMK2

O AO incubado por 24 h nas concentrações 1,56 a 1600 μM não diminuiu a viabilidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 17), evidenciando que mesmo em altas concentrações não apresenta toxicidade para célula LLCMK2.

Figura 17 - Efeito do ácido oleanólico sobre a viabilidade de células LLCMK2 após 24h de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

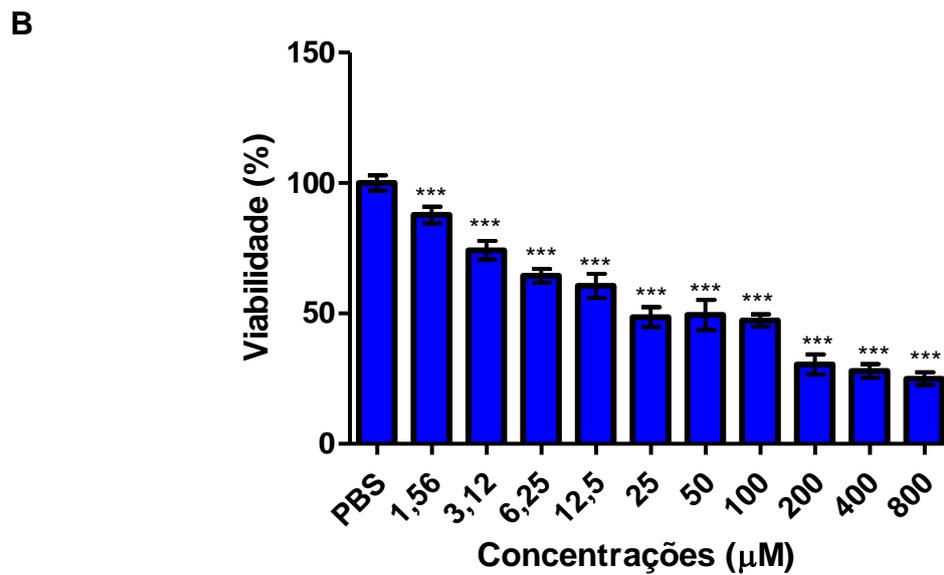
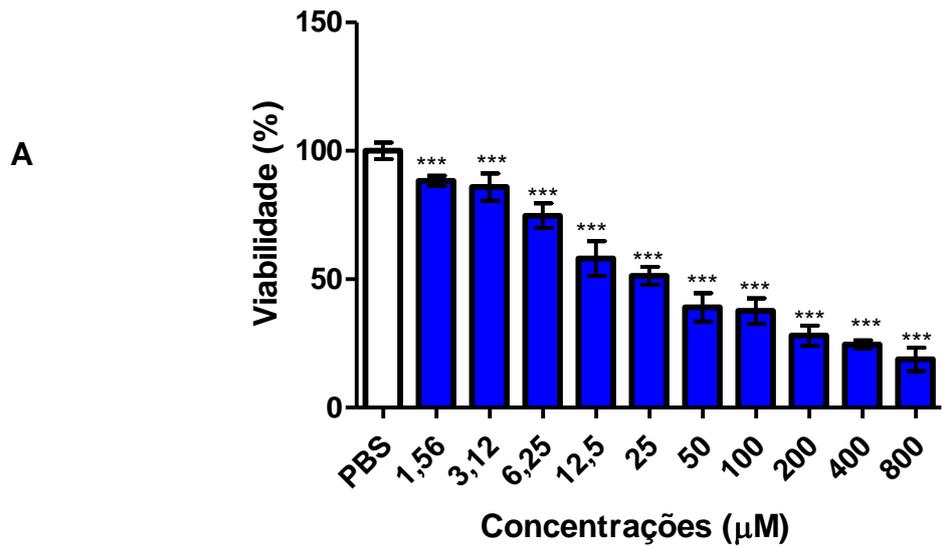
Legenda: AO não reduziu a viabilidade das células LLCMK2 nas concentrações testadas. (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

5.2 Determinação do efeito citotóxico ácido oleanólico em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

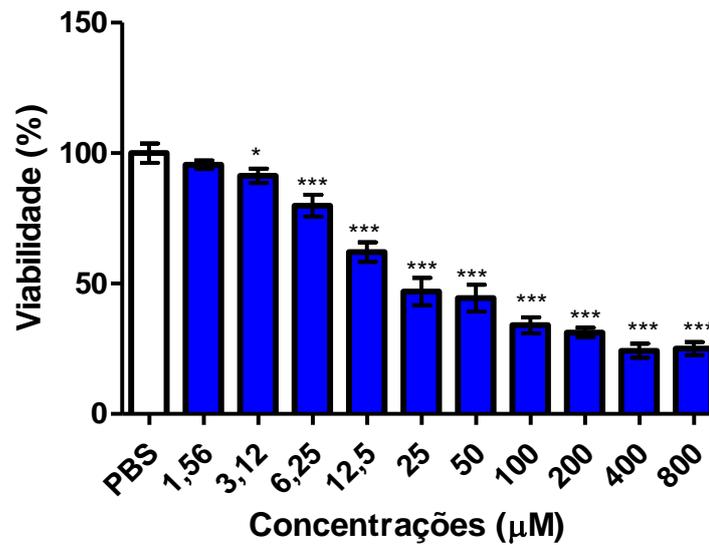
A avaliação do efeito tripanocida do AO em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de incubação demonstrou um efeito tempo e concentração dependentes. O AO reduziu o crescimento de epimastigotas nos três

tempos testados e em todas concentrações (1,56 a 800 μ M) (Figura 18).

Figura 18- Efeito ácido oleanólico sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento.



C



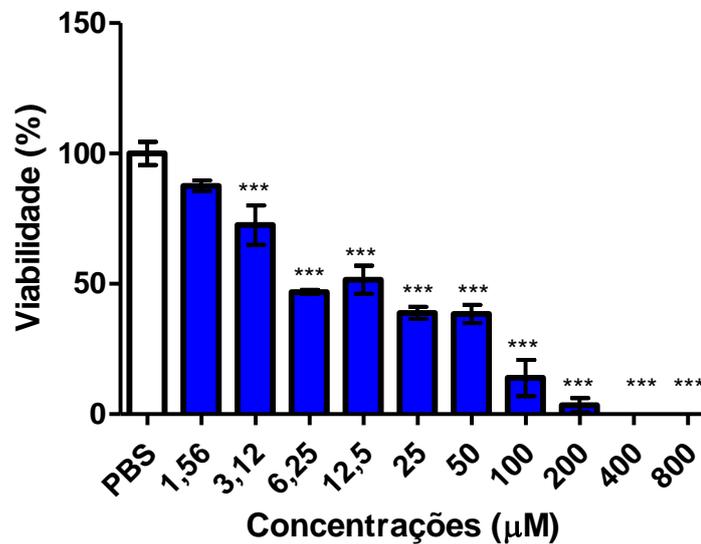
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: AO diminuiu a viabilidade das formas epimastigotas de *T.cruzi* após 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas de tratamento. (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

5.3 Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Avaliação do efeito tripanocida do AO em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de incubação demonstrou redução na viabilidade dos tripomastigotas em todas as concentrações testadas, chegando a 100 % de inibição nas concentrações de 400 e 800 µM (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do ácido oleanólico sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: AO diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 h de tratamento. (CN = controle negativo). Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

5.4 Relação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e células hospedeiras

A citotoxicidade do AO em células LLCMK2 evidenciaram que mesmo em altas concentrações (1600 μM) não houve alteração na viabilidade celular, enquanto a CI_{50} do BZ foi 616 μM . O AO em formas epimastigotas apresentou CI_{50} de 11,66 μM em 24 h, 43,15 μM em 48h e 43,05 μM em 72 horas de tratamento. Para as formas tripomastigotas, a $\text{CI}_{50\%}$ foi de 13,97 μM . Enquanto a CI_{50} do BZ foi 218 μM em 24 h, 61 μM em 48 h e 16,5 μM em 72h de tratamento em formas epimastigotas e 257 μM em formas tripomastigotas (Tabela 2).

