

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

Divar Fernandes Pires Neto

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS MORITA-BAYLIS-  
HILLMAN SOBRE *Trypanosoma cruzi*

RECIFE

2013

**Divar Fernandes Pires Neto**

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS MORITA-BAYLIS-HILLMAN  
SOBRE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao  
Curso de Mestrado Acadêmico  
em Saúde Pública do Centro de  
Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

RECIFE

2013

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- P667e Pires Neto, Divar Fernandes.  
Estudo da atividade biológica de adutos Morita-Baylis-Hillman sobre *Trypanosoma cruzi* / Divar Fernandes Pires Neto. - Recife: s.n, 2013.  
90 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública)  
- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013  
Orientadora: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo.
1. Biologia Celular. 2. *Trypanosoma cruzi* - ultraestrutura. 3. Tripanossomicidas - síntese química. 4. Tripanossomicidas - farmacologia. 5. *Trypanosoma cruzi* - efeitos de drogas. 6. Doença de chagas - quimioterapia. 7. *Trypanosoma cruzi* - crescimento. 8. Concentração Inibidora 50. 9. Acrilonitrila - síntese química. 10. Acrilonitrila - farmacologia. 11. Acrilonitrila - análogos & derivados. I. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de. II. Título.

Divar Fernandes Pires Neto

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ADUTOS MORITA-BAYLIS-HILLMAN**  
**SOBRE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao  
Curso de Mestrado Acadêmico  
em Saúde Pública do Centro de  
Pesquisas Aggeu Magalhães,  
Fundação Oswaldo Cruz para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciências.

Aprovado em: 23 / 04 / 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

---

Dra. Andrezza Raposo Borges  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Thiago Henrique Napoleão  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e meus avós pelo exemplo que sempre foram pra mim e por todo amor, carinho, apoio e compreensão que recebi durante toda a minha vida;
- Aos meus irmãos, Rebeca e Diego, pela amizade e companheirismo;
- A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo, por confiar em mim o desenvolvimento deste projeto e me orientar de forma competente, com paciência e amizade;
- A toda minha família, que mesmo sem entender o meu trabalho, me apoiaram a seguir carreira científica, em especial Jucimar e Julyana que sempre se interessavam em saber o andamento dos trabalhos e ao meu afilhado, Vinícius por trazer alegria a minha casa;
- Ao Dr. Mário Vasconcellos por ceder os compostos utilizados nesta dissertação;
- Aos membros da banca por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste projeto e pela dedicação à leitura desta dissertação;
- Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular/Microbiologia, por todo o carinho, apoio, dedicação e pela ajuda primordial no desenvolvimento deste trabalho, incluindo os momentos de risadas e cantorias. Agradeço a vocês por todos esses dias de esforço no laboratório: Aline, Amanda, Andrezza, Flávia, Jana, Juliana, Karla, Keicyanne, Larissa, Lívia, Luís, Neyla e Taciana. Em especial, agradeço grandemente o esforço e companheirismo de Andrezza, Keicyanne, Neyla e Taciana, pelo apoio em experimentos, técnicas, discussões e momentos de frustração com células que insistiam em contaminar;
- Aos amigos da graduação Gabriela, Camila, Rafael e Maria pela grande amizade que dedicaram a mim;
- Aos colegas da pós-graduação que me apoiaram e se mostraram companheiros nestes dois anos de curso;

- Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ter cedido suas instalações e equipamentos para a realização da minha dissertação;
  
- A FACEPE pelo suporte financeiro;
  
- E a todos os demais que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”*

Mahatma Gandhi

*“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida.”*

Carlos Chagas

PIRES NETO, Divar Fernandes. **Estudo da atividade biológica de adutos Morita-Baylis-Hillman sobre *Trypanosoma cruzi***. 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, consiste em um grave problema de saúde pública na América Latina, com cerca de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas. O benznidazol é atualmente o único fármaco disponível para o tratamento, apresentando boa atividade na fase aguda, mas com eficácia questionada na fase crônica, além de apresentar severos efeitos colaterais e longo período de tratamento. Tendo em vista a sua fácil síntese e baixo custo, adutos aromáticos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman têm sido considerados promissores como quimioterápicos. Neste sentido, foi avaliada a atividade tripanocida e citotóxica de seis adutos Morita-Baylis-Hillman. Para analisar possíveis efeitos dos adutos sobre estruturas específicas do protozoário foi utilizado a microscopia confocal a laser, através da marcação com Rodamina 123, MitoSOX<sup>TM</sup>, Laranja de Acridina e Kit Live/Dead<sup>®</sup>. As alterações morfológicas em parasitas submetidos ao tratamento foram acompanhadas por microscopia eletrônica de transmissão. Nossos resultados mostraram que todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento de formas epimastigotas e causaram uma diminuição da viabilidade em formas tripomastigotas, apresentando uma moderada citotoxicidade para células de mamíferos. Os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 também foram efetivos em inibir a infecção de macrófagos e diminuir a viabilidade das formas amastigotas. Os compostos não foram capazes de alterar os níveis de produção do óxido nítrico em macrófagos. Análises pela microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão (MET) apontam a mitocôndria como principal alvo intracelular destes compostos. Alterações compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular por necrose e autofagia foram observadas por MET. Os resultados obtidos neste trabalho colocam os adutos Morita-Baylis-Hillman em evidência como agentes promissores para o tratamento da tripanossomíase americana.

Palavras-chave: **1.** Biologia Celular **2.** *Trypanosoma cruzi* - ultraestrutura **3.** *Trypanosoma cruzi* – efeito de drogas **4.** Tripanossomicidas – farmacologia **5.** Acrilonitrila - farmacologia



PIRES NETO, Divar Fernandes. **Study of the biological activity of Morita-Baylis-Hillman adducts against *Trypanosoma cruzi***. 2013. Thesis (Master Degree of Public Health Program) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

### ABSTRACT

Chagas disease, caused by hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major public health concern in Latin America, with about 7-8 million people infected. The benznidazole is the only currently available drug for treatment, showing good activity in the acute phase, but with efficacy questioned in the chronic phase, presenting severe side effects and longer treatment period. Because of their easy synthesis and low cost, aromatic adducts from the Morita-Baylis-Hillman reaction, have been considered promising as chemotherapeutic agents. In this sense, we evaluated the tripanocidal and cytotoxic activities of six Morita-Baylis-Hillman adducts. Confocal microscopy analysis was performed to analyze the possible effects of adducts on parasite-specific structures by using Rhodamine 123, MitoSOX™, Acridine Orange and Live/Dead Kit® stainings. The morphological changes of parasites submitted to treatment were followed by transmission electron microscopy. Our results showed that all compounds inhibited the growth of epimastigote forms and caused a decrease in the viability of trypomastigote forms, showing a moderate cytotoxicity to mammalian cells. The adducts MBH1, MBH2, MBH5 and MBH7 were also effective in inhibit macrophage infection and replication of intracellular amastigote. The compounds were not capable of change the levels of NO production in macrophage. The analysis of confocal microscopy and transmission electron microscopy indicate the parasite mitochondrion as the main intracellular target of these compounds. Changes consistent with loss of viability and cell death by necrosis and autophagy were also observed by electron microscopy and confocal microscopy. These results of this study point towards the Morita-Baylis-Hillman adducts in evidence as promising agents for the treatment of American trypanosomiasis.

Keywords: **1.** Cell Biology **2.** *Trypanosoma cruzi* – ultrastructure **3.** *Trypanosoma cruzi* – drugs effect **4.** Trypanocidal agents - pharmacology **5.** Acrylonitrile - pharmacology

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Distribuição de indivíduos infectados no mundo	18
<b>Figura 2 -</b>	Novos casos da Doença de Chagas Aguda no Brasil durante o período de 2000 a 2011	19
<b>Figura 3 -</b>	Principais vetores da doença de Chagas no Brasil	20
<b>Figura 4 -</b>	Achados clínicos da fase crônica da doença de Chagas	21
<b>Figura 5 -</b>	Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
<b>Figura 6 -</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
<b>Figura 7 -</b>	Representação da estrutura interna da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .	27
<b>Figura 8 -</b>	Estrutura química dos compostos utilizados na quimioterapia da Doença de Chagas	31
<b>Figura 9 -</b>	Reação Morita-Baylis-Hillman	36
<b>Figura 10 -</b>	Mecanismo mais aceito para a reação Morita-Baylis-Hillman	36
<b>Figura 11 -</b>	Compostos preparados a partir de MBHR e suas atividades biológicas	38
<b>Figura 12 -</b>	Estrutura química dos adutos Morita-Baylis-Hillman testados	40
<b>Figura 13 -</b>	Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 sobre a viabilidade celular e integridade da membrana, através da marcação com o Kit Live/Dead	56
<b>Figura 14 -</b>	Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 sobre a viabilidade celular e integridade da membrana, através da marcação com o Kit Live/Dead	57
<b>Figura 15 -</b>	Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 no $\Delta\psi_m$ , através da marcação com a Rodamina 123	59
<b>Figura 16 -</b>	Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 no $\Delta\psi_m$ , através da marcação com a Rodamina 123	60
<b>Figura 17 -</b>	Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 na produção de ROS, através da marcação com o MitoSOX <sup>TM</sup>	61
<b>Figura 18 -</b>	Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 na produção de ROS, através da marcação com o MitoSOX <sup>TM</sup>	62
<b>Figura 19 -</b>	Microscopia confocal de células tratadas com adutos MBH1 e MBH2 após a marcação com a laranja de acridina.	64
<b>Figura 20 -</b>	Microscopia confocal de células tratadas com adutos MBH5 e MBH7 após a marcação com a laranja de acridina.	65

<b>Figura 21</b> - Fotomicrografia de <i>T. cruzi</i> - Forma epimastigotas	66
<b>Figura 22</b> - Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	68
<b>Figura 23</b> - Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	69

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Efeito dos diferentes adutos sobre o crescimento de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	48
<b>Gráfico 2 -</b>	Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	50
<b>Gráfico 3 -</b>	Efeito dos adutos na atividade hemolítica em hemácias humanas	52
<b>Gráfico 4 -</b>	Índice de Sobrevivência para formas amastigotas intracelulares tratadas com os adutos	53
<b>Gráfico 5 -</b>	Efeito dos adutos na produção de Óxido Nítrico por macrófagos	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Frequência dos efeitos colaterais associados ao Benznidazol e Nifurtimox em adultos	33
<b>Tabela 2 -</b>	Atividade <i>in vitro</i> dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i> , citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (ISe)	49
<b>Tabela 3 -</b>	Efeitos dos adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AO	Laranja de Acridina
ATP	Adenosina Trifostato
CC <sub>50</sub>	Concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células
LC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inviabilizar 50% dos protozoários
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
DCA	Doença de Chagas Aguda
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EthD-1	Homodímero-1 de Etídio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRE	Grupo retirador de elétrons
IC <sub>50</sub>	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento das células
ICICT	Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISE	Índice de Seletividade
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MBHR	Reação Morita-Baylis-Hillman
MCP	Morte Celular Programada
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida-adenina + Hidrogênio
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
IS	Índice de Sobrevivência
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Doença de Chagas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Tripanossomíase Americana: Transmissão .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>Aspectos clínicos da doença .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Diagnóstico .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b><i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>1.6</b>	<b>Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>26</b>
1.6.1	<i>Superfície celular</i> .....	27
1.6.2	<i>Bolsa flagelar e Flagelo</i> .....	28
1.6.3	<i>Mitocôndria e Cinetoplasto</i> .....	29
1.6.4	<i>Reservossomos</i> .....	29
1.6.5	<i>Acidocalcisomas</i> .....	30
1.6.6	<i>Glicossomos</i> .....	30
<b>1.7</b>	<b>Quimioterapia da Doença de Chagas .....</b>	<b>31</b>
1.7.1	<i>Perspectivas de novos fármacos</i> .....	33
<b>1.8</b>	<b>Reação Morita-Baylis-Hillman .....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Adutos Morita-Baylis-Hillman .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Cultivo dos parasitas .....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Atividade tripanocida dos Adutos Morita-Baylis-Hillman .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade sobre células de mamíferos e atividade hemolítica dos adutos Morita-Baylis-Hillman .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Produção de óxido nítrico.....</b>	<b>43</b>



<b>3.6</b>	<b>Análises por microscopia confocal .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Estudo Ultraestrutural .....</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>Animais .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o crescimento de formas epimastigotas .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre formas tripomastigotas .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Citotoxicidade em Células de Mamíferos (Macrófagos Peritoneais e Células Vero) e Atividade Hemolítica .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre formas amastigotas intracelulares .....</b>	<b>52</b>
<b>4.5</b>	<b>Produção de NO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Análises por microscopia confocal a laser .....</b>	<b>54</b>
<i>4.6.1</i>	<i>Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit .....</i>	<i>55</i>
<i>4.6.2</i>	<i>Rodamina 123 e MitoSOX™ .....</i>	<i>58</i>
<i>4.6.3</i>	<i>Laranja de Acridina .....</i>	<i>63</i>
<b>4.7</b>	<b>Análise Ultraestrutural .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
	Anexo A – Parecer do CEUA/CPqAM.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

Em 1908, o médico sanitarista Carlos Chagas, designado para coordenar uma campanha em prol da erradicação da malária no município de São Gonçalo das Tabocas (Minas Gerais), fez a descoberta de uma nova doença: a tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas. Este achado representou não só um avanço no campo da medicina tropical, como também apontava para uma preocupante situação social e sanitária da época (CHAGAS, 1909). Nas moradias onde ocorria a manifestação de uma doença até então desconhecida, Chagas identificou a presença de insetos hematófagos, que apresentavam hábitos noturnos, habitavam residências locais e picavam preferencialmente a face dos residentes. Posteriormente, foi identificado no intestino destes insetos um protozoário hemoflagelado que recebeu o nome de *Trypanosoma cruzi* (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000; COUTINHO; DIAS, 1999).

Diante deste achado, Chagas reforçou sua hipótese sobre a relação entre o parasito e a doença, ratificando-a no ano seguinte quando observou protozoários na amostra sanguínea de uma criança febril. Embora sua descoberta tenha sido alvo de questionamentos por parte da comunidade científica da época (COUTINHO; DIAS, 1999), este trabalho teve um impacto decisivo na carreira científica de Chagas, recebendo um status respeitável na área científica por descrever o parasita, seu ciclo biológico, vetores e reservatórios, bem como a epidemiologia, a clínica e a patologia da doença (GARCIA, 2009).

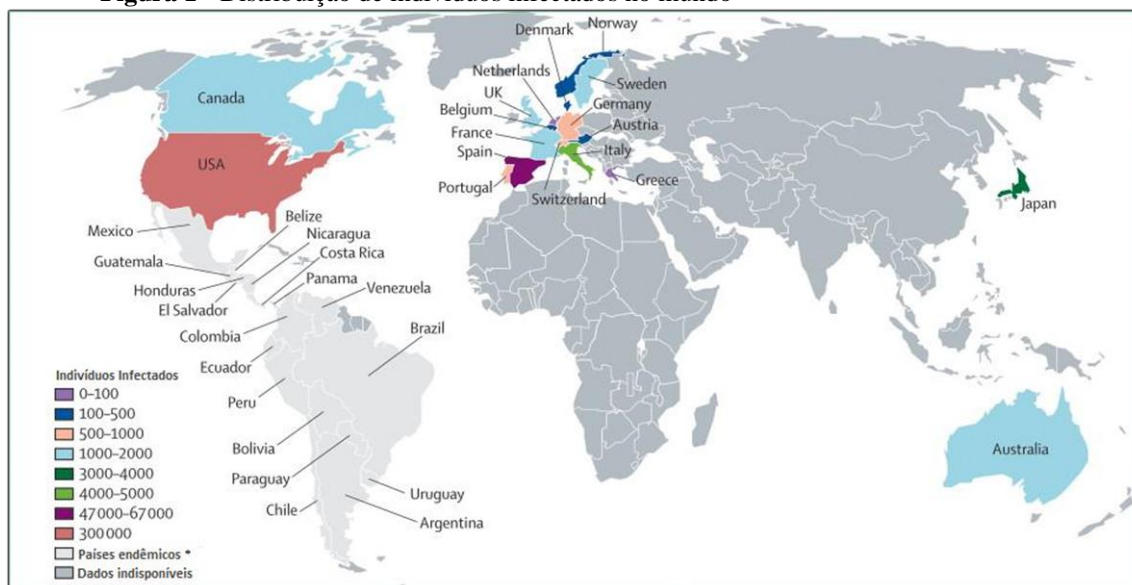
Anterior aos estudos de Carlos Chagas, Charles Darwin já havia relatado sintomas semelhantes aos apresentados na doença de Chagas, além de descrever o contato com insetos triatomíneos, durante uma expedição pela América do Sul em 1835 (BERNSTEIN, 1984; RASSI Jr. et al, 2010). Apesar das especulações de que Charles Darwin tenha convivido com sintomas da doença, relatos históricos têm demonstrado que a tripanossomíase americana é uma enfermidade que acomete seres humanos há milhares de anos. Através de estudos paleoparasitológicos observou-se a presença de moléculas de DNA do parasito em múmias datadas de 9000 anos atrás e localizadas em países como Chile e Peru, sendo a infecção humana causada possivelmente pela invasão do nicho ecológico dos insetos transmissores por povos nômades (AUFDERHEIDE et al., 2004; COURA; VIÑAS, 2010).

Após mais de um século do seu descobrimento, a doença de Chagas ainda persiste como um grave problema de saúde pública. Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde

(OMS) como uma das treze maiores doenças tropicais negligenciadas, apresenta uma estimativa de 7-8 milhões de pessoas infectadas, com 75 a 90 milhões sob potencial risco de infecção e mais de 10 mil mortes/ano (COURA; DIAS, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013; RASSI Jr. *et al.*, 2010).