Utilizando os valores de CI_{50} do AO e BZ em células LLCMK2 e tripomastigotas, foram calculados os índices de seletividade, como explicado anteriormente no item 4.4. No entanto, devido ao AO não ter citotoxicidade sob as células hospedeiras, assim não apresentando CI_{50} , o índice para essa substância acarreta ser superior a 114, enquanto o BZ é de 2,3, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2

Atividade antiparasitária do ácido oleanólico sobre formas evolutivas de *T. cruzi* e citotoxicidade de células hospedeiras.

	Epimastigota (<i>T. cruzi</i>)		Tripomastigota (<i>T. cruzi</i>)		LLCMK2 ^a		IS	
	AO Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AO Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AO Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	BZ Cl ₅₀ ± D.P. (μM)	AO	BZ
24 h	11,66*±0,03	218±55	13,97*±0,0	257±20	>1600	616±51	>114	2,3
48 h	43,15*±0,06	61±10	6	-	-	-	-	-
72 h	43,05*±0,05	16,5 ±3	-	-	-	-	-	-

Fonte: elaborada pelo autor.

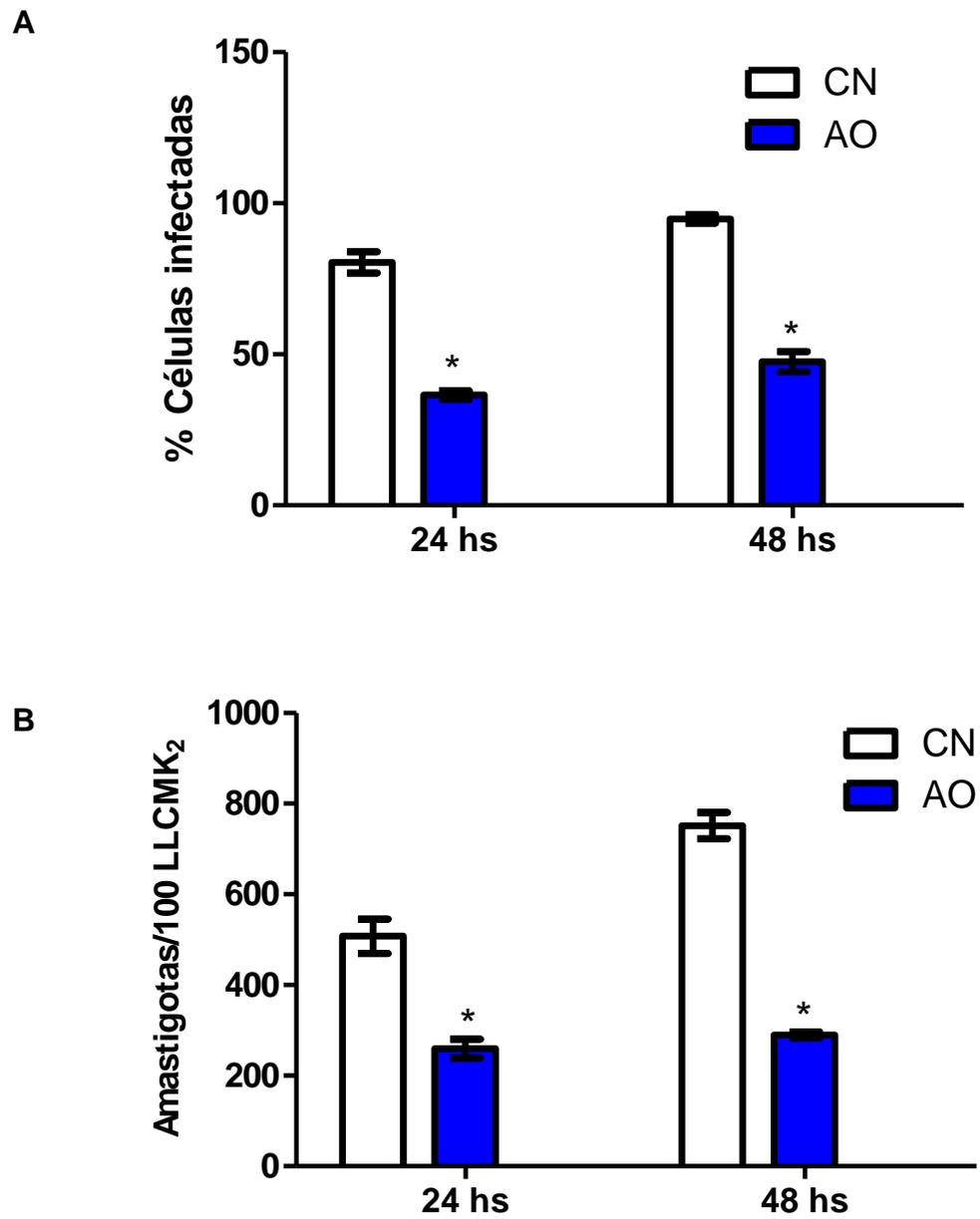
Legenda: AO = ácido oleanólico. BZ = benzonidazol. Cl₅₀ = concentração inibitória a 50%. IS = Índice seletividade. DP = Desvio padrão. Os valores são médias ± E.P.M. de três experiências independentes realizadas em triplicata. * Significativamente diferente do controle (ANOVA e pós-teste de Bonferroni, * p <0,05).

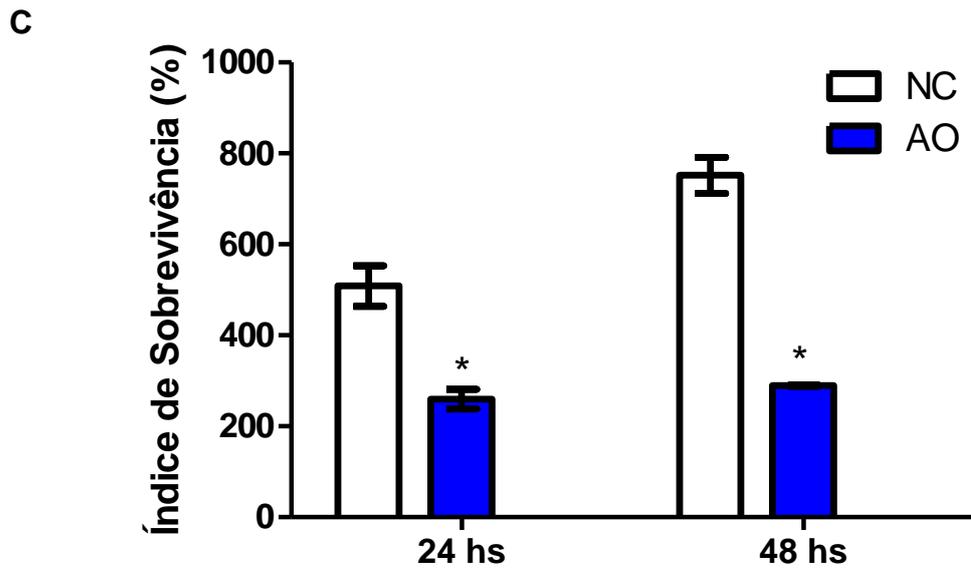
^a viabilidade celular de LLCMK2 determinada 24 h após o tratamento.

5.5 Determinação do efeito citotóxico do ácido oleanólico em formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Para investigar o efeito do AO em forma intracelular de *T. cruzi* foi realizado ensaio utilizando concentrações não tóxicas para as células LLCMK2. A concentração do AO utilizada foi de 13,97 μM, que corresponde à Cl₅₀ em formas tripomastigotas em 24h de tratamento. Os resultados demonstraram uma redução com 24 e 48 horas de 41% e 49% do percentual de células infectadas (Figura 20A) e de 47% e 38% do número de amastigotas por células (Figura 20B), respectivamente. O efeito tripanocida também foi demonstrado pelo índice de sobrevivência das formas amastigotas, como mostrado na figura 20 C.

Figura 20 - Efeito do ácido oleanólico em formas amastigotas de *T. cruzi* após 24h e 48 h de tratamento.





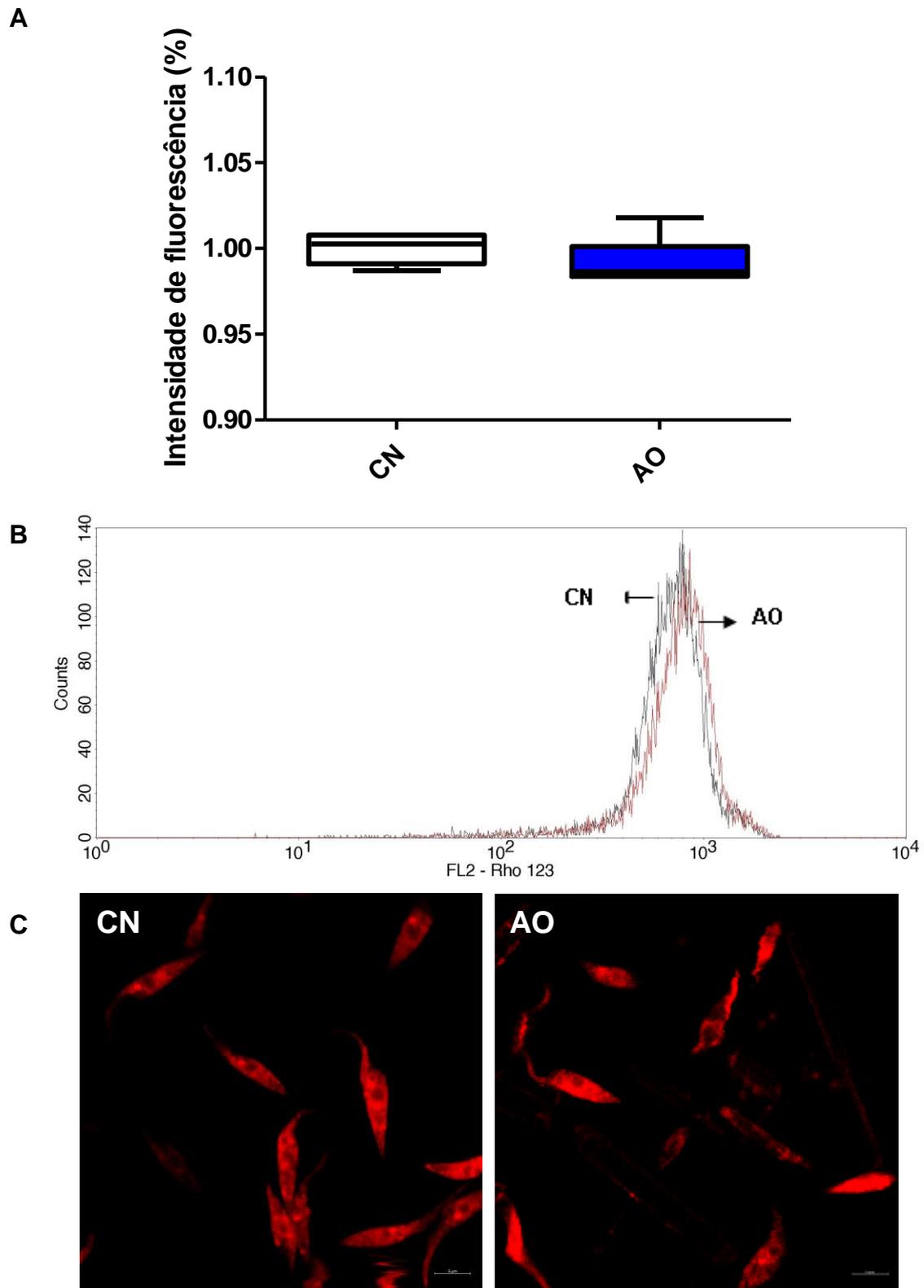
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: AO diminuiu o percentual de células infectadas (A); AO reduziu o número de amastigotas por células (B); AO diminuiu o percentual de índice de sobrevivência (C). (CN = controle negativo; AO = ácido oleanólico). Os dados foram expressos como percentual \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

5.6 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Após 24 horas de incubação com AO (11,66 μ M) as culturas de epimastigotas foram marcadas com Rodamina 123 e analisadas por citometria de fluxo (Figura 21 A, B). O resultado mostra que para os parasitos tratados com AO não houve mudança do percentual de intensidade de fluorescência (Figura 21 C).

Figura 21 - Efeito do ácido oleanólico sobre $\Delta\Psi_m$ nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

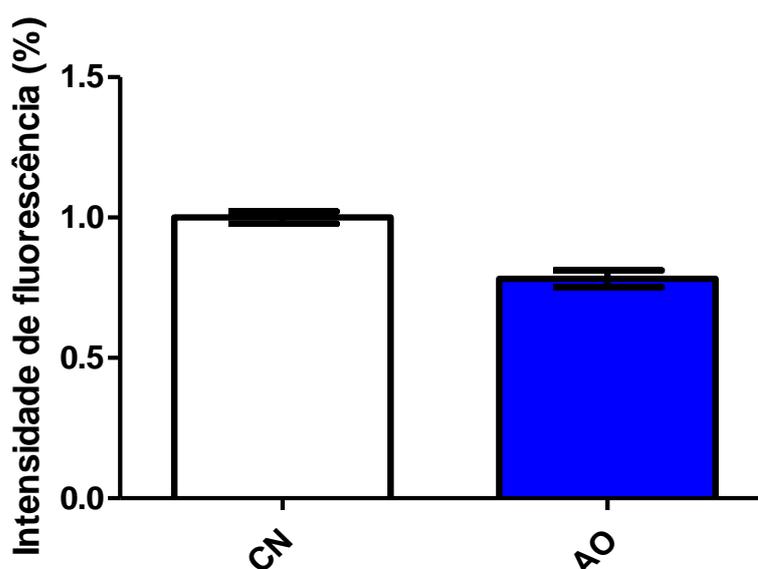
Legenda: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial marcado por Rodamina 123 na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com Cl_{50} de AO. Gráfico (A);

Histograma (B); Microscopia confocal (C). (CN = controle negativo; AO = ácido oleanólico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

5.7 Determinação do aumento da formação de espécies reativas de oxigênio

Culturas de epimastigotas, após 24h de tratamento com a CI_{50} de AO (11,66 μ M) foram marcadas com H2DCFDA e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que para os parasitos tratados com AO não houve alteração do percentual de intensidade de fluorescência (Figura 22), ou seja, não houve aumento de EROs.

Figura 22. Efeito do ácido oleanólico sobre o aumento da formação de EROs nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

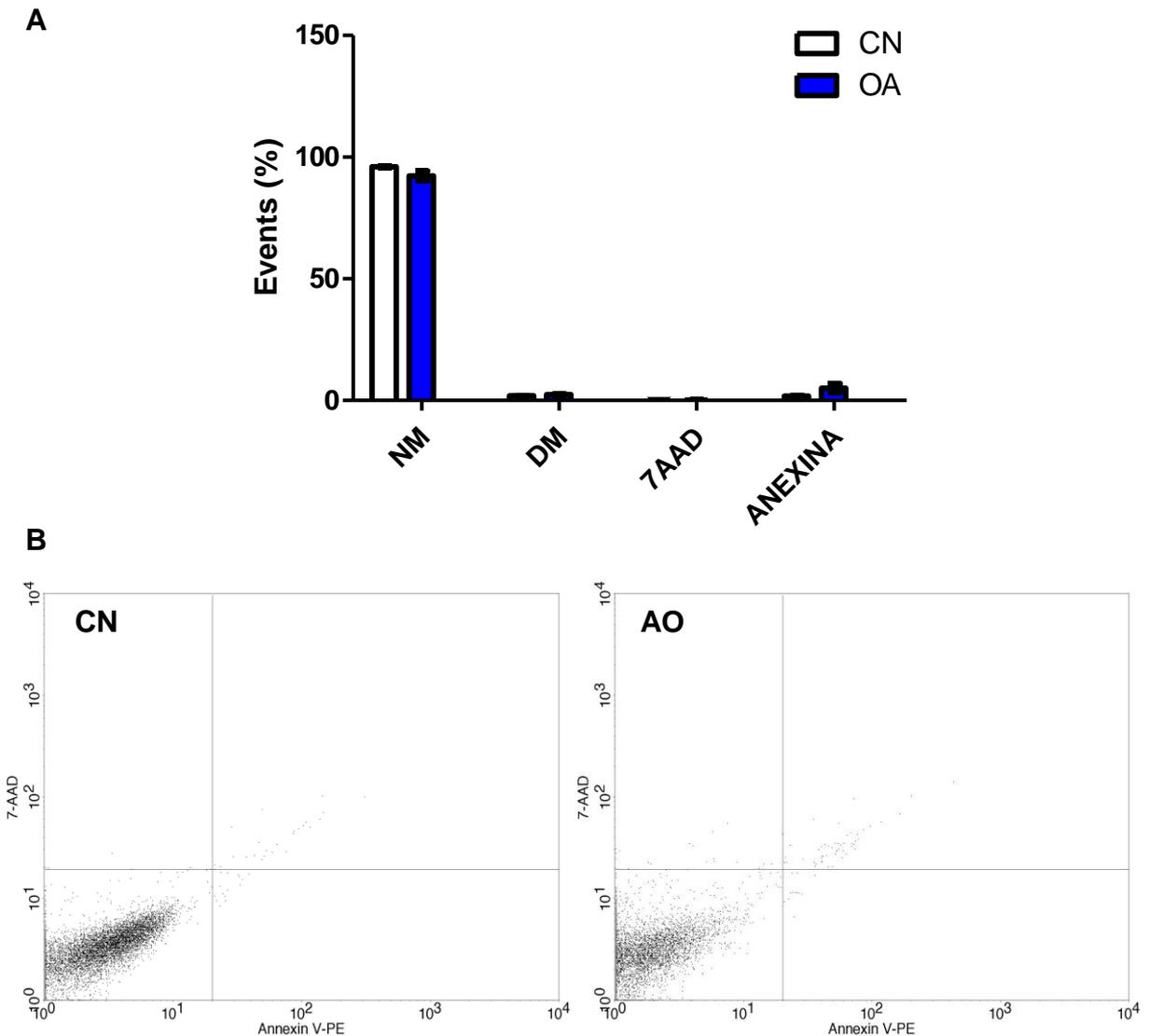
Legenda: Avaliação do aumento de espécies reativas de oxigênio marcado por H2DCFDA na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} de AO. (CN = controle negativo; AO = ácido oleanólico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