Considerada uma enfermidade tipicamente rural, a doença de Chagas tem apresentado um crescente perfil urbano, resultado do fenômeno da migração rural (LANA; TAFURI, 2005). É uma doença que apresenta uma distribuição geográfica limitada, principalmente ao continente americano, com um caráter endêmico em 18 países da América Latina, devido à distribuição do inseto vetor. O surgimento de casos em países não endêmicos, como nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e países europeus são relatados devido a outras formas de transmissão e o aumento da imigração para estas áreas (**Figura 1**), aumentando a preocupação dos governos no sentido do seu controle, prevenção e tratamento (ROCHA; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2007).

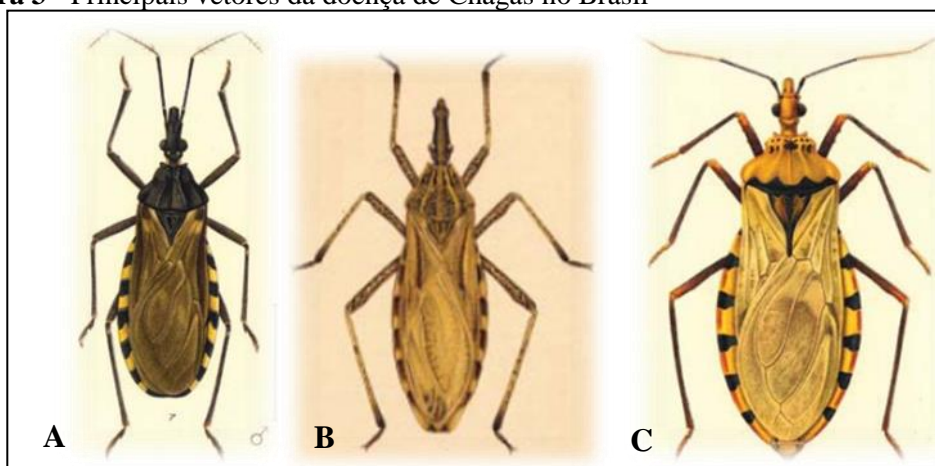
**Figura 1** - Distribuição de indivíduos infectados no mundo



**Fonte:** Adaptado de Rassi Jr. *et al.* (2010).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, predominam casos decorrentes de infecções adquiridas no passado, apresentando três milhões de indivíduos infectados. Novos casos são observados em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina, São Paulo), com maior frequência nos estados da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará, Tocantins) (**Figura 2**) (BRASIL, 2010).



**Figura 3** - Principais vetores da doença de Chagas no Brasil

**Fonte:** Adaptado de Oliveira e Conduro (2004).

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

Além da transmissão vetorial, outros meios ocupam um papel importante na disseminação da doença, como a via transfusional e a via oral. A transmissão transfusional foi considerada a principal forma de transmissão na década de setenta, com aproximadamente 20 mil novos casos anuais apenas no Brasil, devido à alta prevalência de indivíduos chagásicos nos centros urbanos e a inexistência de programas de controle naquela época, ainda sendo considerado o principal mecanismo de transmissão em países não endêmicos (MORAES-SOUZA, FERREIRA-SILVA, 2011). Já a transmissão oral tem sido identificada através de relatos recentes de surtos de infecção pela ingestão de alimentos contaminados como o açaí e caldo de cana, resultando em uma infecção parasitária maciça com altas taxas de mortalidade (PEREIRA et al., 2009; TOSO ; VIAL; GALANTI, 2011).

Outras possibilidades de transmissão, embora menos frequentes, também podem ocorrer, como: transplacentária, por transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; LANA; TAFURI, 2005).

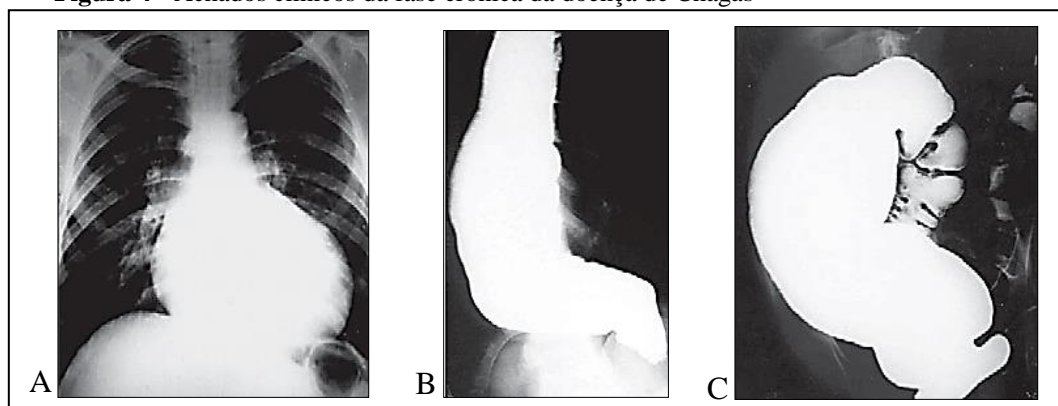
### 1.3 Aspectos clínicos da doença

A tripanossomíase americana apresenta duas fases bem características e distintas: aguda e crônica. A fase aguda se inicia logo após a infecção, com manifestações clínicas surgindo após 6 a 10 dias e com duração de 4 a 8 semanas. No local da picada do inseto, desenvolve-se um edema que caracteriza um sinal típico da infecção: o sinal de Romaña, quando a picada ocorre na mucosa conjuntiva, causando um edema bi-palpebral e unilateral; e o chagoma de inoculação, quando ocorre em qualquer outra região da pele, resultando em

lesões cutâneas eritematosas e endurecidas (RASSI et al., 2010). Além do mais, a doença pode apresentar uma sintomatologia atenuada e com traços típicos de outras enfermidades, como cefaleia, mal-estar, anemia, anorexia, astenia e hipóxia. Porém, na maioria das vezes a fase aguda é oligossintomática, apresentando febre e uma reduzida resposta celular a antígenos de *T. cruzi*. A sintomatologia manifesta-se geralmente em indivíduos jovens, sobretudo nos primeiros anos de vida, podendo ser observadas sérias complicações neurológicas (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2005; REY, 2002).

Na ausência de um tratamento adequado, a mortalidade ocorre em cerca de 5 – 10% dos casos sintomáticos devido a uma miocardite ou meningoencefalite grave (PINTO et al., 2009). Cerca de 60 - 70% dos pacientes infectados podem evoluir para uma fase crônica indeterminada da doença caracterizada por ausência de sintomatologia, com eletrocardiograma e exames radiológicos normais, embora uma positividade para exames sorológicos seja identificada. Cerca de 30 – 40% dos pacientes infectados com *T. cruzi* que não receberam tratamento adequado desenvolvem a fase crônica determinada, que se caracteriza por lesões irreversíveis que podem aparecer até 30 anos pós-infecção em órgãos como o coração, cólon e esôfago (COURA; CASTRO, 2002; PRATA, 2001).

A cardiopatia chagásica, associada a insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo periférico (**Figura 4A**) é a manifestação clínica mais severa e mais frequente da doença de Chagas, acometendo aproximadamente 20-30% dos casos. Em 10% dos casos, os pacientes desenvolvem a forma digestiva, apresentando alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e cólon intestinal (megacólon) (**Figuras 4B e 4C**) que levam a problemas como dificuldade de deglutição, regurgitação e falta de controle muscular no órgão afetado. A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; LANA; TAFURI, 2005; MACHADO et al., 2012).

**Figura 4** - Achados clínicos da fase crônica da doença de Chagas

**Fonte:** Adaptado de Rassi Jr. et al. (2010).

**Legenda:** (A) Cardiopatia Chagásica (B) Esôfago hipertrofiado (C) Hipertrofia no cólon intestinal.

Em cada fase da infecção, a resposta imune específica, celular e/ou humoral, reduz a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo. Entretanto quando essa resposta é exacerbada, acaba sendo responsável por muitas das manifestações clínicas observadas. (BRODSKYN; BARRAL-NETTO, 2000).

#### 1.4 Diagnóstico

O grande desafio no diagnóstico da doença de Chagas está no desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido com alta sensibilidade, especificidade e estabilidade para o trabalho em campo e para os bancos de sangue, nas diferentes áreas geográficas onde se encontram diferentes cepas e clones (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012)

O diagnóstico da doença de Chagas deve ser apoiado pela epidemiologia e clínica e confirmado através dos exames laboratoriais, sendo estes realizados por meio da busca do parasito ou pela presença de anticorpos no soro, de acordo com a fase de infecção. Durante a fase aguda da doença, o diagnóstico é baseado na detecção do parasito no sangue, através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, quando a pesquisa é realizada durante a fase crônica, a ausência de parasitemia compromete os testes parasitológicos diretos, sendo utilizados testes sorológicos como a imunofluorescência indireta, hemoaglutinação indireta e reações imunoenzimáticas (ELISA). Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico ou hemocultura) podem ser realizados, porém apresentam baixa sensibilidade (20 - 50%). Testes moleculares como a reação de cadeia da polimerase (PCR) têm demonstrando elevada sensibilidade para as duas formas clínicas,

tornando-se uma alternativa ao diagnóstico laboratorial (LANA; TAFURI, 2005; LESCURE, 2010). Um aspecto importante apontado por Luquetti e Schmunis (2010) é que qualquer que seja o método sorológico utilizado, sua análise deve ser criteriosa, uma vez que anticorpos demandam diferentes tempos para desaparecer de acordo com a fase da doença e a cepa de *T. cruzi* envolvida na patologia (COURA JR.; BORGES-PEREIRA, 2012). Além do mais, tem sido demonstrado que os kits baseados em hemaglutinação variam sua sensibilidade de acordo com a origem da sua produção, necessitando desta forma de um segundo método confirmatório. Alguns testes utilizam proteínas recombinantes de alta sensibilidade e especificidade, como por exemplo, o kit EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos que utiliza a mistura de dois antígenos, derivados do citoplasma das formas epimastigotas e amastigotas (CRA) e do sistema flagelar de formas tripomastigotas e epimastigotas (FRA) do *T. cruzi* (KRIEGER et al, 1992). Esses antígenos vêm sendo utilizados com sucesso no imunodiagnóstico da doença de chagas, sendo também capazes de induzir resposta humoral e celular em camundongos, bem como estimular a produção de citocinas. Estudos têm demonstrado que estes antígenos podem também ser utilizados como marcadores da evolução da cardiopatia chagásica, em especial na fase indeterminada da doença (PEREIRA et al., 2005; VERÇOSA et al. 2007).

### 1.5 *Trypanosoma cruzi*

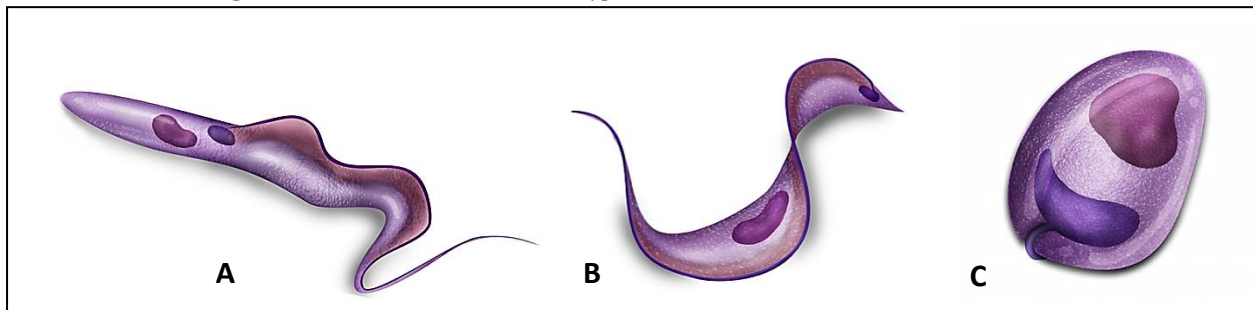
O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, subordem *Trypanosomatina* e família *Trypanosomatidae*. Nesta ordem, enquadram-se organismos uniflagelados ou biflagelados que apresentam uma única mitocôndria, com seu material genético restrito a uma estrutura denominada cinetoplasto (ANDRADE; ANDRADE, 1996).

Por apresentar um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados, este protozoário assume diferentes estágios evolutivos com características morfológicas e físico-químicas distintas (MAYA et al., 2007). A identificação de cada uma destas formas baseia-se em algumas dessas características como a posição do flagelo, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, sua morfologia geral e a localização nos hospedeiros vertebrados ou invertebrados. Com base nesses critérios, as principais formas



evolutivas do *T. cruzi* são: epimastigota, tripomastigota e amastigota (**Figura 5**) (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000).

**Figura 5** – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



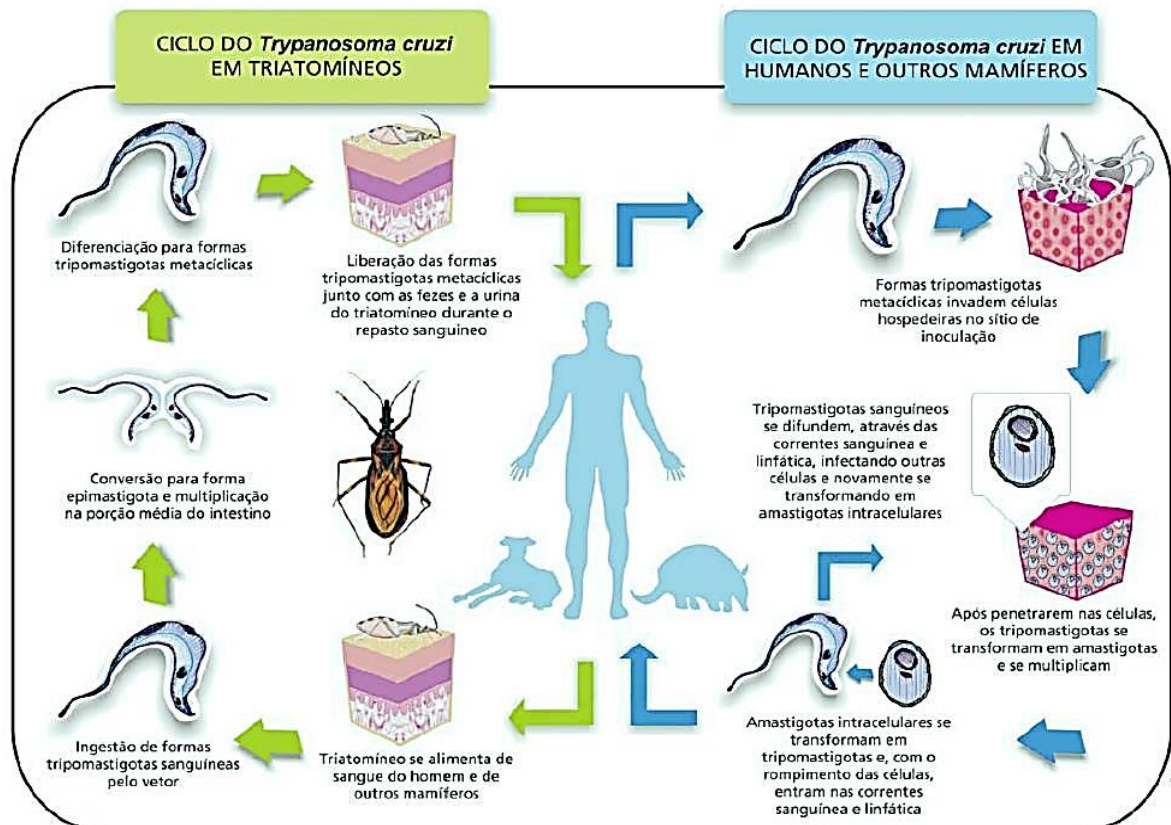
**Fonte:** Eschenazi (2009)

**Legenda:** (A) Epimastigota (B) Tripomastigota (C) Amastigota

As formas epimastigotas (**Figura 5A**) apresentam um corpo fusiforme, com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, um flagelo livre e um cinetoplasto em forma de bastão, localizado anterior ao núcleo e próximo a bolsa flagelar. São formas não infectivas, replicativas, encontradas no tubo digestivo dos insetos triatomíneos e em culturas axênicas. As formas tripomastigotas (**Figura 5B**) constituem as formas infectivas do parasita. São formas alongadas, levemente achatadas, medindo aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de comprimento, com um cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo, com flagelo emergindo da região posterior aderindo-se a membrana plasmática, tornando-se livre na região anterior. Estas formas não são capazes de se multiplicar, sendo encontradas no sangue dos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneas) e no intestino posterior do triatomíneo (tripomastigotas metacíclicas). As formas amastigotas (**Figura 5C**) são células arredondadas, com aproximadamente 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sem um flagelo aparente e um cinetoplasto em forma de bastão na região anterior ao núcleo. São formas intracelulares, multiplicativas, encontradas no interior de células do hospedeiro vertebrado, como macrófagos, células do tecido digestivo ou células musculares cardíacas (DE SOUZA, 2002a). Formas com morfologias intermediárias podem ser encontradas durante os processos de diferenciação tanto no tubo digestivo do inseto quanto intracelularmente (TYLER; ENGMAN, 2001).