5.8 Determinação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose

Culturas de epimastigotas, após 24h de tratamento com a CI_{50} de AO (11,66 μ M) foram marcadas com 7-AAD/Anexina V-PE e analisadas por citometria de

fluxo. A análise revelou baixa marcação nos parasitos sem nenhum tratamento (controle) e nos tratados com AO não houve nenhuma alteração de eventos (Figura 23).

Figura 23 - Mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com ácido oleanólico.



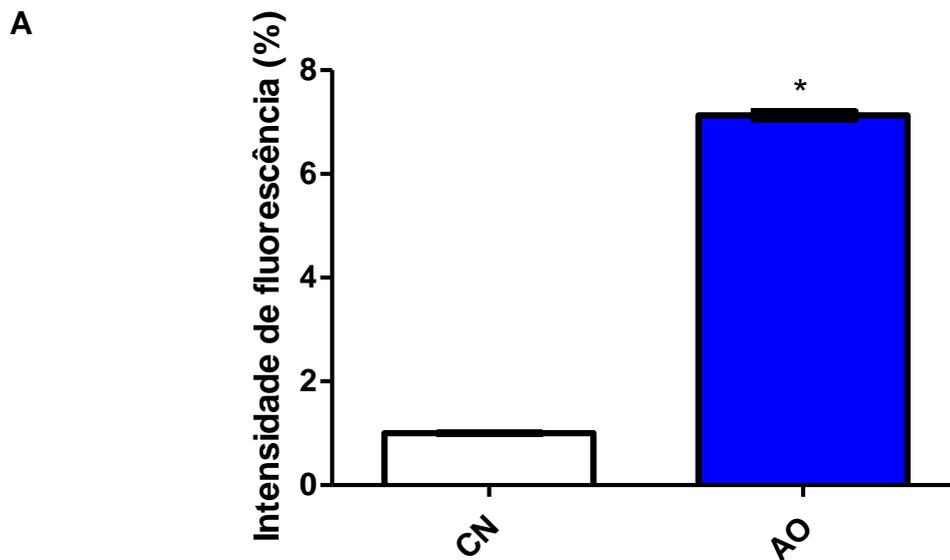
Fonte: elaborada pelo autor.

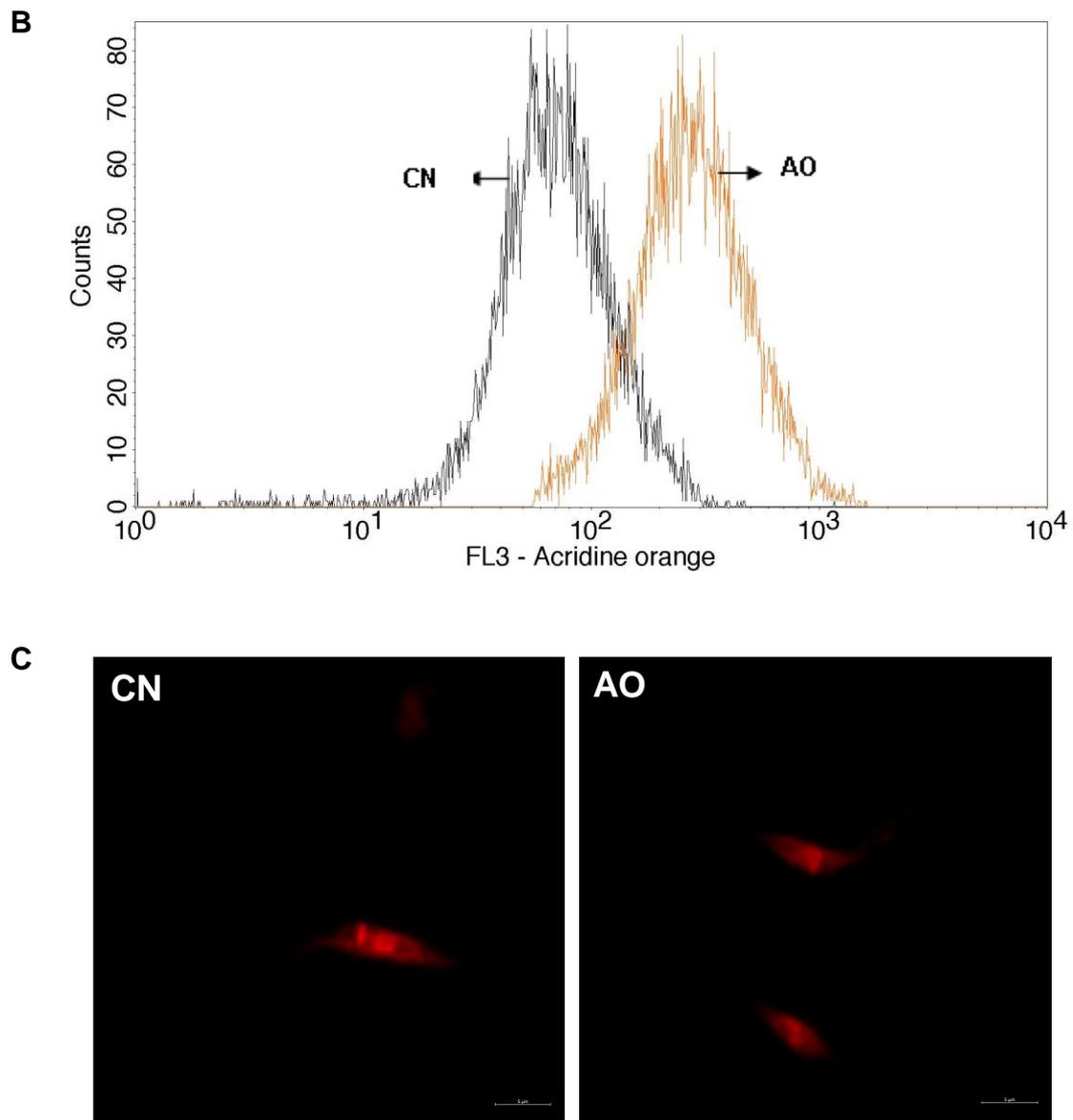
Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} do AO Gráfico (A); Histograma (B). (NM= não marcado; 7-AAD= marcado com 7-amino actinomicina D; Anexina V-PE= marcados com anexina V- ficoeritrina; DM= marcado com 7-AAD e Anexina V-PE. CN = controle negativo; AO = ácido oleanólico). Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm E.P.M. de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método One-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ vs. controle).