O ciclo de vida do parasita (**Figura 6**) tem início quando o inseto vetor, durante seu repasto sanguíneo, se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, a grande maioria das formas tripomastigotas são lisadas por enzimas digestivas presentes no tubo digestivo do inseto, com

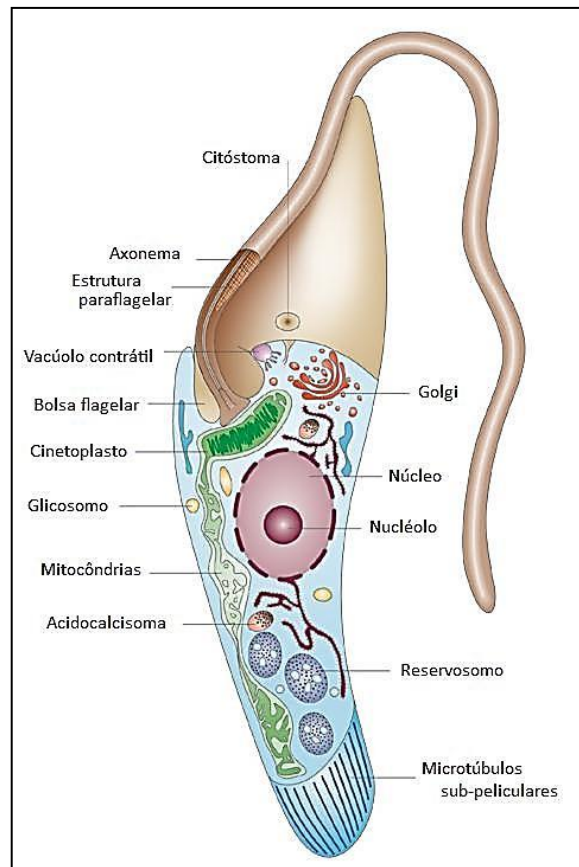
as sobreviventes se diferenciando em formas epimastigotas (CASTRO et al., 2007). Estas últimas por sua vez, migram para a porção média do intestino do inseto, onde se dividem intensamente por divisão binária, podendo aderir à membrana intestinal do triatomíneo denominada membrana perimicrovilar (ALVES et al., 2007). Posteriormente, os protozoários se desprendem da membrana intestinal e movem-se para a porção terminal do intestino (ampola retal) e no reto, iniciando o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicas, as quais serão eliminadas juntamente com as fezes durante o repasto sanguíneo no mamífero (RASSI Jr. et al., 2010). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram na mucosa ou pele lesionada e invadem as células no local da inoculação. Após a internalização, se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. Depois de diversos ciclos de multiplicação, os parasitas se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas, rompendo a célula hospedeira e indo para a corrente sanguínea, onde podem infectar novas células ou serem ingeridas por outro inseto reiniciando o ciclo (MUÑOZ-SARAIVA et al., 2010; RASSI Jr. et al., 2010). Um ciclo alternativo pode ser observado, quando células hospedeiras infectadas se rompem precocemente liberando formas amastigotas as quais possuem também potencial para infectar outras células (TYLER; ENGMAN, 2001).

Figura 6 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Ribeiro, 2011

## 1.6 Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário amplamente estudado no que se refere a sua biologia celular, visto que além de possuir organelas comuns a células eucarióticas, como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo, este protozoário apresenta algumas estruturas citoplasmáticas e organelas específicas, como o cinetoplasto, reservossomos, acidocalcissomas e glicosossomos (Figura 7). Estas estruturas são de grande importância para a terapêutica da doença, pois através de suas vias metabólicas únicas, surgem possibilidades para a identificação de alvos não presentes na célula hospedeira (DE SOUZA, 2008). Algumas destas organelas serão descritas com maiores detalhes a seguir.

**Figura 7** – Representação da estrutura interna da forma epimastigota de *T. cruzi*.

**Fonte:** Modificado de Docampo et al. (2005)

### 1.6.1 Superfície celular

Do ponto de vista morfológico, a superfície celular do *Trypanosoma cruzi* é composta basicamente por três estruturas principais: a membrana plasmática, o glicocálice e o citoesqueleto. Como em todas as células, a membrana plasmática separa o ambiente extracelular e o intracelular de forma seletiva, e é composta por uma bicamada lipídica constituída por diferentes lipídeos e proteínas, como mucinas, glicoproteínas, dentre outras. Através da superfície, o parasita se adere às células epiteliais do intestino dos triatomíneos permitindo sua diferenciação como descrito no seu ciclo biológico (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

O glicocálice, localizado na face externa da membrana plasmática, é constituído por carboidratos associados a proteínas periféricas ou integrais e lipídeos, sendo fundamentais na interação parasito/hospedeiro. Dependendo do estágio evolutivo em que o parasita se encontra, este revestimento torna-se mais evidente ou não, apresentando-se mais denso nas

formas tripomastigotas do que nas demais formas evolutivas, sendo as formas epimastigotas intermediárias neste aspecto (DE SOUZA, 2008).

O *T. cruzi* apresenta um citoesqueleto composto basicamente por um arranjo microtubular, localizado logo abaixo da membrana plasmática e por todo o corpo do parasita, denominado microtúbulos subpeliculares. Esta estrutura estabelece ligações entre si e com a membrana conferindo uma maior rigidez e estabilidade à célula, sendo esta interação tão forte, que mesmo depois da lise do parasita estes componentes permanecem associados (DE SOUZA, 2002a, 2009). Conexões com componentes da via endocítica e com cisternas periféricas do retículo endoplasmático também são observadas (SOUTO-PADRON; DE SOUZA; HEUSER, 1984).

As formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi* desenvolveram uma estrutura altamente especializada na sua superfície celular denominada complexo citóstoma-citofaringe. Esta estrutura é constituída por uma invaginação da membrana plasmática, que penetra profundamente no citoplasma. Sua abertura denominada citóstoma, se localiza próxima a bolsa flagelar e é acompanhada por numerosas vesículas desempenhando um importante papel na nutrição do protozoário (DE SOUZA, 2002b; FIGUEIREDO; ROSA; SOARES., 2000; OKUDA et al., 1999).

### 1.6.2 Bolsa flagelar e Flagelo

Para a obtenção de nutrientes, os tripanossomatídeos apresentam além do citóstoma, uma estrutura especializada denominada bolsa flagelar (PORTO-CARREIRO et al., 2000). Esta organela constitui um compartimento isolado do meio extracelular formada a partir de uma invaginação da membrana plasmática onde se dá a inserção do flagelo (LANDFEAR; IGNATUSHCHENKO, 2001). Diversas evidências mostram que a bolsa flagelar é uma região altamente especializada, como a ausência de microtúbulos subpeliculares e por diferir da membrana do flagelo e do corpo celular quanto a distribuição de partículas intramembranas e a localização de algumas proteínas. Além disso, aspectos morfológicos e citoquímicos mostram que a bolsa flagelar é uma região de intensa atividade endocítica e exocítica (DE SOUZA, 2002b; FIGUEIREDO et al., 2004).

Da mesma invaginação da membrana plasmática onde se forma a bolsa flagelar, emerge o flagelo, o qual está envolvido em processos como mobilidade celular e adesão do parasita à superfície da célula dos hospedeiros. Formado por nove pares de microtúbulos periféricos, um par de microtúbulos central e uma estrutura paraxial composta por uma rede

de filamentos, o flagelo está presente em todas as formas evolutivas do protozoário, sempre associado ao corpúsculo basal e ao cinetoplasto, sendo menos evidente nas formas amastigotas (DE SOUZA, 2009).

### 1.6.3 Mitocôndria e Cinetoplasto

Assim como todos os membros da família *Trypanosomatidae*, o *T. cruzi* apresenta uma mitocôndria única, ramificada por todo o corpo do protozoário, com funções e estrutura análogas a das células eucarióticas. Dependendo do ambiente em que se encontra e das fontes nutricionais disponíveis, esta organela pode ocupar até 12% do volume celular, sendo distribuída principalmente em ramificações abaixo da rede de microtúbulos subpelículas. A mitocôndria do *T. cruzi* possui um DNA mitocondrial próprio (kDNA), representando cerca de 30% do DNA total do protozoário e que se organiza em uma estrutura compacta denominada cinetoplasto (FIDALGO; GILLE, 2011).

No cinetoplasto, o kDNA é organizado de forma bastante singular em maxicírculos e minicírculos associado a proteínas denominadas histonas-h1, responsáveis pela condensação do material genético. Os maxicírculos possuem funções análogas ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, codificando o RNA ribossomal e proteínas envolvidas na respiração celular. Já os minicírculos codificam RNAs envolvido na especificidade do RNA mensageiro (DE SOUZA, 2008; GLUENZ; SHAW; GULL, 2007).

Estudos têm demonstrado que a mitocôndria do *Trypanosoma cruzi* desempenha um papel central na morte celular do protozoário através da liberação de fatores pró-apoptóticos dentro do citosol. Além disso, as espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas desta organela têm sido associadas à fase inicial do processo de apoptose em tripanossomatídeos (BELTRAN et al., 2000).

### 1.6.4 Reservossomos

Encontrada apenas nas formas epimastigotas do *T. cruzi*, os reservossomos são organelas responsáveis por armazenar macromoléculas ingeridas pelo protozoário. De maneira geral, esta organela apresenta um formato esférico, com aproximadamente 0.7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, delimitada por uma unidade de membrana e localizada na porção posterior do parasita (DE SOUZA, 2002a). Além de apresentar uma matriz rica em proteínas e várias inclusões eletrônicas, os reservossomos armazenam a cruzipaina (principal cisteína

proteínase encontrada no *T. cruzi*), que associado ao valor de pH 6.0 encontrado nesta organela, sugerem uma natureza pré-lisossomal para esta estrutura (CUNHA-E-SILVA et al., 2006).

Durante o processo de transformação de epimastigotas para tripomastigotas se observa o desaparecimento dos reservossomos, indicando que o conteúdo armazenado nestas estruturas possa ser utilizado como fonte de energia durante o processo de diferenciação (FIGUEIREDO et al., 2004). Na ausência dos reservossomos, as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* desenvolvem uma estrutura que se relaciona com os lisossomos, denominada LRO (lysosomal-related organelles), responsáveis pelo acúmulo de cruzipaina, e incapazes de armazenar macromoléculas externas (SANT'ANNA et al., 2008).

#### 1.6.5 Acidocalcisomas

Os acidocalcisomas são estruturas esféricas, distribuídas por todo o corpo do parasita e com diâmetro de 0.2 – 0.6  $\mu\text{m}$ , contendo em seu interior uma matriz eletróluscente, e com visualização de depósitos elétrondensos denominados de grânulos de volutina ou polifostato. Estas organelas ácidas, encontradas em maior número nas formas amastigotas, estão envolvidas principalmente na reserva de íons tais como: o cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e de compostos fosfatados, além de desempenhar um papel na regulação do pH intracelular e na osmorregulação em associação com o vacúolo contrátil (DOCAMPO et al., 2005; MIRANDA et al., 2000, 2004; MORENO; DOCAMPO, 2009).

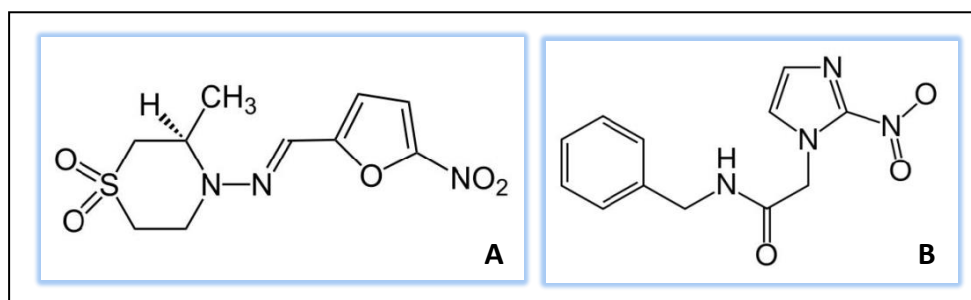
#### 1.6.6 Glicossomos

Os glicossomos são estruturas globulares ou alongadas, com aproximadamente 0.2 – 0.3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, envoltas por uma unidade de membrana e uma matriz homogênea e fracamente densa, distribuídos por todo corpo celular (DE SOUZA, 2009). Esta organela recebeu esta denominação pois a maioria dos processos glicolíticos ocorrem nesta estrutura. No entanto, outros processos bioquímicos, como a fixação do dióxido de carbono, biossíntese de novo de pirimidinas, biossíntese de isoprenóides e esterol, dentre outros, estão presentes nesta estrutura (MICHAELS et al., 2006). Ao contrário da mitocôndria, os glicossomos não apresentam material genético, sendo todas as suas proteínas, codificadas por genes nucleares (DE SOUZA, 2008).

## 1.7 Quimioterapia da Doença de Chagas

Embora todo o ciclo da doença tenha sido descrito entre 1909 a 1935, não houve um grande avanço no que se refere a terapêutica para a tripanossomíase americana. Desde 1912, vários compostos foram utilizados para o tratamento da doença de Chagas, no qual se destacavam os derivados arsenicais de quinonas, amins, sulfas e antibióticos. Apenas em 1952, quando Packachanian et al. relataram o caráter promissor dos compostos nitrofuranos no tratamento da infecção com *T. cruzi*, que novos estudos foram realizados surgindo anos depois os compostos utilizados até hoje no tratamento, o Nifurtimox e o Benznidazol (**Figura 8**) (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

**Figura 8** – Estrutura química dos compostos utilizados na quimioterapia da Doença de Chagas



**Fonte:** Oliveira et al. (2003)

**Legenda:** (A) Nifurtimox (B) Benznidazol

Lançado em 1967, o Nifurtimox (3-Metil-4[(5-nitrofurfurilideno) amino] tiomorfolina-1-1-dióxido) (Lampit<sup>®</sup>) é um composto nitroheterocíclico, derivado do nitrofurano, que atua na geração de radicais livres, através da geração de um radical nitro, seguido por um ciclo redox que produz espécies reativas de oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O *T. cruzi* por ser deficiente em mecanismos de detoxificação para os metabólitos do oxigênio, se torna mais sensível ao estresse em comparação às células do hospedeiro (BERNARDES et al., 2006; DOCAMPO; STOPPANI, 1980). A partir da década de 80, o Nifurtimox deixou de ser adotado como tratamento para a doença de Chagas no Brasil devido a sua eficácia questionável e aos diversos efeitos colaterais causados, sendo interrompido nos anos seguintes em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile e Argentina) (COURA; DE CASTRO, 2002).

Desenvolvido por Wineholt e Liebman em 1972 e produzido pelo laboratório Hoffman - La Roche na Suíça, o Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazole-1-acetamida) (Rochagan<sup>®</sup>) é atualmente a única droga de escolha para o tratamento da doença de Chagas. Este composto nitroheterocíclico atua através da redução de metabólitos, resultando em modificações



covalentes das macromoléculas (URBINA; DOCAMPO, 2003). Alguns estudos relatam que o benznidazol inibe o crescimento do parasito, através da inibição de enzima NADH-fumarato redutase (TURRENS et al., 1996), além de aumentar a fagocitose e a lise do protozoário através de um mecanismo dependente de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (REVELLI et al., 1999; ROMANHA et al., 2002). Em abril de 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação deste quimioterápico foram cedidos ao Brasil pela Roche<sup>®</sup> sendo produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), ganhando o reconhecimento da Organização das Nações Unidas (ONU) por ser o único produtor mundial do benznidazol tanto na fórmula adulta quanto na pediátrica. (SCHOFFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006).

Os esquemas terapêuticos do Benznidazol e Nifurtimox variam de acordo com a idade do paciente. Para o benznidazol o tratamento para adultos consiste em 5 – 7,5mg/kg/dia durante 60 dias, e para as crianças maiores de 12 anos uma dose inferior a 10mg/kg/dia por administração oral, com acompanhamento intensivo dos pacientes para o monitoramento dos efeitos colaterais (BERN, 2011; CASTRO; DE MECCA; BARTEL, 2006).

Apesar de serem utilizadas até hoje no tratamento da doença, estes quimioterápicos estão longe de serem satisfatórios. Apresentam uma boa atividade durante a fase aguda da doença, com chances de cura de 70 a 80%, entretanto na fase crônica, onde se encontram os maiores índices de infectados, não apresentam uma boa eficácia, com probabilidade de cura de 10 a 20%. Além do longo período de tratamento e relato de cepas resistentes aos compostos, os medicamentos apresentam severos efeitos colaterais, tais como anorexia, náuseas, dermatites, leucopenia, distúrbios neurológicos dentre outros (**Tabela 1**) (BERN, 2011; COURA; DIAS, 2009).

**Tabela 1** – Frequência dos efeitos colaterais associados ao Benznidazol e Nifurtimox em adultos

Efeitos colaterais	% de pacientes	Efeitos colaterais	% de pacientes
Benznidazol		Nifurtimox	
Dermatite alérgica *	29 - 50	Anorexia e perda de peso	50 - 75
Parestesia	0 - 30	Náusea	15 - 50
Neuropatia periférica **	0 - 30	Vômitos	15 - 26
Anorexia e perda de peso	5 - 40	Desconforto abdominal	12 - 40
Náusea, vômitos ou ambos	0 - 5	Cefaleia	13 - 70
Leucopenia ***	< 1	Vertigem	12 - 33
Trombocitopenia ***	< 1	Mudanças de humor	10 - 49
		Insônia	10 - 54
		Mialgia	13 - 30
		Neuropatia periférica **	2 - 5
		Perda de memória a curto-prazo	6 - 14
		Leucopenia ***	< 1
<b>Abandono de tratamento devido aos efeitos</b>	<b>7 - 13</b>	<b>Abandono de tratamento devido aos efeitos</b>	<b>6 - 40</b>

**Fonte:** Bern (2011).

**Nota:** \* - Efeito não dose-dependente, o tratamento deve ser abandonado se a dermatite for severa, esfoliativa ou associada a febre. Casos de síndrome de Stevens-Johnson foram reportados \*\* - Efeito dose-dependente (sendo necessário o abandono do tratamento), contudo é reversível \*\*\* - Necessário o abandono do tratamento.

### 1.6.1 Perspectivas de novos fármacos

Por apresentar um caráter endêmico em países subdesenvolvidos, a doença de Chagas tem sido negligenciada pela indústria farmacêutica e sofrido anos de estagnação em pesquisa e desenvolvimento de novos quimioterápicos, contudo o interesse no estudo e na prospecção de novos quimioterápicos têm crescido. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, um quimioterápico ideal para o tratamento da doença de Chagas deve seguir alguns preceitos, como: (a) acessibilidade aos pacientes, graças a um custo reduzido, (b) cura parasitológica de casos agudos e crônicos, (c) ação eficaz com uma única dose ou em poucas doses, (d) ausência de efeitos colaterais, (e) não ter a necessidade de hospitalização e (f) não induzir resistência (CLAYTON, 2010; COURA; DE CASTRO, 2002). Seguindo estes critérios, diversos grupos de pesquisa vêm testando produtos naturais ou sintéticos que tenham similaridade com os compostos utilizados para outras doenças, utilizados na medicina popular, ou através da determinação de alvos específicos em vias metabólicas do *T. cruzi* (APT; ZULANTAY, 2011; BORGES et al., 2012; IZUMI et al., 2011; URBINA; DOCAMPO, 2003).

Entre os alvos relacionados a enzimas e vias metabólicas importantes, destaca-se a via de biossíntese de esteróis do *T. cruzi*, necessárias para a manutenção da integridade da

membrana plasmática, e conseqüente viabilidade do protozoário (RODRIGUES et al., 2001). Drogas antifúngicas como o cetoconazol, posoconazol, fluconazol, miconazol, econazol vêm sendo testadas quanto a sua atividade tripanocida, relacionando-se a este alvo e induzindo a cura parasitológica em ratos com infecção aguda e crônica (OLIVIEIRE et al., 2010; URBINA, 2002, 2010).

A cruzipaina, uma cisteína protease responsável pelas principais atividades proteolíticas durante o ciclo de vida do parasito, tem sido considerada um alvo promissor, pois desempenha um papel importante na interação parasito/hospedeiro (URBINA; DOCAMPO, 2003). Entre os compostos testados contra esta enzima, o composto K777 tem demonstrado uma atividade bastante expressiva e já se encontra em estudos pré-clínicos. Este composto se mostrou efetivo quando administrado intraperitonealmente em camundongos infectados com *T. cruzi*, sem apresentar toxicidade aparente, além de se mostrar efetivo contra várias cepas do protozoário (BRAK et al., 2010; McKERROW et al., 2009).

Outros processos bioquímicos relacionados ao *Trypanosoma cruzi* têm sido identificado em estudos como possíveis alvos terapêuticos, entre os quais pode-se destacar a biossíntese de RNA mensageiro, a biossíntese de lipídeos e enzimas envolvidas no metabolismo energético do parasita, como a tripanotiona redutase, DNA topoisomerase, dihidrofolate redutase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfatidilinositol-3 quinase, dentre outros (DIAS et al., 2009).

Como já mencionado, os tripanossomatídeos possuem uma organela especializada no armazenamento de cátions e polifosfato, chamadas de acidocalcisomas. Os polifosfatos inorgânicos são compostos encontrados nestas organelas que possuem maior energia entre os compostos fosfatados nos tripanossomatídeos, sendo indispensáveis para a sobrevivência do parasita. Compostos análogos do pirofosfato, tais como pamidronato, alendronato e risedronato acumulam-se nos acidocalcisomas do parasito e podem inibir as enzimas envolvidas nas reações dos pirofosfatos orgânico e inorgânico, como a farnesilpirofosfato sintase e farnesil transferase. Tais drogas, utilizadas atualmente para o tratamento de disfunção da reabsorção óssea, apresentaram atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas, além de eliminar a parasitemia e as formas amastigotas durante a fase aguda da infecção em camundongos (ESTEVA et al., 2005; GARZONI et al., 2004).

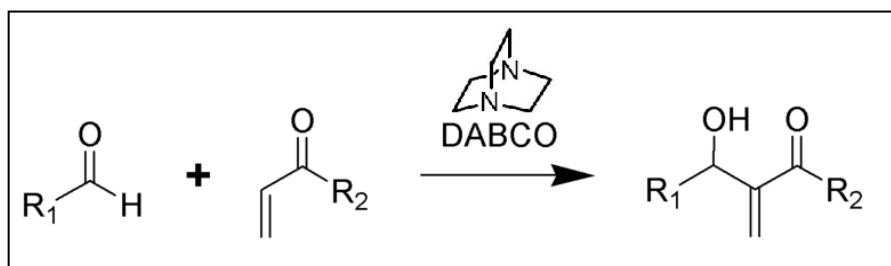
## 1.8 Reação Morita-Baylis-Hillman

A síntese orgânica é uma das mais bem sucedidas e úteis disciplinas da ciência para obtenção de novos quimioterápicos e basicamente envolve a construção de ligações carbono-carbono (C-C) e carbono-heteroátomo e a quebra dessas ligações (BASAVIAH; RAO; REDDY, 2007). Devido a este caráter fundamental, diversas reações de ligação carbono-carbono têm sido desenvolvidas e suas aplicações largamente estudadas durante as décadas, as quais podemos citar a reação de Fiedel Crafts, a reação de Grinard, a reação de Diels-Alder e principalmente a reação Morita-Baylis-Hillman (BASAVIAH et al., 2010).

Descrita pela primeira vez por Morita et al. em 1968, como uma reação de adição de vários aldeídos e acrilatos sobre a influência de fosfinas terciárias (tríciclo-hexil-fosfina) como catalisador, a reação Morita-Baylis-Hillman (MBHR) só se tornou mais notória após Baylis e Hillman, em sua patente alemã, reportarem o acoplamento de vários alcenos a aldeídos produzindo moléculas polifuncionais. Diferente de Morita, Baylis e Hillman utilizaram aminas terciárias como catalisador, devido ao seu baixo custo, seu fácil manuseio, menor toxicidade e por serem mais facilmente removíveis do meio reacional (BASAVIAH; VEERARAGHAVIAH, 2012).

A atenção acadêmica a esta reação passou a crescer gradativamente após o início da década de 80, quando se deu o primeiro relato de utilização efetiva de um aduto Morita-Baylis-Hillman em síntese. Alguns trabalhos demonstram o uso da MBHR no preparo de moléculas comercialmente úteis, como o Captopril e derivados do Cloranfenicol, um anti-hipertensivo e um antibiótico, respectivamente (FELTRIN; ALMEIDA, 2003; MATEUS; COELHO, 2005).

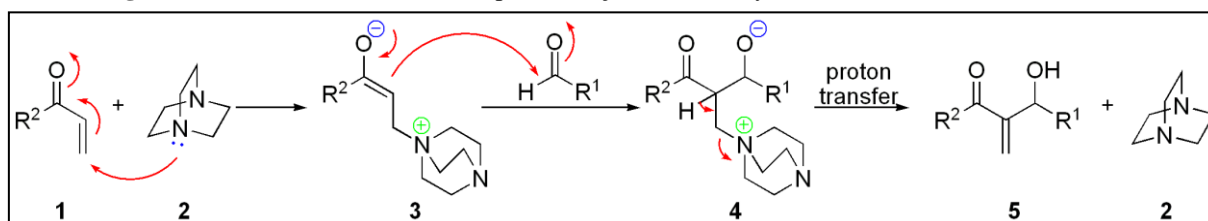
Atualmente, podemos definir a reação Morita-Baylis-Hillman como uma metodologia sintética que consiste basicamente na condensação de aldeídos ou cetonas a alcenos ligados a um grupo retirador de elétrons (GRE), em presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico, como por exemplo o 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) (mais comumente utilizado), Indolizina ou Quinuclidina, levando a formação de novas moléculas denominadas de adutos de Morita-Baylis-Hillman (**Figura 9**). Quando a condensação ocorre entre alcenos contendo o GRE e iminas (produtos da condensação do amoníaco ou de uma amina primária com uma cetona ou um aldeído) a reação é denominada aza-Morita-Baylis-Hillman (BASAVIAH; RAO; REDDY, 2007).

**Figura 9** - Reação Morita-Baylis-Hillman

**Fonte:** Modificado de Coelho; Almeida (2000).

**Legenda:** R1 = Aldeídos, cetonas ou iminas; R2 = CO<sub>2</sub>R, CN, CHO, COR, SO<sub>2</sub>R, CONR<sub>2</sub> (Grupos retiradores de elétrons)

Sugerido por Hoffmann e Rabe em 1983 e posteriormente sustentado por estudos de cinética envolvendo variações de temperatura e pressão (HILLS; ISAACS, 1990), o mecanismo mais comumente aceito para a reação Morita-Baylis-Hillman envolve quatro etapas (**Figura 10**). Na primeira etapa, ocorre uma adição do catalisador ao sistema  $\alpha,\beta$  – insaturado, gerando um intermediário *zwitterion*. Em seguida, ocorre a condensação aldólica entre o intermediário e o aldeído, formando um novo intermediário cetoácido. Através de uma transferência de prótons ocorre a formação de um intermediário enolato, que por sua vez é decomposto, levando a formação do aduto Morita-Baylis-Hillman e a regeneração do catalisador.

**Figura 10** – Mecanismo mais aceito para a reação Morita-Baylis-Hillman

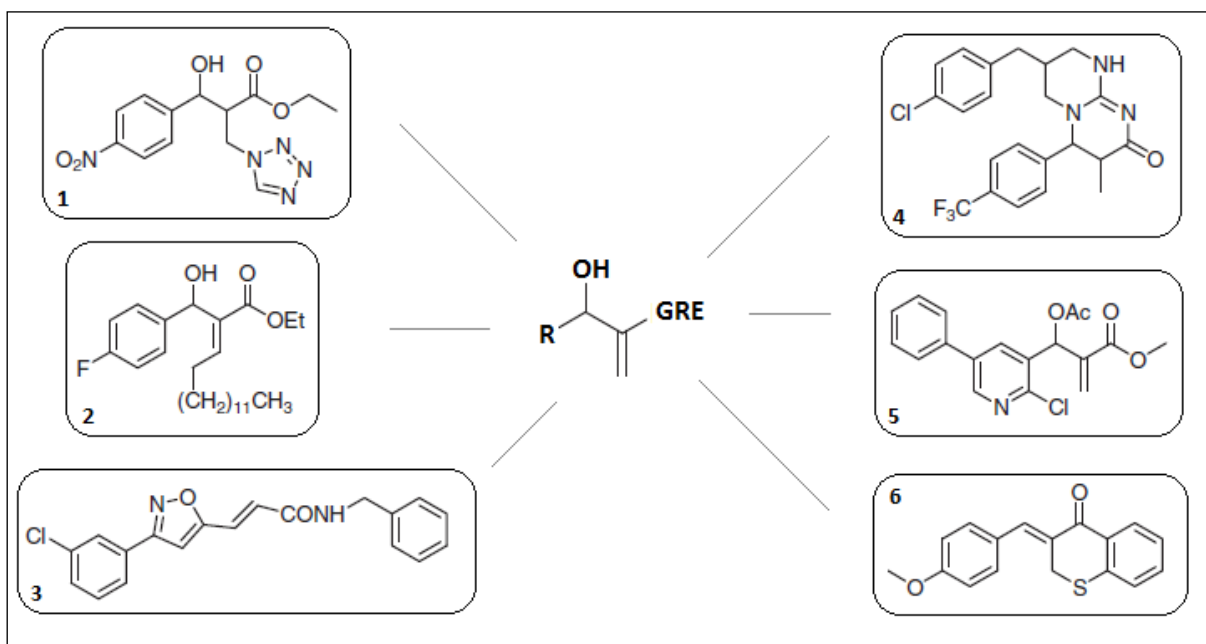
**Fonte:** Coelho; Almeida (2000).

**Legenda:** Adição nucleofílica do DABCO (2) à cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (1). Produção do intermediário *zwitterion* (3). Adição do aldeído eletrofílico e produção do intermediário cetoácido (4). Prototropismo intramolecular com decomposição do intermediário levando a regeneração do catalisador (2) e produção o aduto (5).

Diversas características evidenciam a vantagem de se utilizar a reação Morita-Baylis-Hillman como método sintético, tais como: a completa economia dos átomos, isto é, todos os átomos do reagente estão incorporados ao aduto; a não produção de co-produtos, o que reduz os custos com processos de separação dos produtos; condições reacionais brandas, podendo ser feita em meio aquoso ou na ausência de solventes; e a possibilidade de fornecer uma variedade de moléculas polifuncionalizadas de grande interesse químico e biológico (BASAVIAH; RAO; REDDY, 2007).

Apenas um inconveniente surge com a utilização deste método sintético, a velocidade de sua reação, sendo relatado na literatura processos com até 65 dias de reação. Contudo diversas pesquisas utilizando outros catalisadores, altas pressões, ultrassom, entre outras metodologias têm sido utilizadas para aumentar a eficiência e a velocidade destas reações (BASAVIAH et al., 2003; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

Desde sua descoberta, diversas moléculas de interesse químico e biológico foram sintetizadas a partir da reação Morita-Baylis-Hillman (**Figura 11**). Entretanto, apenas após três décadas da publicação do trabalho de Morita et al. (1968), estudos relacionados a atividade biológica destes compostos foram realizados. Em 1999, surge o primeiro artigo relatando a atividade dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre os principais causadores da malária, o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei* (KUNDU et al., 1999). Com a descoberta da atividade antimalarial dos adutos, diversos experimentos demonstrando a atividade contra parasitas e vetores de doenças tropicais foram realizados. Os compostos se mostraram ativos contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*, agente causador da esquistossomose (VASCONCELLOS et al., 2006), contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* (AMORIM et al., 2013; SOUZA et al., 2007; BARBOSA et al., 2011) e formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SANDES et al., 2010). Outras atividades atribuídas aos adutos e relatadas em trabalhos científicos são as atividades antineoplásica, hipolipemiante, herbicida, fungicida, antibacteriana e antifúngica (KOHN et al., 2006; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012; SINGH; BHAT, 2011; YU et al., 2006).

**Figura 11** – Compostos preparados a partir de MBHR e suas atividades biológicas

**Fonte:** Modificado de LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS (2012).

**Legenda:** (1 e 2) Atividade antitumoral (3) atividade hipolipemiante (4) atividade leishmanicida (5) atividade antimicrobiana e (6) atividade antifúngica.

Apesar da necessidade de novas alternativas para o tratamento da tripanossomíase americana e do caráter promissor dos compostos aromáticos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman como moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos, estudos sobre sua atividade em tripanosomatídeos parasitas ainda são incipientes. Nesse sentido nosso trabalho avaliou *in vitro* a atividade dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, bem como sua citotoxicidade em células de mamíferos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a atividade biológica de adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito dos adutos sobre o crescimento de formas epimastigotas e sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
- b) Analisar a citotoxicidade e atividade hemolítica dos adutos Morita-Baylis-Hillman, em células de mamíferos;
- c) Avaliar *in vitro* o efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sob a infecção de macrófagos por amastigotas intracelulares de *T. cruzi*;
- d) Avaliar o potencial imunomodulador dos adutos pela a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais tratados;
- e) Analisar possíveis alterações fisiológicas e morfológicas em *T. cruzi*, causados pelos adutos, através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia confocal a laser.

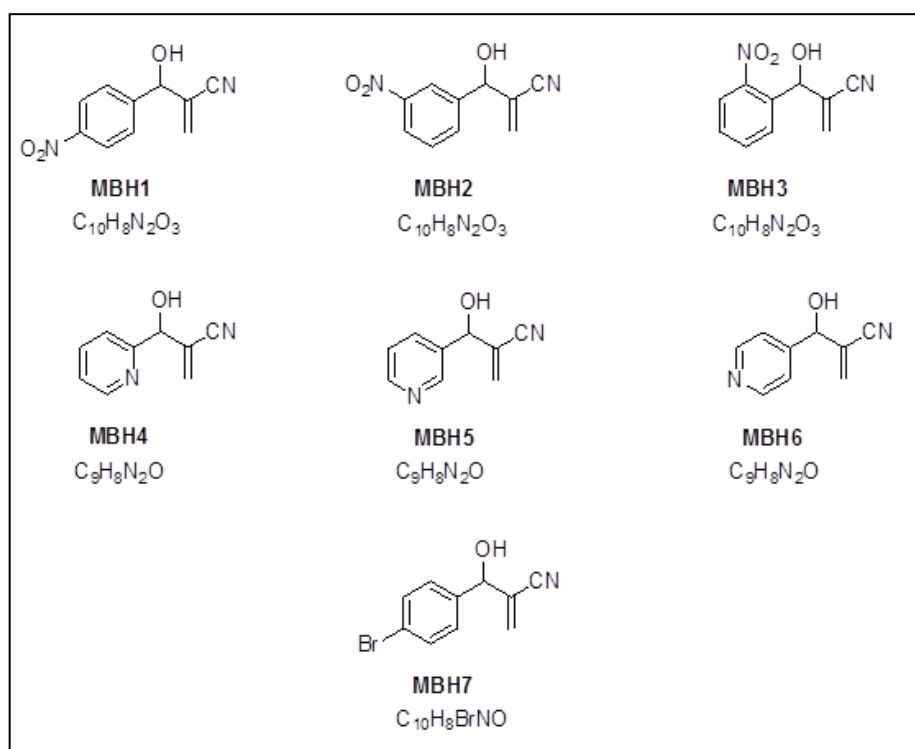


### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Adutos Morita-Baylis-Hillman

Os adutos Morita-Baylis-Hillman (**Figura 12**) foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM/PB), pelo Dr. Mário Luiz Araujo de Almeida Vasconcellos, e caracterizados através de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  em comparação com compostos descritos na literatura. Inicialmente os adutos foram dissolvidos em DMSO à uma concentração de 50 mg/mL e posteriormente dissolvidos em meio de cultivo para obtenção de uma solução de trabalho de 1 mg/mL. Ambas as soluções foram guardadas a  $-20^\circ\text{C}$  e protegidas de luminosidade. As soluções de trabalho por sua vez foram diluídas em meio para os testes na faixa de concentração de 3,125 - 50  $\mu\text{g/mL}$  ou 3,125 - 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram realizados sem o conhecimento prévio das estruturas químicas, utilizando dentre eles o MBH3 como um controle cego.

**Figura 12** – Estrutura química dos adutos Morita-Baylis-Hillman testados



**Fonte:** Cortesia do Dr. Mário Luiz Araujo de Almeida Vasconcellos (UFPB)

**Legenda:** **MBH1:** 2-[Hydroxy(4-Nitrophenyl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 204.05; **MBH2:** 2-[Hydroxy(3-nitrophenyl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 204.05; **MBH3:** 2-[Hydroxy(2-Nitrophenyl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 204.05; **MBH4:** 2-[Hydroxy(Pyridin-2-yl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 160.06; **MBH5:** 2-[Hydroxy(Pyridin-3-yl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 160.06; **MBH6:** 2-[Hydroxy(Pyridin-4-yl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 160.06; **MBH7:** 2-[Hydroxy(4-Bromophenyl)Methyl]Acrylonitrile, P.M. 236.98.