5.9 Determinação de morte celular por autofagia

O ensaio de citometria de fluxo utilizando laranja de acridina teve como objetivo avaliar os compartimentos acídicos, sugerindo um dano por autofagia, das formas epimastigotas tratadas com AO (11,66 μ M). Os resultados demonstraram aumento significativo de 86% na intensidade de fluorescência das culturas tratadas com AO (Figura 24 A, B). O resultado da microscopia confocal confirma o aumento do percentual de intensidade de fluorescência, ou seja, presença de compartimentos acídicos (Figura 24 C).

Figura 24 - Efeito do ácido oleanólico sobre o aumento da laranja de acridina nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.





Fonte: elaborada pelo autor.

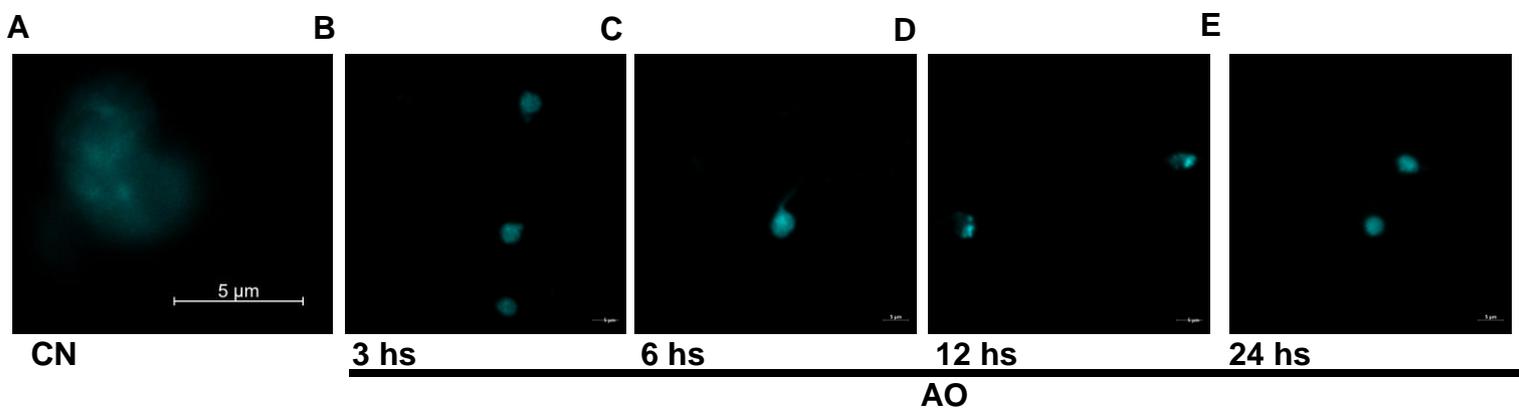
Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular marcado por laranja de acridina na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI_{50} de AO. Gráfico (A); Histograma (B); Microscopia confocal (C). (CN = controle negativo; AO = ácido oleanólico). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

Uma vez que o tratamento do AO em epimastigotas de *T. cruzi* indicou a presença de compartimentos acídicos quando marcado com laranja de acridina, o nosso próximo passo foi investigar se as alterações observadas em *T. cruzi* por citometria de fluxo eram realmente provenientes de processos autofágicos. Assim, para avaliar esse processo as formas epimastigotas de *T. cruzi*, após o tratamento com a AO (11,66 μ M) foram incubadas com MDC, uma sonda fluorescente seletiva para vacúolos

autofágicos.

A análise por microscopia confocal não indicou marcação positiva no controle (Figura 25 A). No entanto quando analisamos os parasitos após incubação com o AO, por 3, 6, 12 e 24 horas, detecta-se uma marcação pontual de compartimentos autofágicos em todo curso temporal (Figura 24 B-E).

Figura 25 - Efeito do ácido oleanólico marcado com MDC nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 3, 6, 12 e 24 horas de tratamento.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular marcado por MDC na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 3, 6, 12 e 24 horas de tratamento com CI_{50} de AO. Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência \pm E.P.M de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método teste t Student ($p < 0,05$ vs. controle).

6 DISCUSSÃO

Há mais de um século após sua descoberta, a doença de Chagas continua a ser um desafio epidemiológico (DIAS et al., 2016). Além disso, a doença se destaca por seu impacto médico e econômico, especialmente para populações de baixa renda em países tropicais, porém ainda é negligenciada pela indústria farmacêutica (WHO, 2015).

Diante dessa restrição, apenas o fármaco benzonidazol, desenvolvido no início de 1970, está atualmente disponível pelo Ministério da Saúde para o tratamento. Infelizmente, esta quimioterapia é insatisfatória, uma vez que este composto apresenta efeitos colaterais que pode, em alguns casos, levar à descontinuação do tratamento (VIOTTI et al., 2013).

Tem sido identificado muitos produtos naturais de diferentes classes estruturais com atividade tripanocida (NIBRET; WINK, 2011; BORGES et al., 2012). Um grande avanço para a pesquisa de novos fármacos com potencial tripanocida durante a última década tem sido a síntese de derivados de triterpenóides naturais, como exemplo, o ácido oleanólico e o ácido betulínico, frequentemente encontrados em muitas espécies de plantas e que exibem várias atividades biológicas (ZHAO et al., 2015; POLLIER; GOOSSENS, 2012; LEE; KIM; PARK, 2015; ALI-SEYED et al., 2016).

Dada à alta toxicidade do único fármaco disponível no mercado, existe uma necessidade na busca de novas estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitos sem causar tantas complicações para o hospedeiro. Deste modo, o presente estudo inicialmente avaliou o efeito citotóxico do AB e AO em células hospedeiras (LLCMK2), onde foi demonstrado que ambos, AB e AO não causam toxicidade nas células nas concentrações utilizadas, corroborando os estudos de ALI-SEYED et al. (2016) e TIAN et al. (2017), que demonstraram toxicidade para células cancerígenas, mas não apresentaram citotoxicidade para células normais. Adicionalmente, estudos prévios demonstraram que triterpenóides naturais induzem, seletivamente, a morte de células tumorais (WANG et al., 2010).

Em relação ao efeito do AB e AO nas formas epimastigotas e tripomastigotas, nossos resultados demonstraram que houve inibição tanto do crescimento de epimastigotas quanto redução da viabilidade de tripomastigotas de

cepa Y de *T. cruzi* para ambos triterpenos avaliados.

Previamente, foi demonstrado efeito leishmanicida do AB extraído da *Lantana camara* Linn sobre as formas promastigotas de *Leishmania major* (BEGUM et al., 2014); o AB extraído da *Cornus florida* L. apresentou efeito leishmanicida sobre *L. tarentolae* e efeito antiplasmodial para *Plasmodium falciparum* (GRAZIOSE et al., 2012). O AB e seus derivados também demonstraram efeito leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* e efeito antiplasmodial para *P. falciparum* (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010). Existem também estudos prévios com efeito tripanocida dos derivados de ácido betulínico, que corroboram com nossos resultados, demonstrando efeito para formas epimastigotas de cepa Tulahuen de *T. cruzi* (DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010), formas tripomastigotas de cepa *T. brucei* (BERO et al., 2013) e cepa Y de *T. cruzi* (MEIRA et al., 2016).

Recentemente, foram também demonstrados o efeito do AO extraído da *Lantana camara* Linn sobre as formas promastigotas de *Leishmania major* (BEGUM et al., 2014) e *Leishmania donovani* (GHOSH; KAR; BERA, 2016), bem como efeito antiplasmodial para *Plasmodium berghei* (SIBIYA; MABANDLA; MUSABAYANE, 2016).

O benzonidazol, fármaco de referência, tem valores de CI_{50} que variam de acordo com a cepa de *T. cruzi* utilizada, com concentrações entre 2 a 13 $\mu\text{g/ml}$ (CAMPOS et al., 2010). No presente estudo, demonstramos que o AB é mais tóxico para os tripomastigotas do que para as células de mamíferos, com IS igual a 7,5 enquanto o IS do BZ foi de 2,3, evidenciando um índice de seletividade do AB superior ao do benzonidazol, e com seletividade para o parasito quando testado em LLCMK2. Contudo, nossos dados corroboram com Prayong, Barusrux e Weerapreeyakul (2008), que afirmam que quando o composto apresenta IS superior a 3 pode-se considerar o composto seletivo para o parasito.