### 3.2 Cultivo dos parasitas

Formas epimastigotas (cepa Dm28c) foram mantidas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB). Para os experimentos foram utilizados parasitas de culturas em fase exponencial de crescimento (3 dias de cultura). Formas tripomastigotas foram obtidas após a infecção de cultura de células Vero de 2 dias ( $\cong 10^5$  células/mL) com uma suspensão de formas tripomastigotas (Cepa Y) concentradas a  $10^6$  células/mL. A cultura foi mantida em meio RPMI-1640 (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) enriquecido com 10% SFB, à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> até que formas tripomastigotas fossem observadas no sobrenadante. Formas amastigotas intracelulares foram obtidas a partir da inoculação de tripomastigotas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB inativado (Sigma-Aldrich, Co. St. Louis, MO, USA) a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3 Atividade tripanocida dos Adutos Morita-Baylis-Hillman

Formas epimastigotas ( $2 \times 10^6$  parasitas/mL) foram incubadas em meio LIT suplementado com 10% de SFB, por 72 horas em placas de 24 poços, na ausência ou presença de diferentes concentrações dos compostos (3,125 – 50 ou 100 µg/mL). O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados através de microscopia óptica e pela contagem direta em câmara de Neubauer. Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% do crescimento das formas epimastigotas) foram determinados após 72 horas de cultivo por análise de regressão linear através do software SPSS 8.0. Cada teste foi realizado em três experimentos independentes em triplicata.

Formas tripomastigotas, mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, foram incubadas na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em placas de 96 poços por 24 horas, na ausência ou presença de diferentes concentrações dos compostos (3,125 – 50 µg/mL). Os valores de LC<sub>50</sub> (concentração que causa perda de viabilidade em 50% das formas tripomastigotas) foram determinados da mesma forma que a IC<sub>50</sub>. Cada teste foi realizado em três experimentos independentes em triplicata.

Para avaliar o efeito dos adutos sobre a forma intracelular do *T. cruzi*, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c mantidos em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) e suplementado com 10% de SFB foram semeados em placas de cultivo de 24 poços ( $6 \times 10^5$  células/mL), contendo uma lamínula de vidro de 13mm, e mantidas em

estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 1 dia de cultivo, as culturas foram lavadas e infectadas com formas tripomastigotas na proporção de 10:1 parasitas/célula. Após 3 horas de interação, a cultura foi lavada e incubada em meio na ausência ou presença de diferentes concentrações dos compostos (2x LC<sub>50</sub>; LC<sub>50</sub>; ½x LC<sub>50</sub>; ¼x LC<sub>50</sub>). Após 48 horas de tratamento, o meio foi retirado e os poços lavados com PBS. Em seguida, os macrófagos foram fixados em solução de Bouin (75% Sol. saturada de ácido pícrico + 20% Formaldeído + 5% Ácido Acético) por 5 minutos, em metanol por 2 minutos e corados por 20 minutos em solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) (3 gotas de Giemsa para cada 2 mL de água destilada). Depois de coradas, as lamínulas foram lavadas em água destilada, deixadas secar e montadas em lâminas com Etellan (Merk KGaA, Darmstadt, ALE). Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% a infecção dos macrófagos por formas amastigotas) foram determinados a partir de observação direta de 300 células infectadas e das amastigotas intracelulares através da microscopia óptica de campo claro. O índice de sobrevivência foi determinado em porcentagem, multiplicando o número de amastigotas pelo número de células infectadas. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle.

### **3.4 Avaliação da citotoxicidade sobre células de mamíferos e atividade hemolítica dos adutos Morita-Baylis-Hillman**

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, foi utilizado o teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), de acordo com o protocolo estabelecido por Mosmann (1983). Esta técnica tem como princípio a redução do MTT por redutases mitocondriais em células metabolicamente ativas, com a formação de cristais azulados (denominados cristais de formazan) que serão solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e analisados espectrofotometricamente.

Células Vero (10<sup>5</sup> células/mL) e macrófagos peritoneais (10<sup>6</sup> células/mL) foram aderidas em placas de 96 poços contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativo e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações (3,125 – 50 µg/mL) dos adutos Morita-Baylis-Hillman por 48 horas. Após este período, o meio foi retirado e adicionado 100µl de meio RPMI sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) suplementando com 10% de SFB e 10µl de MTT (5mg/mL), incubando em estufa de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, na ausência de luz. Após 3 horas, a solução MTT-RMPI foi retirada e 100µl de DMSO foi adicionado para solubilizar o precipitado. A absorbância de cada poço foi medida

espectrofotometricamente a 595nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Poços contendo apenas os compostos e o MTT foram utilizados como branco. A concentração capaz de causar um efeito citotóxico em 50% das células foi estimada por análise de regressão logarítmica dos valores encontrados, no software SPSS 8.0. A partir da CC<sub>50</sub>, foram determinados os índices de seletividade (ISe) dos compostos, através da razão entre a CC<sub>50</sub> e LC<sub>50</sub> de formas tripomastigotas ou IC<sub>50</sub> de formas amastigotas, o qual nos informa o quanto um composto é tóxico para o parasita em relação as células do hospedeiro.

Adicionalmente analisamos o potencial dos adutos Morita-Baylis-Hillman em causar a lise em hemácias humanas de acordo com Valdez et al. (2009). Brevemente, hemácias humanas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 10mM) a 2% e incubadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações dos adutos Morita-Baylis-Hillman (6.25 - 100 µg/mL). Após 3 horas de incubação a 37° C sob agitação constante, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 4min e a absorbância do sobrenadante medida a 540nm para estimar a hemólise. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% foi utilizado como controle positivo e a suspensão apenas em solução salina como controle negativo. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise através da equação:

$$\text{Atividade Hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Absorbância do Tratado} - \text{Absorbância do Controle Negativo})}{(\text{Absorbância do Controle Positivo} - \text{Absorbância do Controle Negativo})} \times 100$$

### 3.5 Produção de óxido nítrico

Para analisar o possível efeito dos diferentes compostos na produção de óxido nítrico, o sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais controle ou tratados com os adutos Morita-Baylis-Hillman foram testados através do método de quantificação de nitrito pelo reagente de Griess (1% Sulfanilamida/ 0.1% Cloridrato de Naftiletlenodiamina/ 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Através desta reação, o nitrito presente no sobrenadante reage em meio ácido com sulfanilamida produzindo um sal diazônico, que em seguida reagirá com o cloridrato de Naftiletlenodiamina formando um complexo de coloração rósea, para assim ser mensurado espectrofotometricamente.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram isolados, ajustados para a concentração de 10<sup>6</sup> células/mL, semeados e tratados como previamente descrito para as análises de citotoxicidade. Após o tratamento, 100 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos com os adutos foram incubados com 100 µL do reagente de Griess (1% Sulfanilamida/ 0.1% Cloridrato de Naftiletlenodiamina/ 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) por 10 minutos, a

temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540nm no leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad<sup>®</sup>, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito em cada situação foi determinada através de uma curva padrão de nitrito de sódio. Como controle se utilizou o sobrenadante de macrófagos não tratados, em meio RPMI-1640.

### 3.6 Análises por microscopia confocal

Para analisarmos as alterações fisiológicas do *T. cruzi* tratados com os adutos Morita-Baylis-Hillman mais promissores utilizamos os seguintes marcadores: a) Live/Dead<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen Co., L3224, Eugene, OR, USA), para analisar a viabilidade celular e possíveis danos a membrana plasmática; b) Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA), para averiguar os efeitos sobre o potencial da membrana mitocondrial; c) MitoSOX<sup>™</sup> (Invitrogen Co., L3224, Eugene, OR, USA), para averiguar a possível geração de radicais livres pela mitocôndria e d) laranja de acridina (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) para detectar possíveis efeitos dos adutos sobre compartimentos ácidos. Formas epimastigotas foram incubadas na ausência ou presença dos adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 nas concentrações de IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub> por 72 horas. Após o período de tratamento, alíquotas de 1,5 mL das culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e submetidas ao procedimento de marcação com os fluorocromos específicos.

Para o Live/Dead<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit, as amostras foram lavadas duas vezes e incubadas em tampão fosfato estéril. Adicionou-se a cada amostra 1µL de Homodímero de etídio (EthD-1) e 0,5µL de Calceína-AM sendo incubados por mais 30 minutos à 28°C. Como controle positivo para o EthD-1 incubou-se células com metanol 70% por 30 minutos.

Para a marcação com rodamina 123 (Rho123) ou MitoSOX<sup>™</sup>, as amostras foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 500µL de PBS estéril e incubadas com 10 µg/mL de Rho123 por 15 minutos a 28°C ou 5µM do MitoSOX<sup>™</sup> por 30 minutos a 37°C e lavadas três vezes em PBS. Células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos ou Metanol 70% por 20 minutos foram utilizadas como controle tratado para as análises de MitoSOX<sup>™</sup> e Rho123, respectivamente.

Em relação à marcação com a laranja de acridina, os protozoários foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, lavados e ressuspensos em PBS estéril, em seguida foram incubados com uma solução de 20 µg/mL de laranja de acridina por 10 minutos, na

temperatura de cultivo do parasita e na ausência de luminosidade. Após este período, as amostras foram lavadas três vezes em PBS estéril, incubadas em PBS por 30 minutos.

Para a observação da fluorescência, as amostras foram colocadas em placas de cultivo MatTek (MatTek Corp. MA, USA), visualizadas no microscópio confocal Leica SPII-AOBS utilizando o laser HeNe 488nm (para todos os marcadores) e o 543nm (para a laranja de acridina). As imagens foram adquiridas e processadas através do software Leica Application Suite Lite 2.6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### 3.7 Estudo Ultraestrutural

Formas epimastigotas tratadas com  $IC_{50}$  ou  $2x IC_{50}$  foram lavadas em PBS e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4% + tampão cacodilato de sódio 0,1M [pH 7.2] por duas horas, e pós-fixadas em uma solução de 1% tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ), 0,8% ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), 5 mM cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) em tampão cacodilato 0,1M por 1 hora, sob a ausência de luz. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 3x 100%), infiltradas e incluídas em Epon (Fluka Analytical). Cortes ultrafinos da amostra, com aproximadamente 70 nm de espessura, foram obtidos através de um ultramicrotomo (Leica EMUC6), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados através dos microscópios de transmissão FEI Tecnai™ Spirit.

### 3.8 Animais

Camundongos BALB/c foram adquiridos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL)-FIOCRUZ e usados para obtenção de macrófagos peritoneais, sendo utilizados nos testes de citotoxicidade, produção de óxido nítrico e avaliação tripanocida de formas amastigotas. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e aprovado pelo comitê de ética em experimental animal da instituição (CEUA-FIOCRUZ L-001/08)

### **3.9 Análise estatística**

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 8.0 (IBM CO., Nova Iorque, EUA) para Windows. As análises de significância foram realizados através do teste ANOVA e o pós-teste de Dunnet, considerando significativo valores  $p < 0.05$ , no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA) para Windows.

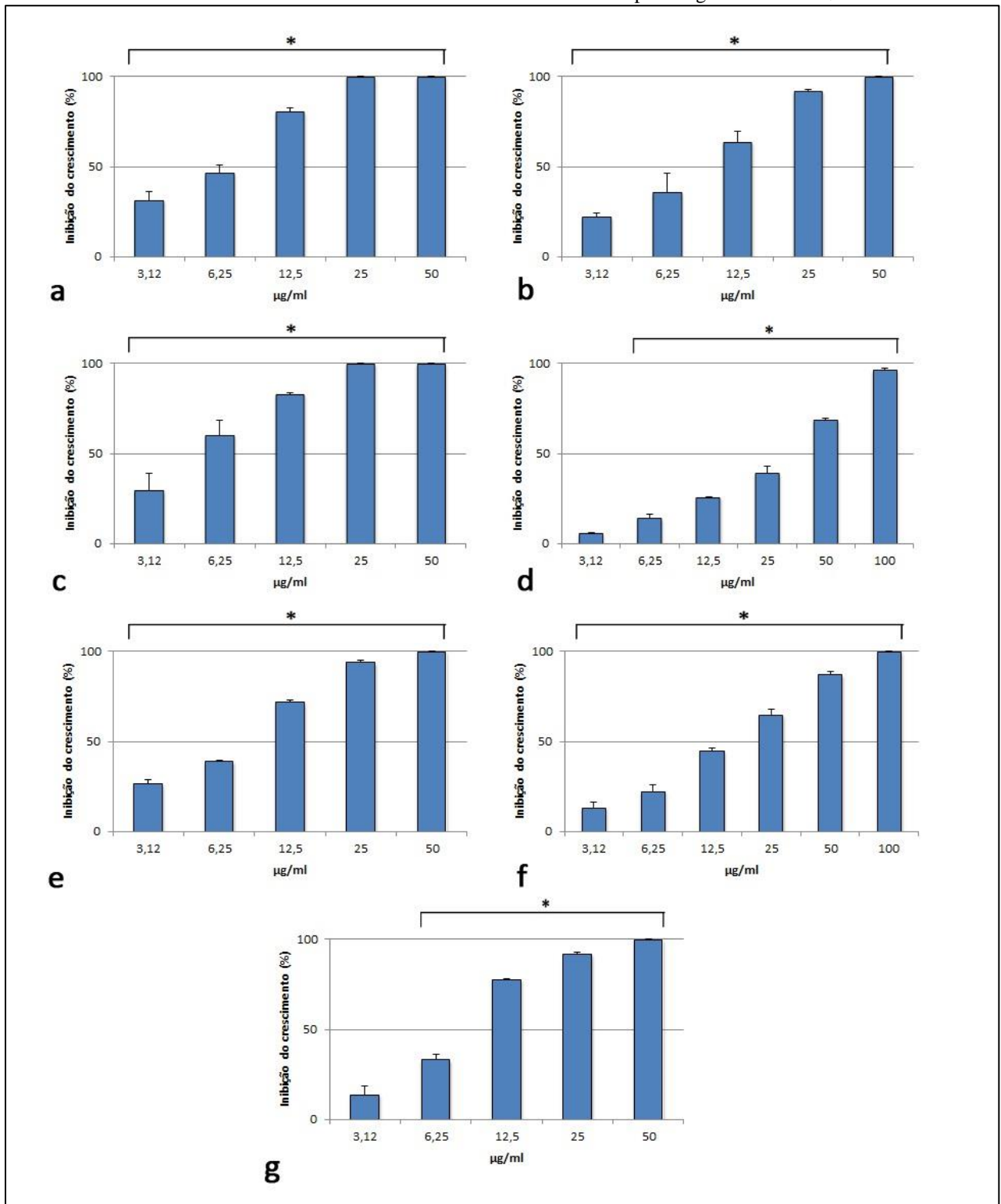
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o crescimento de formas epimastigotas

Nossos resultados mostraram que todos os compostos testados foram capazes de inibir o crescimento de *T. cruzi*, de forma dose-dependente demonstrado pelo caráter ascendente dos gráficos de inibição do crescimento (**Gráfico 1**). Com exceção de MBH4 e MBH7 (**Gráfico 1D e 1G**), os quais apresentaram inibição do crescimento significativa apenas a partir da concentração de 6,25 µg/mL, todos os demais compostos inibiram significativamente o crescimento de formas epimastigotas em todas as concentrações testadas. Os compostos MBH1 e MBH3 (**Gráfico 1A e 1C**) apresentaram 100% de inibição do crescimento a partir da concentração de 25 µg/mL, enquanto MBH2 e MBH5 (**Gráfico 1B e 1E**) atingiram esta proporção apenas a partir da concentração de 50 µg/mL. Para o composto MBH6 a inibição total do crescimento foi obtida na concentração de 100 µg/mL (**Gráfico 1F**).

As diferenças de atividade dos adutos sobre as formas epimastigotas tornam-se mais evidentes através do cálculo da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>). Dentre os adutos, o MBH1 e MBH5 se mostraram mais eficazes para essas formas, com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 10 µg/mL (**Tabela 2**). Os compostos MBH4 e MBH6 foram os menos efetivos, com valores de IC<sub>50</sub> de 38,09 ± 4,31 µg/mL e 21,94 ± 1,5 µg/mL, respectivamente. O aduto MBH3 apresentou uma IC<sub>50</sub> de 6,53 ± 1,3 µg/mL.



**Gráfico 1-** Efeito dos diferentes adutos sobre o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda:; (A) MBH1; (B) MBH2; (C) MBH3; (D) MBH4; (E) MBH5; (F) MBH6; (G) MBH7. Barras representam a média de 3 experimentos realizados em triplicata. \*Valores estatisticamente significativos teste ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Efeitos dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre formas tripomastigotas

Tendo em vista a sua importância para a patologia da doença, nós avaliamos o efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre a viabilidade das formas tripomastigotas. Todos os compostos testados apresentaram a capacidade de causar uma intensa perda da viabilidade no parasita, de maneira dose-dependente (**Gráfico 2**). Excetuando os adutos MBH2 e MBH6, os quais apresentaram efeito significativo apenas a partir da concentração 6,12 µg/mL todos os demais adutos mostraram significância em relação ao controle em todas as concentrações testadas, atingindo 100% de perda de viabilidade a partir de 25 µg/mL para os compostos MBH1, MBH2, MBH3 e MBH7 (**Gráfico 2A, 2B, 2C e 2G, respectivamente**) e a 50 µg/mL para o aduto MBH5. Os adutos MBH4 e MBH6 apresentaram valores de 91.65% e 92.72% de inibição na maior concentração testada (**Gráfico 2D e 2F**), respectivamente.

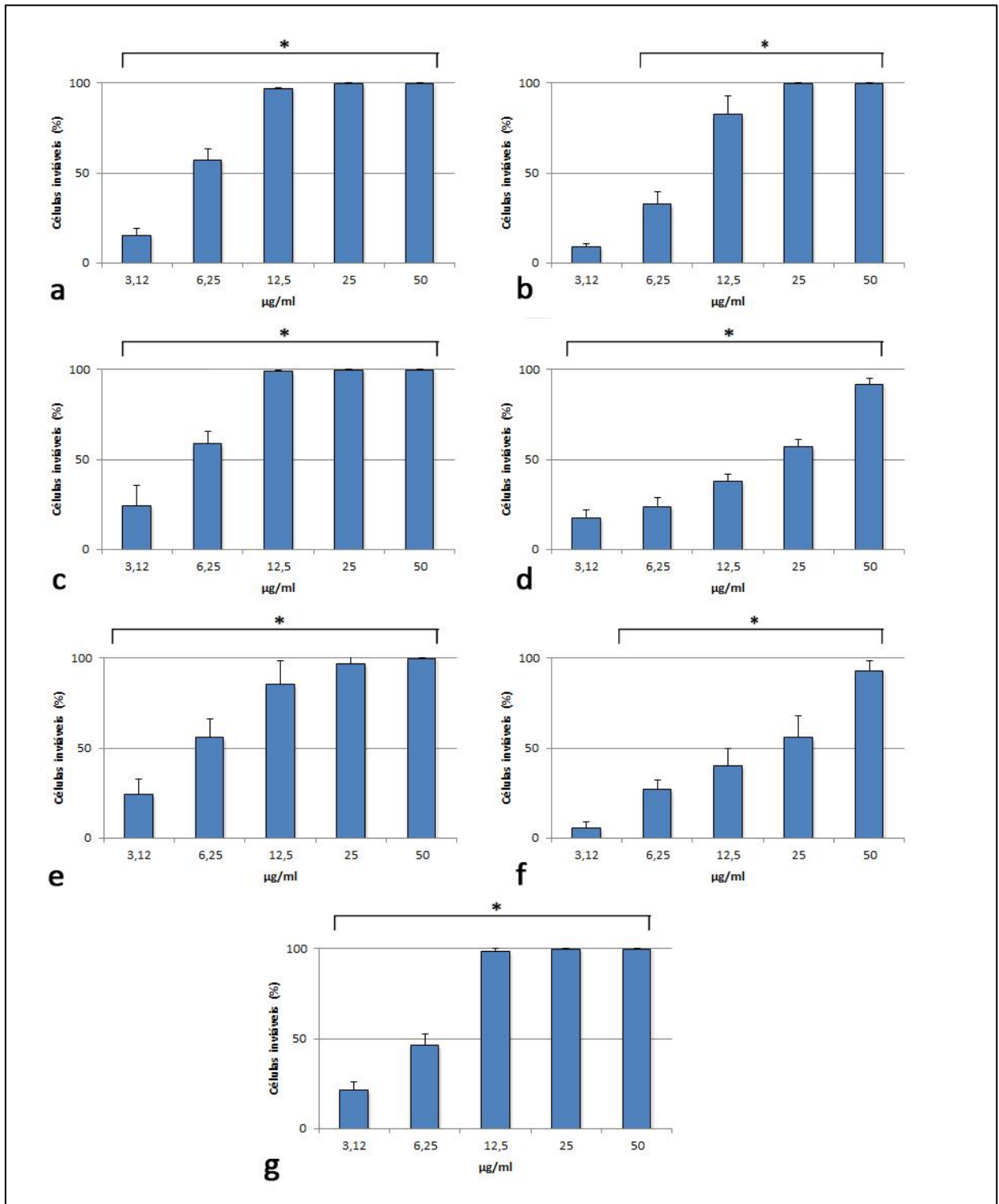
Com exceção do composto MBH6, todos os compostos apresentaram uma atividade semelhante ou superior em formas tripomastigotas quando comparadas com as formas epimastigotas com valores de LC<sub>50</sub> variando entre 5,52 e 22,14 µg/mL. Os adutos MBH1, MBH5 e MBH7 se mostraram os mais efetivos entre os compostos testados (**Tabela 2**). O aduto MBH3 apresentou uma LC<sub>50</sub> de 6.53 ± 1.3 µg/mL.

**Tabela 2** - Atividade *in vitro* dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade (ISE).

Compostos	IC <sub>50/72h</sub> (µg/mL)	LC <sub>50/24h</sub> (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)		ISE	
			Macrófagos	Células Vero	Macrófagos	Células Vero
MBH1	7.24 ± 1.8	6.08 ± 0.3	20.68 ± 2.7	19.9 ± 3.2	3.4	3.27
MBH2	10.82 ± 2.5	8.47 ± 1.0	38.95 ± 4.6	30.0 ± 3.8	4.6	3.54
MBH4	38.09 ± 4.3	21.98 ± 1.7	53.89 ± 2.6	22.3 ± 4.1	2.45	1.01
MBH5	9.5 ± 1.0	7.36 ± 2.0	29.25 ± 0.7	25.0 ± 2.2	3.97	3.40
MBH6	21.94 ± 1.5	22.14 ± 4.9	53.9 ± 3.0	46.1 ± 3.2	2.43	2.08
MBH7	10.31 ± 0.9	6.19 ± 0.6	20,0 ± 5.3	20.2 ± 2.6	3.23	3.26

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** IC<sub>50</sub>- concentração que inibe em 50% o crescimento de formas epimastigotas; LC<sub>50</sub>- concentração que causa lise de 50% de formas tripomastigotas; CC<sub>50</sub>- concentração que reduz em 50% a viabilidade de células de mamíferos; ISe- índice de seletividade.

**Gráfico 2** - Efeito dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Fonte: Elaborado pelo autor .

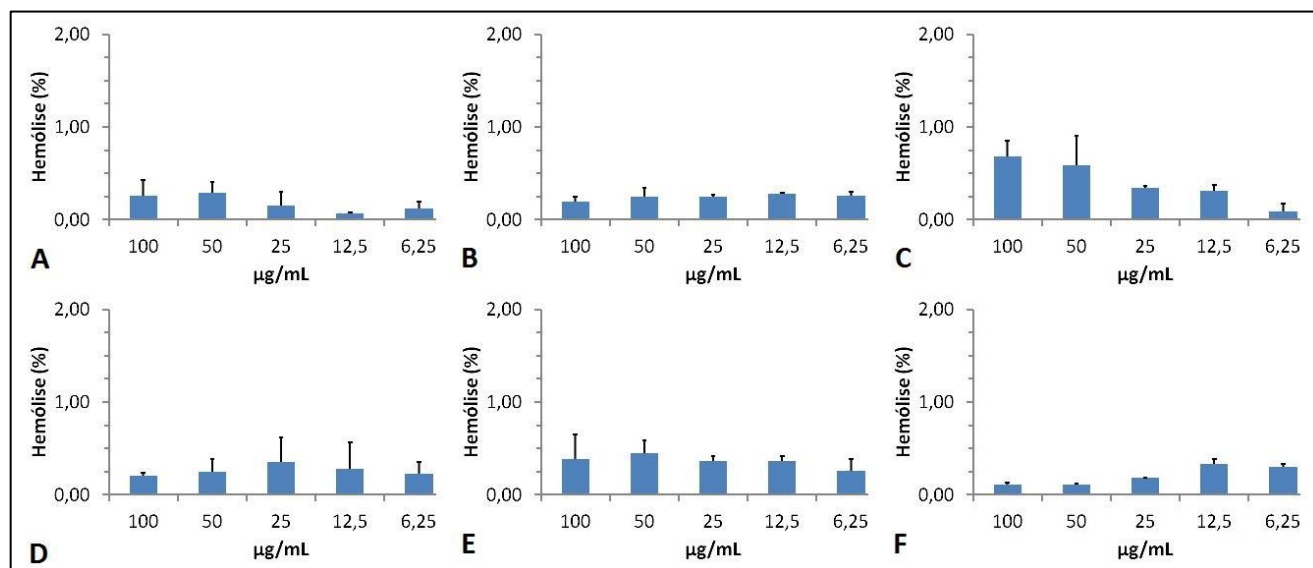
Legenda: (A) MBH1; (B) MBH2; (C) MBH3; (D) MBH4; (E) MBH5; (F) MBH6; (G) MBH7. Cada barra representa a média de três experimentos em triplicata \* Significância estatística pelo teste ANOVA ( $p < 0.05$ )

### 4.3 Citotoxicidade em Células de Mamíferos (Macrófagos Peritoneais e Células Vero) e Atividade Hemolítica

O potencial citotóxico dos compostos em células de mamífero foi avaliado pela técnica do MTT. Todos os compostos foram capazes de induzir alguma toxicidade, sendo o grau de toxicidade variável entre os compostos e células testadas. Os compostos MBH1 e MBH7 foram os mais tóxicos para macrófagos, com valores de  $CC_{50}$  de  $20,68 \pm 2,7$  e  $20,0 \pm 5,3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os compostos menos tóxicos foram o MBH4 e o MBH6 com  $CC_{50}$  de  $53,89 \pm 2,6$   $\mu\text{g/mL}$  e  $53,9 \pm 3,0$   $\mu\text{g/mL}$  para macrófagos. Todos os adutos testados apresentaram uma maior citotoxicidade para células Vero, sendo estas mais susceptíveis ao estresse do que os macrófagos peritoneais, com valores de  $CC_{50}$  variando entre  $19,9 \pm 3,2$   $\mu\text{g/mL}$  e  $46,1 \pm 3,2$   $\mu\text{g/mL}$ . Os compostos MBH2 e MBH6 se mostraram menos tóxicos, com valores de  $CC_{50}$  de  $30,0 \pm 3,8$  e  $46,1 \pm 3,2$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Semelhante à toxicidade em macrófagos peritoneais, os compostos MBH1 e MBH7 apresentaram a maior toxicidade com  $CC_{50}$  de  $19,9 \pm 3,2$  e  $20,2 \pm 2,6$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (**Tabela 2**).

A partir da  $CC_{50}$  foi possível determinar o índice de seletividade dos compostos (ISe). Todos os compostos testados se mostraram mais efetivos contra o parasita do que para as células hospedeiras. Os compostos mais seletivos para as formas tripomastigotas (ISe > 3,0) em relação aos macrófagos em ordem decrescente foram o MBH2 (4,6), MBH5 (3,97), MBH1 (3,4) e o MBH7 (3,23). Os compostos MBH4 e MBH6 foram os menos seletivos contra o parasita com ISe < 3,0 (**Tabela 2**). Tendo em vista que as células Vero apresentaram-se mais susceptíveis ao tratamento com os compostos, os ISe encontrado para estas células foram um pouco menores quando comparados aos obtidos para macrófagos. Interessantemente, a ordem dos ISe não se alterou apresentando-se em ordem decrescente os compostos MBH2 (3,54), MBH5 (3,4), MBH1 (3,27) e MBH7 (3,26). Novamente, os compostos, MBH4 e MBH6 mostraram-se também os menos seletivos.

Alternativamente, avaliamos a atividade hemolítica dos adutos Morita-Baylis-Hillman. Todos os compostos testados apresentaram uma fraca atividade hemolítica, com valores menores a 1% nas maiores concentrações testadas (100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Gráfico 3**).

**Gráfico 3** - Efeito dos adutos na atividade hemolítica em hemácias humanas

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (A) MBH1; (B) MBH2; (C) MBH4; (D) MBH5; (E) MBH6; (F) MBH7. Cada barra representa a média de dois experimentos em quadruplicata. \*Não houve significância estatística pelo teste ANOVA ( $p > 0.05$ ).

#### 4.4 Efeitos dos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre formas amastigotas intracelulares

De acordo com os valores de  $IC_{50}$ ,  $LC_{50}$ ,  $CC_{50}$  e índices de seletividade (ISE) encontrados, foram selecionados os compostos mais promissores, os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7, para as análises envolvendo formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Todos os compostos testados se mostraram eficazes em inibir a infecção da forma amastigota em macrófagos peritoneais de BALB/c. Dentre eles, o aduto MBH7 apresentou um maior efeito inibitório, quando comparado aos demais, com um valor de  $IC_{50/48h}$  de  $2,28 \pm 0,38$   $\mu\text{g/mL}$ . Os adutos MBH1, MBH2 e MBH5 apresentaram valores de  $IC_{50/48h}$  de  $2,73 \pm 0,21$ ,  $3,38 \pm 0,10$  e  $3,10 \pm 0,95$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (**Tabela 3**). Quando a citotoxicidade dos adutos em macrófagos peritoneais é comparado com os valores da atividade sobre amastigota, observamos que o aumento nesta atividade refletiu positivamente nos índices de seletividade, com valores variando de 7,57 a 11,5 (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Efeitos dos adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 sobre formas amastigotas de *T. cruzi*.

Compostos	IC <sub>50/48h</sub> (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	ISe
	Amastigotas	Macrófagos	
MBH1	2.73 ± 0.21	20.68 ± 2.7	7.57
MBH2	3.38 ± 0.10	38.95 ± 4.6	11.5
MBH5	3.10 ± 0.95	29.25 ± 0.7	9.34
MBH7	2.28 ± 0.38	20.0 ± 5.3	8.77

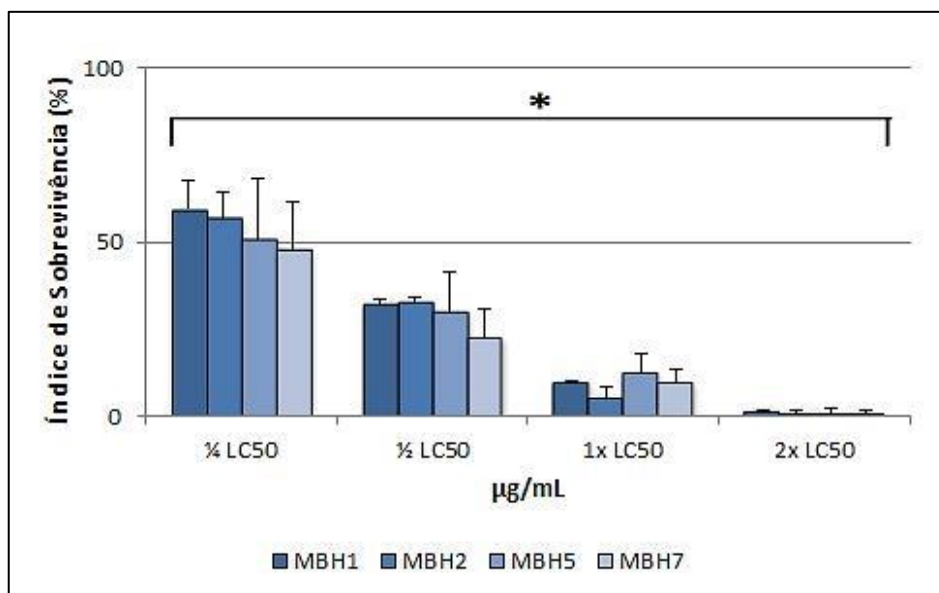
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** IC<sub>50 AMA</sub> – Concentração que inibe em 50% a infecção dos macrófagos por amastigotas de *T. cruzi*.

CC<sub>50</sub> – Concentração capaz de causar efeitos citotóxicos em 50% dos macrófagos.

ISe – Índice de seletividade = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>

Em relação ao índice de sobrevivência, nossos resultados mostraram que os compostos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 causaram uma diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) na sobrevivência dos parasitas no interior dos macrófagos de maneira dose-dependente, quando comparado com células infectadas e não tratadas (**Gráfico 4**). Na concentração correspondente a  $\frac{1}{4}$  da LC<sub>50/24h</sub>, todos os adutos testados apresentaram mais de 35% de inibição na sobrevivência, sendo observados valores abaixo de 13% e 3% nas concentrações correspondentes a LC<sub>50/24h</sub> e 2x LC<sub>50/24h</sub>, respectivamente.

**Gráfico 4** – Índice de Sobrevivência para formas amastigotas intracelulares tratadas com os adutos

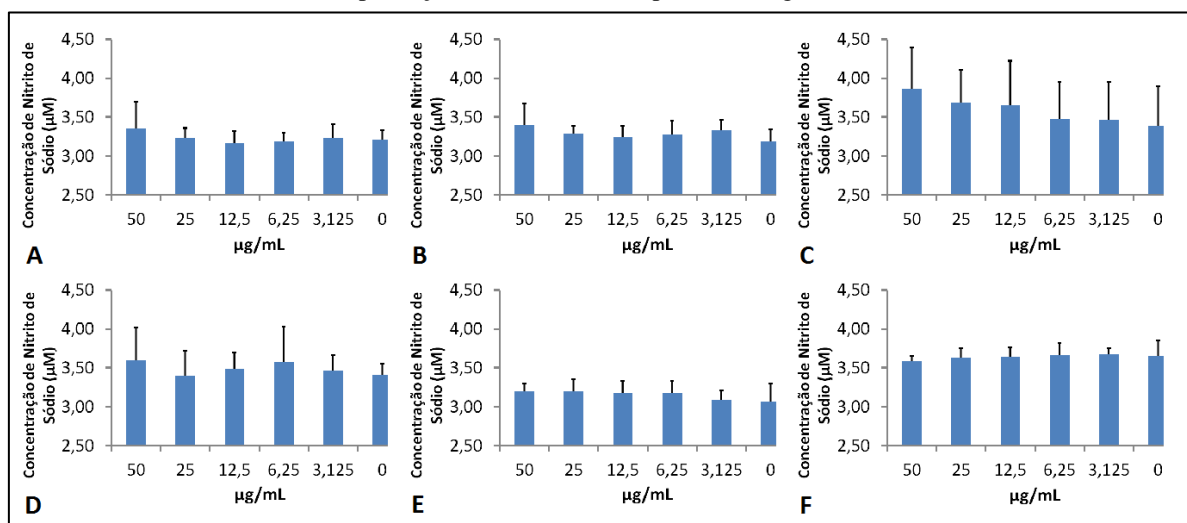
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** Cada barra representa a média de dois experimentos em duplicata \* Significância estatística pelo teste ANOVA ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle.

## 4.5 Produção de NO

Para avaliar se os diferentes adutos Morita-Baylis-Hillman podem alterar a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos, nós avaliamos o efeito dos compostos sobre a produção de NO pela técnica de Griess. Nossos resultados demonstraram que nenhum dos adutos testados foi capaz de induzir o aumento ou diminuição dos níveis de óxido nítrico em macrófagos, quando comparado ao grupo controle (**Gráfico 5**).