De acordo com a padronização para ensaios de triagem *in vitro* e *in vivo* de compostos ativos contra o *T. cruzi* (ROMANHA et al., 2010), os compostos devem ser ativos em formas tripomastigotas em concentrações iguais ou inferiores à do benzonidazol e com índice de seletividade (IS - razão entre CI_{50} nas células LLCMK2 e a CI_{50} nos protozoários) maior ou igual a 50 para seguirem para ensaios *in vivo* (NWAKA; HUDSON, 2006). Em relação ao AO, os resultados foram bem

promissores, pois demonstraram que a CI_{50} é significativamente baixa (13,97 μ M) e mais tóxica para os tripomastigotas do que para as células hospedeiras, a qual não foi determinado uma concentração capaz de inibir 50 por cento do crescimento celular. Assim sugerimos que o IS do AO foi superior a 114 enquanto o IS do BZ foi de 2,3, evidenciando que o ácido oleanólico apresenta um índice de seletividade maior que 50, o qual é o IS referência padrão para seguir com os ensaios *in vivo*.

O presente estudo também avaliou o efeito do AB e AO sobre as formas amastigotas, que é a forma infectante e proliferativa de *T. cruzi* (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Nossos resultados mostraram que ambos terpenos apresentaram um efeito tóxico sobre a forma intracelular, ocorrendo redução no percentual de células infectadas e no índice de sobrevivência de amastigotas em ambos os períodos de incubação, 24 e 48 horas. Previamente já foi observado em outros estudos o efeito do AO isolado do extrato metanólico de folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae) em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (TORRES-SANTOS et al., 2004). Foi também demonstrado que os derivados do AB (BA4, BA5, BA6 e BA8) apresentam efeito sobre as formas amastigotas, obtidas a partir de macrófagos infectados com tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi* (MEIRA et al., 2016)

Apesar da variedade de estudos sobre a morte celular em protozoários, incluindo tripanossomatídeos, os aspectos detalhados dos mecanismos moleculares e regulação destes permanecem ainda para serem esclarecidos. As principais características de morte celular em organismos multicelulares, incluem retração celular, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina e fragmentação típica do DNA internucleosomal, externalização da fosfatidilserina, perda do potencial da membrana mitocondrial e degradação por ativação de caspases para os fenótipos morfológicos e bioquímicos apoptóticos. As características necróticas são a perda da integridade da membrana plasmática, a vacuolização citosólica, a interrupção da homeostase do cálcio, a degradação geral por hidrolases lisossômicas e a indução da resposta inflamatória (MENNA-BARRETO E CASTRO, 2015). Nas últimas quatro décadas, muitos estudos descreveram a formação recorrente de autofagossomas, esses mostraram níveis distintos de degradação dependendo do grau de danos da estrutura celular dentro da organela (VICKERMAN; TETLEY, 1977; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2012). Em *T. cruzi*, os perfis de retículo endoplasmático foram relatados como a principal origem dos fagóforos que

se refere ao compartimento pré-lisossômico, denominado reservossomo, sugerindo a participação desta organela na formação de autofagolisossomos em formas epimastigotas (DUSZENKO et al., 2011; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2012) características peculiares à morte celular por autofagia.

AB induziu alterações no potencial da membrana mitocondrial, alterações na integridade da membrana celular, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e aumento do inchaço dos reservossomos em formas epimastigotas tratadas quando comparado com o controle. Avaliamos também as vias de morte celular através dos marcadores Anexina V/7AAD, afim de elucidar o mecanismo de morte induzido por AB. Deste modo, as formas epimastigotas tratadas com AB exibiram um aumento significativo na fluorescência marcada duplamente (DM) e, principalmente, aquelas marcadas com 7AAD após 24 h de tratamento em comparação com os parasitos não tratados. Além disso, indicou a presença de compartimentos acídicos, sugerindo também a possível morte celular por autofagia.

Em relação ao AO, não foram observados indução de alterações de morte celular por necrose, nem apoptose em epimastigotas. Deste modo, avaliamos a possível morte celular por autofagia através da marcação dos compartimentos acídicos com laranja de acridina. Nossos resultados demonstraram o aumento na intensidade de fluorescência vermelha que é proporcional ao grau de acidez e/ou ao volume do compartimento ácido celular quando os parasitos foram tratados com AO. Além disso, confirmamos esse resultado através da marcação com a sonda de MDC, durante curso-temporal de 3 a 24 horas, detectando a presença de compartimentos autofágicos e nucleares, respectivamente.

Portanto, sugerimos que a morte celular de epimastigotas de cepa Y de *T. cruzi* ocorreu por necrose quando tratados com ácido betulínico e por autofagia quando tratados por ácido oleanólico. Nossos resultados corroboram com um estudo que demonstrou o efeito do derivado de ácido betulínico (BA5) em tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, avaliado com a marcação de Anexina/Iodeto de Propídeo (PI) e que sugere a morte celular do parasito por necrose (MEIRA et al., 2016).

Ademais, nossos resultados com AO também corroboram com o efeito dos derivados de ácido arjunólico (AA) isolado do extrato metanólico de folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae) que parece ser largamente dependente da autofagia, uma vez que foram observados numerosos vacuolos autofágicos em *L. amazonensis* (TORRES-SANTOS et al., 2004; SOUZA-NETA et al., 2014). Além

disso, a literatura descreve que diversos terpenóides demonstraram induzir autofagia em diferentes células de mamíferos (NEWMAN et al., 2007; XU et al., 2007; WANG et al., 2010; SHIN; KIM; PARK, 2012).

Nesse trabalho, foi evidenciado o efeito dos ácidos betulínico e olenólico nas três formas evolutivas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, além disso, os ácidos não demonstraram efeitos citotóxicos para a célula hospedeira nas concentrações testadas.

Uma vez que o composto de referência empregado na terapêutica da doença de Chagas, benzonidazol, apresenta alta toxicidade e limitada eficácia, é relevante observar o potencial de um produto sintético de origem natural que tem atividade tripanocida superior à droga de referência para esta parasitose e baixa toxicidade.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou ação anti-tripanosoma dos ácidos betulínico e oleanólico nas três formas do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Além disso, os ácidos betulínico e oleanólico não apresentaram citotoxicidade sobre células LLCMK2.

O mecanismo de morte celular sugerido para o ácido betulínico foi via necrose com envolvimento da alteração do potencial da membrana mitocondrial e aumento das espécies reativas de oxigênio e do ácido oleanólico foi via autofágica com a detecção de compartimentos acidícos e vacúolos autofágicos.

REFERÊNCIAS

ALAKURTTI, Sami et al. Anti-leishmanial activity of betulin derivatives. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.123-126, 5 fev. 2010.

ALI, M. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.295-299, jun. 2002.

ALI-SEYED, Mohamed et al. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.725-737, 3 fev. 2016.

ANDRADE, Daniele et al. Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 165, n. 5, p.1333-1347, 10 fev. 2012.

ANDREWS, NW; COLLI, W. Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. *J Protozool.*, S/, v. 2, n. 29, p.264-269, maio 1982.

ANGHEBEN, Andrea et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, [s.l.], p.540-550, 2015.

ARGOLO, Ana Maria et al. **DOENÇA DE CHAGAS e seus Principais Vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2008. 67 p.

BAG, Braja Gopal; DASH, Shib Shankar. First self-assembly study of betulinic acid, a renewable nano-sized, 6-6-6-6-5 pentacyclic monohydroxy triterpenic acid. **Nanoscale**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.4564-4566, 2011.

BARACCA, et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*, S/, v. 3, n. 1606, p.137-146, set. 2003.

BEGUM, Sabira et al. Leishmanicidal Triterpenes from Lantana camara. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.709-718, maio 2014.

BERMUDEZ, José et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 156, p.1-16, abr. 2016.

BERO, J. et al. Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of Keetia leucantha leaves with inhibitor activity on Trypanosoma brucei glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 20, n. 3-4, p.270-274, fev. 2013.

BORGES, Andrezza Raposo et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 132, n. 2, p.123-128, out. 2012.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.347-382, out. 1973.

BURSCH, W. The autophagosomal–lysosomal compartment in programmed cell death. **Cell Death And Differentiation**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.569-581, jun. 2001.