**Gráfico 5** - Efeito dos adutos na produção de Óxido Nítrico por macrófagos



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (A) MBH1; (B) MBH2; (C) MBH4; (D) MBH5; (E) MBH6; (F) MBH7. Resultados referentes a dois experimentos independentes, em quadruplicata. Não houve significância estatística pelo teste ANOVA, considerando significativo  $p < 0.05$ .

## 4.6 Análises por microscopia confocal a laser

Tendo em vista os resultados obtidos nos testes de contagem *in vitro*, a próxima etapa do nosso trabalho foi avaliar o efeito dos compostos mais promissores sobre determinados parâmetros fisiológicos do parasita através da microscopia confocal a laser.

### 4.6.1 Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit

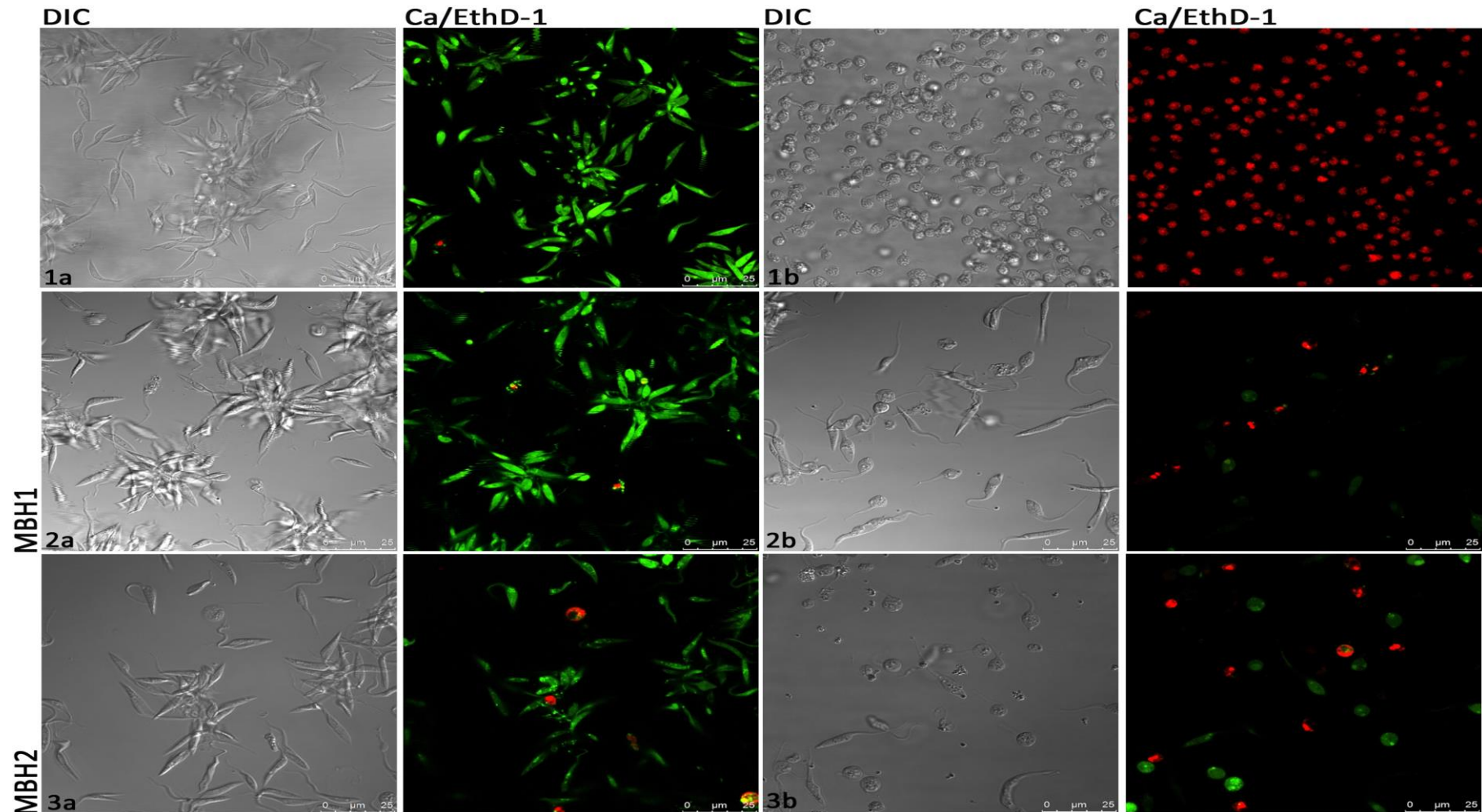
Para analisar a ação dos compostos sobre a viabilidade celular e a integridade da membrana plasmática foi utilizado o Kit Live/Dead - Viability/Citotoxicity for mammalian cells (Invitrogen, L3224). Esse kit é baseado na existência de dois marcadores: o Homodímero-1 de Etídio (EthD-1) e a Calceína AM. O EthD-1 é um fluorocromo que é permeável em membranas não-funcionais e estabelece uma forte ligação com os ácidos

nucleicos, emitindo uma fluorescência na faixa correspondente ao vermelho. Por sua vez, a Calceína-AM é um ester lipofílico não fluorescente, que se difunde passivamente nas células e é transformado a calceína fluorescente e insolúvel por esterases intracelulares em células viáveis, emitindo um sinal fluorescente na faixa do verde (HAUGLAND et al., 1994).

Células controles (**Figura 13.1a e 14.1a**) submetidas à marcação com o Kit mostraram uma intensa marcação para calceína distribuída por toda a célula. Poucas células apresentaram marcação para o EthD-1 indicando uma alto índice de células viáveis. Por outro lado, células tratadas com metanol, usado como agente fixador e permeabilizante, mostraram uma intensa modificação na morfologia e intensa e difusa marcação para o EthD-1, indicando a perda da integridade da membrana e da viabilidade celular (**Figura 13.1b e 14.1b**). Exceto pelo composto MBH2, o tratamento dos parasitas com a  $IC_{50}$  dos compostos, mostrou pouca alteração do perfil de marcação com estes traçadores quando comparado com as células controles (**Figura 13.3a e 13.3b**). No entanto, o tratamento com  $2 \times IC_{50}$  das drogas alterou significativamente a viabilidade celular, evidenciada por uma fraca marcação com a calceína e aumento no número de células marcadas com EthD-1 (**Figura 13.2b, 13.3b, 14.2b e 14.3b**).

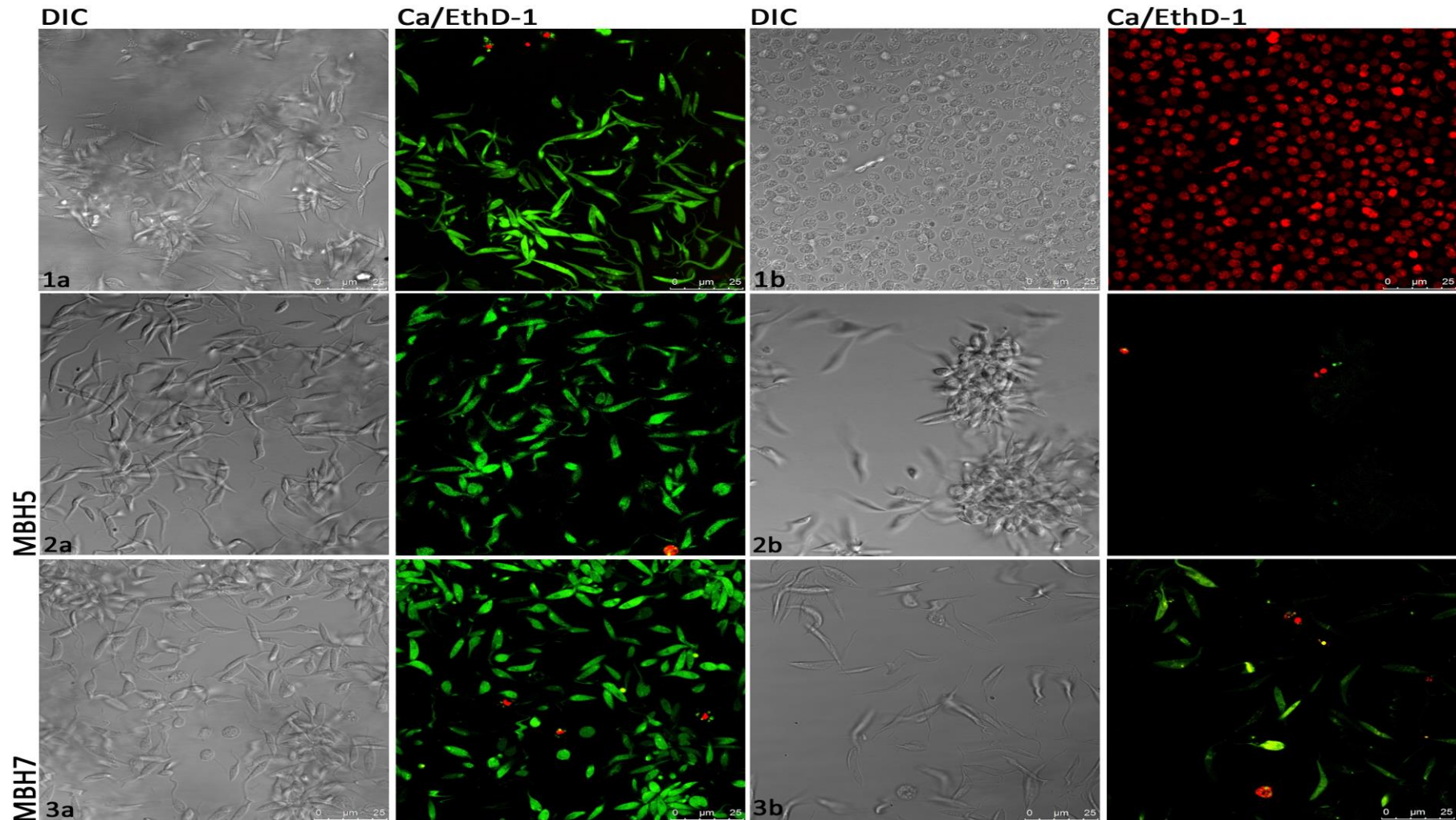


**Figura 13** – Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 sobre a viabilidade celular e integridade da membrana, através da marcação com o Kit Live/Dead.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com metanol (2a) Células tratadas com a  $IC_{50}$  de MBH1; (2b)  $2x IC_{50}$  de MBH1; (3a)  $IC_{50}$  de MBH2; (3b)  $2x IC_{50}$  de MBH2; Nota-se apenas no 3b a presença de células com morfologia alterada com marcação evidente com o homodímero de etídio. **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **Ca/EthD-1**, Sobreposição das imagens da marcação para Calceína (verde) e do Homodímero de Etídio-1 (vermelho).

**Figura 14** – Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 sobre a viabilidade celular e integridade da membrana, através da marcação com o Kit Live/Dead.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com metanol 70% por 30' (2a) Células tratadas com a IC<sub>50</sub> de MBH5; (2b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH5; (3a) IC<sub>50</sub> de MBH7; (3b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH7; **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **Ca/EthD-1**, Sobreposição das imagens da marcação para Calceína (verde) e do Homodímero de Etídio-1 (vermelho).

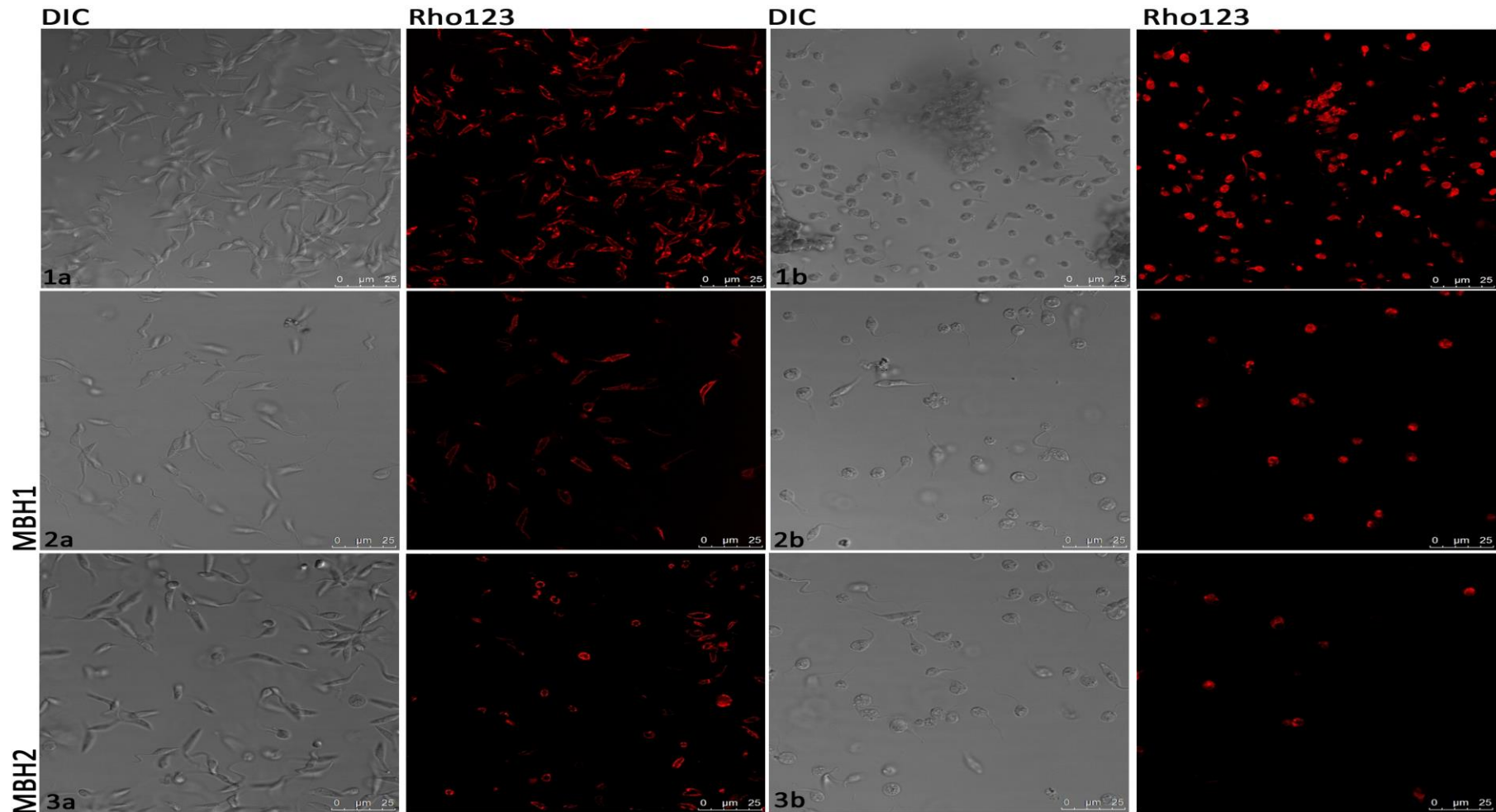
#### 4.6.2 Rodamina 123 e MitoSOX™

Objetivando avaliar os possíveis efeitos causados pelos adutos Morita-Baylis-Hillman sobre o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) e a produção de radicais superóxido, células tratadas e controles foram submetidas à marcação com a Rodamina 123 e o MitoSOX™, respectivamente.

Como resultado, as células controle apresentaram uma marcação intensa da mitocôndria pela Rodamina 123 (**Figura 15.1a e 16.1a**). Células tratadas com metanol por sua vez, apresentaram uma marcação difusa e inespecífica (**Figura 15.1b e 16.1b**). Com exceção do composto MBH7, que apresentou uma marcação semelhante ao controle (**Figura 16.3b**), foi observada uma diminuição no número de células marcadas e na intensidade da fluorescência pôde ser observada em todos os parasitas tratados com a  $IC_{50}$  dos adutos (**Figura 15.2a, 15.3a, 16.2a**). Dos compostos analisados apenas MBH7 apresentou uma marcação semelhante ao controle (**Figura 16.3b**). A incubação com  $2x IC_{50}$  dos compostos resultou na diminuição da fluorescência para todos os compostos, sendo essas alterações mais evidentes nos adutos MBH5 e MBH7 (**Figura 16.2b e 16.3b**). No entanto, drásticas alterações morfológicas foram observadas na maioria das células nesta concentração sendo a marcação presente apenas em células bem preservadas.

Para avaliar se as alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) vistas na marcação com a Rodamina 123 estavam relacionadas à um aumento na produção de radicais superóxidos nesta organela, células controles e tratadas foram submetidas à marcação com o marcador MitoSOX™. Como esperado, pouca ou nenhuma marcação foi observada nas células controles (**Figura 17.1a e 18.1a**), enquanto que células tratadas com o peróxido de hidrogênio apresentaram uma intensa fluorescência em todo o corpo do parasita (**Figura 17.1b e 18.1b**). Pouca marcação para o MitoSOX™ foi observada em células tratadas com a  $IC_{50}$  dos compostos MBH1, MBH2 e MBH5. Células tratadas MBH7, no entanto, mostraram uma marcação pontual no cinetoplasto, nesta concentração. (**Figura 18.3a**). Um aumento gradual no número de células positivas para este marcador pôde ser observado nos parasitas tratados com  $2x IC_{50}$  dos adutos de todos os compostos (**Figura 17.2b, 17.3b, 18.2b e 18.3b**), sendo esta marcação presente apenas nas células alteradas morfológicamente.