CAMARGO, EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin Of Metacyclic Trypanosomes In Liquid Media. *Rev Inst Med Trop, São Paulo*, v. 6, n. 6, p.93-100, maio 1964.

CAMPOS, M.C.O. et al. Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, [s.l.], v.107, p.1193–1204, 2010.

CANÇADO, J. Romeu. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benzonidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.29-37, fev. 2002.

CARADONNA, Kacey L.; BURLEIGH, Barbara A.. Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Advances In Parasitology**, [s.l.], p.33-61, 2011.

CARDOSO, Mariana S.; REIS-CUNHA, João Luís; BARTHOLOMEU, Daniella C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 6, p.659-674, 18 jan. 2016.

CASTELLANO, J. M. et al. Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. **Diabetes**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.1791-1799, 23 maio 2013.

CATHCART, R; SCHWIERS, e; AMES, Bn. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem.*, S/, v. 134, n. 1, p.111-116, nov. 1983.

CAVALCANTI, Danielle et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-12, 2009.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.159-218, ago. 1909.

COMBS, Terry P. et al. The Adipocyte as an Important Target Cell for *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 25, p.24085-24094, 18 abr. 2005.

CÓRDOVA, Claudia et al. Oleanolic Acid Controls Allergic and Inflammatory Responses in Experimental Allergic Conjunctivitis. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.91282-91292, 3 abr. 2014.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.277-282, maio 2015.

COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. Chagas disease: What is known and what should be improved. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.286-296, jun. 2012.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [s.l.], v. 465, n. 7301, p.6-7, 24 jun. 2010.

CRETTON, Sylvian et al. Chemical constituents from *Waltheria indica* exert in vitro activity against *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 105, p.55-60, set. 2015.

DAS, Jayeeta et al. Poly (lactide-co-glycolide) encapsulated extract of *Phytolacca decandra* demonstrates better intervention against induced lung adenocarcinoma in mice and on A549 cells. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.313-324, set. 2012.

DE SOUZA, Wanderley. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des.**, [S.L.], v. 4, n. 8, p.269-285, 2002.

DIAS, João Carlos Pinto et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 25, n. 21, p.1-10, jun. 2016.

DIAS, João Carlos Pinto; AMATO NETO, Vicente. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *trypanosoma cruzi* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 44, p.68-72, 2011..

DOMÍNGUEZ-CARMONA, D.b. et al. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.379-382, abr. 2010.

DRĄG-ZALESIŃSKA, Małgorzata et al. The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment – In vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 72, p.91-97, maio 2015.

DUNAI, Zsuzsanna; BAUER, Pal I.; MIHALIK, Rudolf. Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. **Pathology & Oncology Research**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.791-800, 21 jul. 2011.

DUSZENKO, Michael et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.127-158, fev. 2011.

ELIAS, M et al. Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. *Protist*, [s.l.], v. 158, n. 2, p.147-157, 18 abr. 2007.

FERNANDES, Maria Cecilia et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 208, n. 5, p.909-921, 2 maio 2011.

FERREIRA, Daniele da Silva et al. In vivo activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 134, n. 4, p.455-459, ago. 2013.

FERREIRA, Daniele da Silva et al. Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 106, n. 4, p.985-989, 6 fev. 2010.

FILARDI, Ls; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg., S/**, v. 5, n. 81, p.755-759, 1987.

FRANCO, Jaques et al. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benzonidazole resistance: Gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 31, p.198-208, abr. 2015.

GALLO, Gloria et al. Biochemical characterization of a protein tyrosine phosphatase from *Trypanosoma cruzi* involved in metacyclogenesis and cell invasion. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 408, n. 3, p.427-431, maio 2011.

GHOSH, Santanu; KAR, Nabanita; BERA, Tanmoy. Oleanolic acid loaded poly lactic co- glycolic acid- vitamin E TPGS nanoparticles for the treatment of *Leishmania donovani* infected visceral leishmaniasis. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 93, p.961-970, dez. 2016.

GILBER, Soraia Reda et al. Comparison of conventional serology and PCR methods for the routine diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.310-315, jun. 2013.

GONÇALVES, Renata L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal Of Bioenergetics And Biomembranes**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.651-661, 12 nov. 2011.

GRAZIOSE, Rocky et al. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 2, p.456-461, jul. 2012.

GUARNERI, Alessandra Aparecida; LORENZO, Marcelo Gustavo. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **Journal Of Insect Physiology**, [s.l.], p.200-209, jul. 2016.

GUIMARAES, Cinthya Assunção; LINDEN, Rafael. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 271, n. 9, p.1638-1650, maio 2004.

HALBERSTEIN, Robert A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals Of Epidemiology**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.686-699, out. 2005.

HENAO-MARTÍNEZ, Andrés F.. Acute Chagas Disease and Risk of Congenital Infection. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.407-408, 28 set. 2015.

HÜBNER, Dariana Pimentel Gomes et al. Anti-Trichomonas vaginalis activity of betulinic acid derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 84, p.476-484, dez. 2016.

INNOCENTE, Adrine et al. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. **Molecules**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.12003-12014, 12 out. 2012.

JIMENEZ, Veronica. Dealing with environmental challenges: Mechanisms of adaptation in Trypanosoma cruzi. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 165, n. 3, p.155-165, abr. 2014.

KESSLER, Rafael Luis et al. Trypanosoma cruzi Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.e55497, 31 jan. 2013.

KLIONSKY, Daniel J et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-222, 2 jan. 2016.

LEE, Sook Young; KIM, Haeng Hoon; PARK, Sang Un. Recent studies on betulinic acid and its biological and pharmacological activity. **Excli J.**, S/, n. 14, p.199-203, 2015.

LEE, Wonhwa et al. Anti-inflammatory Effects of Oleanolic Acid on LPS-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. **Inflammation**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.94-102, 9 ago. 2012.

LIMA, Danya Bandeira et al. Antiparasitic effect of Dinoponera quadriceps giant ant venom. **Toxicon**, [s.l.], v. 120, p.128-132, set. 2016.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol**, [s.l.], v. 49, p. 57-68, 1995.

LOCKSHIN, Richard A.; ZAKERI, Zahra. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 2, n. 7, p.545-550, jul. 2001.

LONGO, Dan L.; BERN, Caryn. Chagas' Disease. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 373, n. 5, p.456-466, 30 jul. 2015.

LUO, Runlan et al. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 84, p.1321-1330, dez. 2016.

MAEDA, Fernando Y.; CORTEZ, Cristian; YOSHIDA, Nobuko. Cell signaling during Trypanosoma cruzi invasion. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 3, p.361-371, 2012.

MEIRA, Cássio Santana et al. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-Trypanosoma cruzi inhibitors. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 166, p.108-115, jul. 2016.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, [s.l.], v. 136, n. 05, p.499-510, 13 mar. 2009.

MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok; CASTRO, Solange Lisboa de. Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites. **Cell Death - Autophagy, Apoptosis And Necrosis**, [s.l.], p.953-978, 16 dez. 2015.

MIRANDA, Kildare et al. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 118, n. 1, p.2-9, jan. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, S/, v. 1-2, n. 65, p.55-63, 1983.

MUNAFÓ, Db; COLOMBO, Mi. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci.*, S/, v. 20, n. 114, p.3619-3629, 2001.

MURTA, Sm et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Mol Biochem Parasitol.**, S/, v. 2, n. 93, p.203-214, 1998.

NAGAJYOTHI, Fnu et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.634-643, 24 fev. 2012.

NAGAJYOTHI, Fnu et al. *Trypanosoma cruzi* Utilizes the Host Low Density Lipoprotein Receptor in Invasion. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.953-953, 1 fev. 2011.

NEWMAN, R. A. et al. Autophagic Cell Death of Human Pancreatic Tumor Cells Mediated by Oleandrin, a Lipid-Soluble Cardiac Glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.354-364, 1 dez. 2007.

NIBRET, e; WINK, M.. Trypanocidal and cytotoxic effects of 30 Ethiopian medicinal plants. **Z Naturforsch C.**, S/, v. 11, n. 66, p.541-546, 2011.

NOYA, Belkisyolé Alarcón de; GONZÁLEZ, Oscar Noya. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 151, p.94-102, nov. 2015.

NWAKA, Solomon; HUDSON, Alan. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, [s.l.], v. 5, n. 11, p.941-955, nov. 2006.

OKUDO, T et al. Yamazaki, Healthdrinks containing ursolic acid and/or oleanolic acid. **Chem. Abst**, [s.l.], v. 112, p. 54097m, 1990.

PAGLIN, S et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.*, S/, v. 2, n. 15, p.439-444, 2001.

PINAZO, María Jesús et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterología y Hepatología**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.191-200, mar. 2010.

POLLIER, Jacob; GOOSSENS, Alain. Oleanolic acid. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 77, p.10-15, maio 2012.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, [s.l.], v. 79, n. 7-8, p.598-601, dez. 2008.

PROTO, William R.; COOMBS, Graham H.; MOTTRAM, Jeremy C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.58-66, 3 dez. 2012.

RASSI, et al. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, [s.l.], v. 95, n. 7, p.524-534, 18 dez. 2009.

REINER, Teresita et al. Betulinic Acid Selectively Increases Protein Degradation and Enhances Prostate Cancer-Specific Apoptosis: Possible Role for Inhibition of Deubiquitinase Activity. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.56234-56244, 12 fev. 2013.

RODRIGUEZ, A. et al. CAMP Regulates Ca²⁺-dependent Exocytosis of Lysosomes and Lysosome-mediated Cell Invasion by Trypanosomes. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 274, n. 24, p.16754-16759, 11 jun. 1999.

ROMANHA, A.J et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

SABINO, E. C. et al. Ten-Year Incidence of Chagas Cardiomyopathy Among Asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-Seropositive Former Blood Donors. **Circulation**, [s.l.], v. 127, n. 10, p.1105-1115, 7 fev. 2013.

SALOMÃO, Kelly et al. Stairway to Heaven or Hell? Perspectives and Limitations of Chagas Disease Chemotherapy. **Curr Top Med Chem**, [s.l.], v. 20, n. 16, p.2266-2289, 2016.

SAMUILOV, VD; OLESKIN, AV; LAGUNOVA, EM. Programmed cell death. **Biochemistry (mosc)**, S/, v. 8, n. 65, p.873-887, ago. 2000.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Brasil, v. 46, n. 21, p.1-9, 2015.

SHENG, Huaming; SUN, Hongbin. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.543-553, 2011.

SHIN, Seoung Woo; KIM, Sung Youl; PARK, Jeen-woo. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1823, n. 2, p.451-457, fev. 2012.

SIBIYA, Happiness P.; MABANDLA, Musa V.; MUSABAYANE, Cephas T. The Effects of Transdermally Delivered Oleanolic Acid on Malaria Parasites and Blood Glucose Homeostasis in *P. berghei*-Infected Male Sprague-Dawley Rats. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.0167132-0167142, 1 dez. 2016.

SILVA, Gloria N. S. et al. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. **Tropical Medicine & International Health**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.29-39, 13 out. 2014.

SINGH, G. B. et al. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.456-458, maio 1992.

SOARES, Maurilio José. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz, S/**, v. 1, n. 94, p.139-141, 1999.

SOMOVA, L.o. et al. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 10, n. 2-3, p.115-121, jan. 2003.

SOUSA, Maria C. et al. Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.e89939, 18 mar. 2014.

SOUZA-NETA, Lc et al. Modes of action of arjunolic acid and derivatives on *Trypanosoma cruzi* cells. **Curr Top Med Chem.**, Salvador, v. 8, n. 14, p.1022-1032, 2014.

SPIVAK, Anna Yu. et al. Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, n. 21, p.6297-6304, nov. 2014.

STUART, Ken et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 118, n. 4, p.1301-1310, 1 abr. 2008.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.1749-1759, 28 ago. 2012.

TIAN, Tian et al. Synthesis of novel oleanolic acid and ursolic acid in C-28 position derivatives as potential anticancer agents. **Archives Of Pharmacal Research**, [s.l.], p.1089-11090, 18 jan. 2017.

TOLEDO, M. J. O.. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal

genotypes. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.1045-1053, 29 abr. 2004.

TORRES-SANTOS, Ec et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**. 2004 Feb;**11(2-3):114-20.**, S/, v. 2, n. 11, p.114-120, fev. 2004.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol.**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.472-481, maio 2001.

VICKERMAN, K; TETLEY, L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. **Ann Soc Belg Med Trop**, [s.l.], p. 441-457, 1977.

VIOTTI, R. et al. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.635-639, 18 nov. 2013.

VIOTTI, Rodolfo. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. **Annals Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 144, n. 10, p.724-734, 16 maio 2006.

WANG, B.; JIANG, Z.H.E. Studies on oleanolic acid. **Chin. Pharm**, [s.l.], v. 27, p. 393–397,1992.

WANG, H et al. Natural triterpenoid avicins selectively induce tumor cell death. **Commun Integr Biol**. 2010 May;**3(3):205-8.**, S/, v. 3, n. 3, p.205-208, maio 2010.

WANG, Xin et al. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 184, n. 3, p.328-337, mar. 2010.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 13, p.5022-5027, 26 mar. 2008.

WLODKOWIC, Donald et al. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods In Cell Biology*, [s.l.], p.55-98, 2011.

WOOLSEY, A. M. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 116, n. 17, p.3611-3622, 1 set. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva: **World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Atualizado em março de 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 06 março de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (Org.). Weekly epidemiological record: Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **World Health Organization**. Geneva, p. 33-44. 6 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/ (Accessed october 17, 2016).

XU, Z-x et al. A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase. **Cell Death And Differentiation**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.1948-1957, 10 ago. 2007.

YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.269-278, mar. 2000.

ZHAO, Chun-hui et al. Design, synthesis, and biofunctional evaluation of novel pentacyclic triterpenes bearing O-[4-(1-piperazinyl)-4-oxo-butyl] moiety as antiproliferative agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 20, p.4500-4504, out. 2015.

ZHONG, Li et al. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* linked to cell invasion. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 161, n. 1, p.15-20, abr. 1998.

ZONG, W; THOMPSON CB. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1-15, 1 jan. 2006.

APÊNDICE

Manuscript Details

Manuscript number	ACTROP_2016_701
Title	Betulinic acid induces cell death by necrosis in <i>Trypanosoma cruzi</i>
Article type	Short Communication

Abstract

Chagas' disease is a neglected disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and constitutes a serious health problem worldwide. The treatment is limited, with variable efficacy of benznidazole and nifurtimox. Betulinic Acid (BA), a triterpene, can be found in medicinal herbs and has a wide variety of biological and pharmacological activities. The objective was to evaluate betulinic acid effects on the cell death mechanism in *Trypanosoma cruzi* strain Y. BA inhibited the growth of epimastigotes in periods of 24 h (IC₅₀= 73.43 µM), 48 h (IC₅₀= 119.8 µM) and 72 h (IC₅₀= 212.2 µM) of incubation; of trypomastigotes (IC₅₀= 51.88 µM) in periods of 24 h and intracellular amastigotes (IC₅₀= 25.94 µM) in periods of 24 and 48 h of incubation, no toxicity on LLC-MK2 cells at the concentrations used. Analysis of the possible mechanism of parasite cell death showed alterations in mitochondrial membrane potential, alterations in cell membrane integrity, an increase in the formation of reactive oxygen species and increase swelling of the reservosomes. Our results suggest betulinic acid was able to inhibit all developmental forms of *Trypanosoma cruzi* Y strain with necrotic mechanism and involvement of mitochondrial membrane potential alteration and increase in reactive oxygen species.

Keywords	Betulinic Acid; Chagas disease; <i>Trypanosoma cruzi</i> ; necrosis.
Corresponding Author	Ramon Menezes
Order of Authors	Paloma Sousa, Racquel Souza, Louise Tessarolo, Ramon Menezes, Tiago Sampaio, Jader Almeida, Alice Martins
Suggested reviewers	Rafael Castillo, Sílvia Monteiro, Toshihiro Murata

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]
 Author Agreement.doc [Author Agreement]
 Graphical abstract.pdf [Graphical Abstract]
 Sousa, PL. Manuscript.docx.doc [Manuscript File]
 Sousa, PL. Figure 1.tiff [Figure]
 Highlights.docx [Highlights]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.