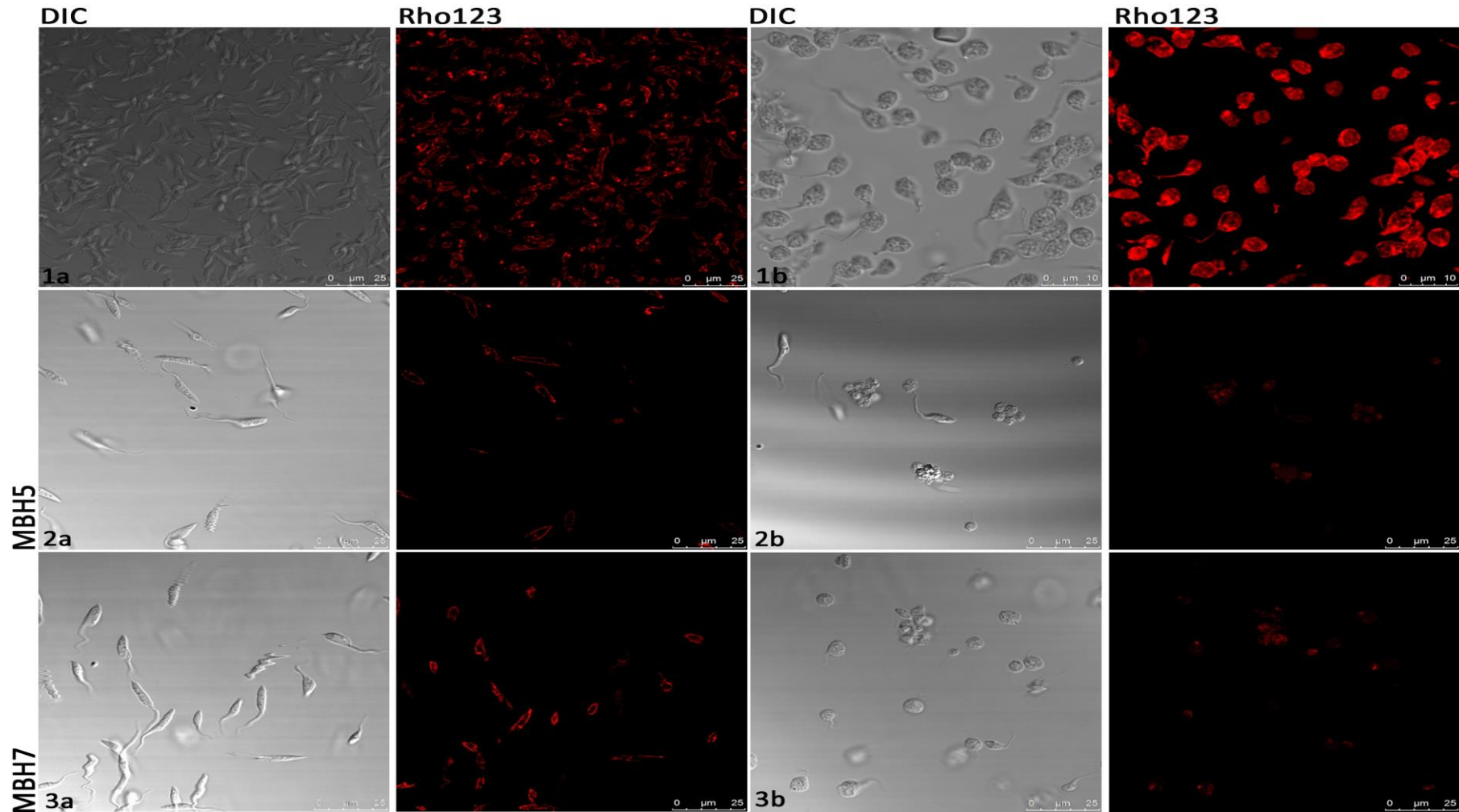
**Figura 15** – Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 no  $\Delta\psi_m$ , através da marcação com a Rodamina 123.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

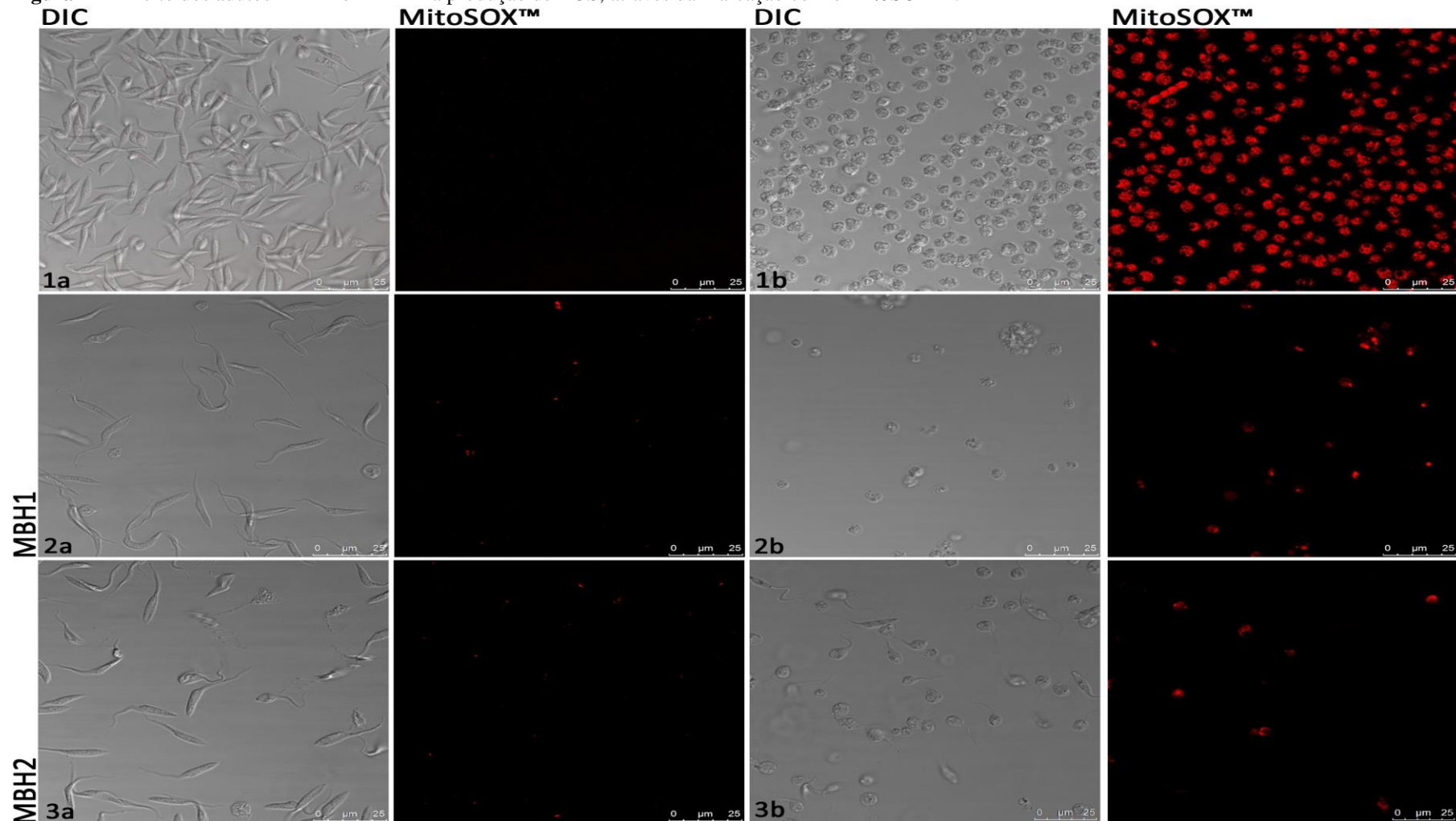
**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com metanol 70% por 30' (2a) Células tratadas com a IC<sub>50</sub> de MBH1; (2b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH1; (3a) IC<sub>50</sub> de MBH2; (3b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH2; **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **Rho123**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência da Rodamina 123.

**Figura 16** – Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 no  $\Delta\psi_m$ , através da marcação com a Rodamina 123..



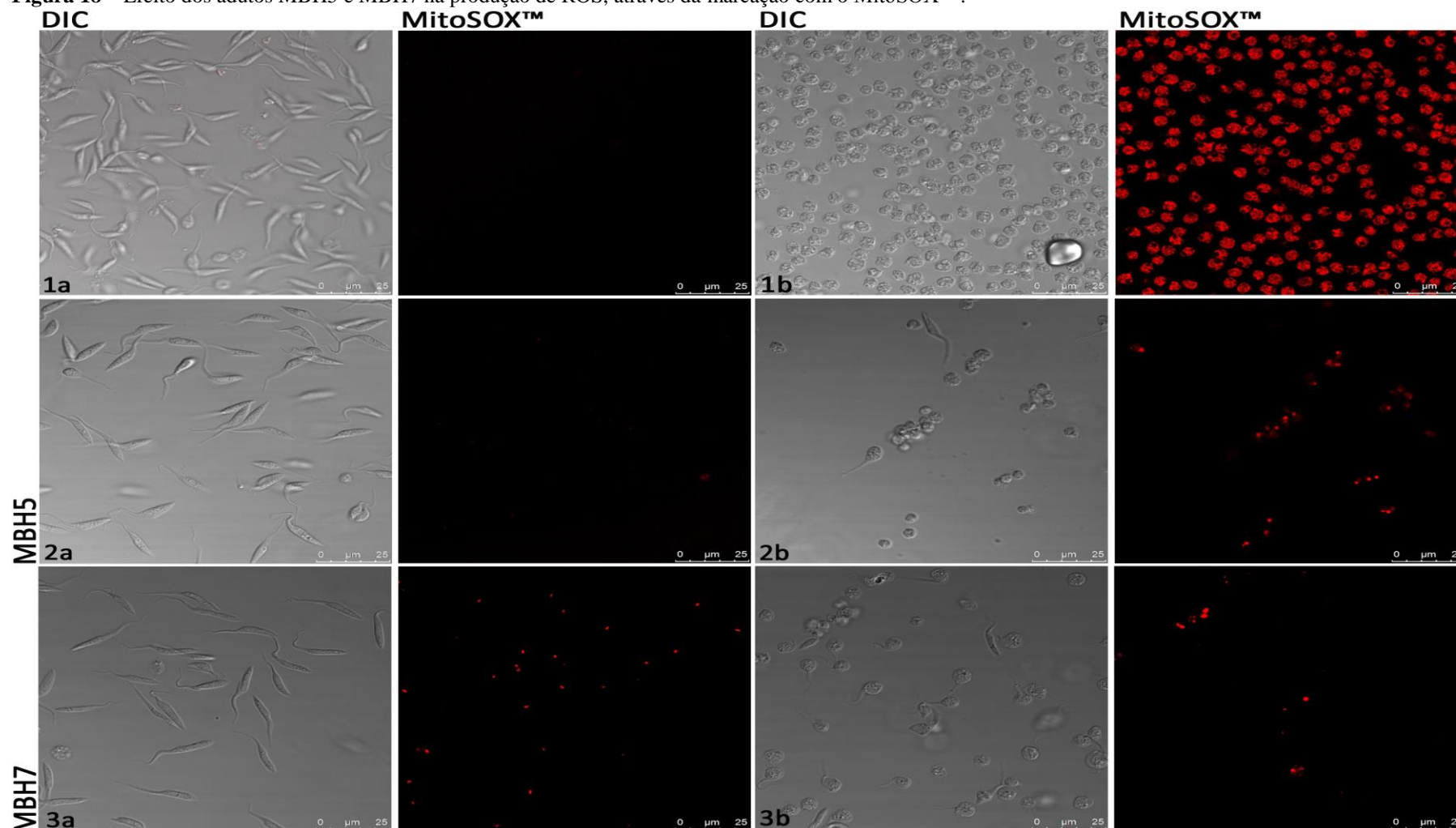
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com metanol 70% por 30' (2a) Células tratadas com IC<sub>50</sub> de MBH5; (2b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH5; (3a) IC<sub>50</sub> de MBH7; (3b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH7; **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **Rho123**, imagens obtidas no canal correspondente à fluorescência da Rodamina 123.

**Figura 17** – Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 na produção de ROS, através da marcação com o MitoSOX™.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com  $H_2O_2$  por 20' (2a) Células tratadas com  $IC_{50}$  de MBH1; (2b)  $2x IC_{50}$  de MBH1; (3a)  $IC_{50}$  de MBH2; (3b)  $2x IC_{50}$  de MBH2. **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **MitoSOX**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência do MitoSOX™.

**Figura 18** – Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 na produção de ROS, através da marcação com o MitoSOX™.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1a) Células controle; (1b) Células tratadas com  $H_2O_2$  por 20' (2a) Células tratadas com a  $IC_{50}$  de MBH5; (2b)  $2x IC_{50}$  de MBH5; (3a)  $IC_{50}$  de MBH7; (3b)  $2x IC_{50}$  de MBH7. DIC, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); MitoSOX™, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência do MitoSOX™.

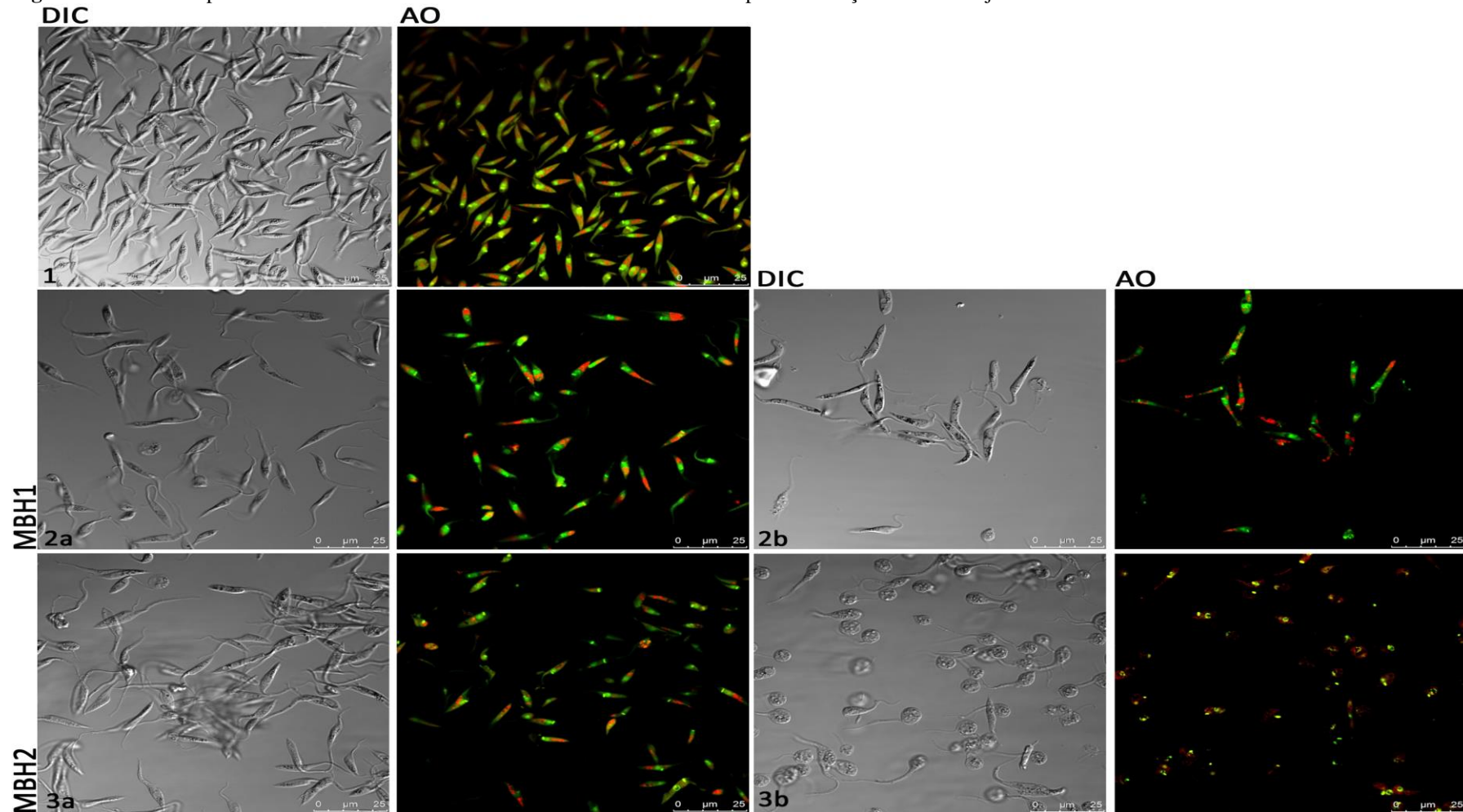
#### 4.6.3 Laranja de Acridina

Para analisar a ação dos compostos sobre os compartimentos ácidos ou básicos, foi utilizado a laranja de acridina (AO), um fluorocromo que se liga a organelas acídicas (como os lisossomos e acidocalcisomas) emitindo fluorescência na faixa do vermelho e ao DNA do parasita, emitindo intensa fluorescência na faixa do verde.

Células controles submetidas à marcação com a laranja de acridina (**Figuras 19.1 e 20.1**) mostraram uma incorporação significativa deste corante, com núcleo e cinetoplasto dos parasitas apresentando uma forte marcação verde, e o citoplasma uma fraca fluorescência. Compartimentos acídicos, evidenciados por forte sinal fluorescente na faixa do vermelho, foram visualizados na porção posterior do protozoário. Significantes alterações no padrão e na intensidade de marcação para a AO foram observadas em células tratadas com os adutos. (**Figuras 19.2a, 19.3a e 20.2a e 20.3a**). Células tratadas mostraram diminuição na intensidade da fluorescência no canal verde de maneira dose-dependente seguida de um aumento da fluorescência em compartimentos acídicos (marcados em vermelho). Em algumas células tratadas com os compostos MBH5 e MBH7 foi possível observar a fusão dos compartimentos acídicos dando origem a grandes compartimentos, com o deslocamento gradativo da marcação em vermelho da porção posterior para a região perinuclear e do cinetoplasto (**Figura 19.2b, 20.2b, 20.3a e 20.3b**) Células tratadas com  $2x IC_{50}$  apresentaram perda significativa na fluorescência verde do citoplasma e em alguns casos, do cinetoplasto e do núcleo. Nas células marcadas com MBH2 foi possível observar perda dos dois marcadores provavelmente causada pela ruptura das células e liberação do marcador para o sobrenadante da cultura (**Figura 19.3b**).



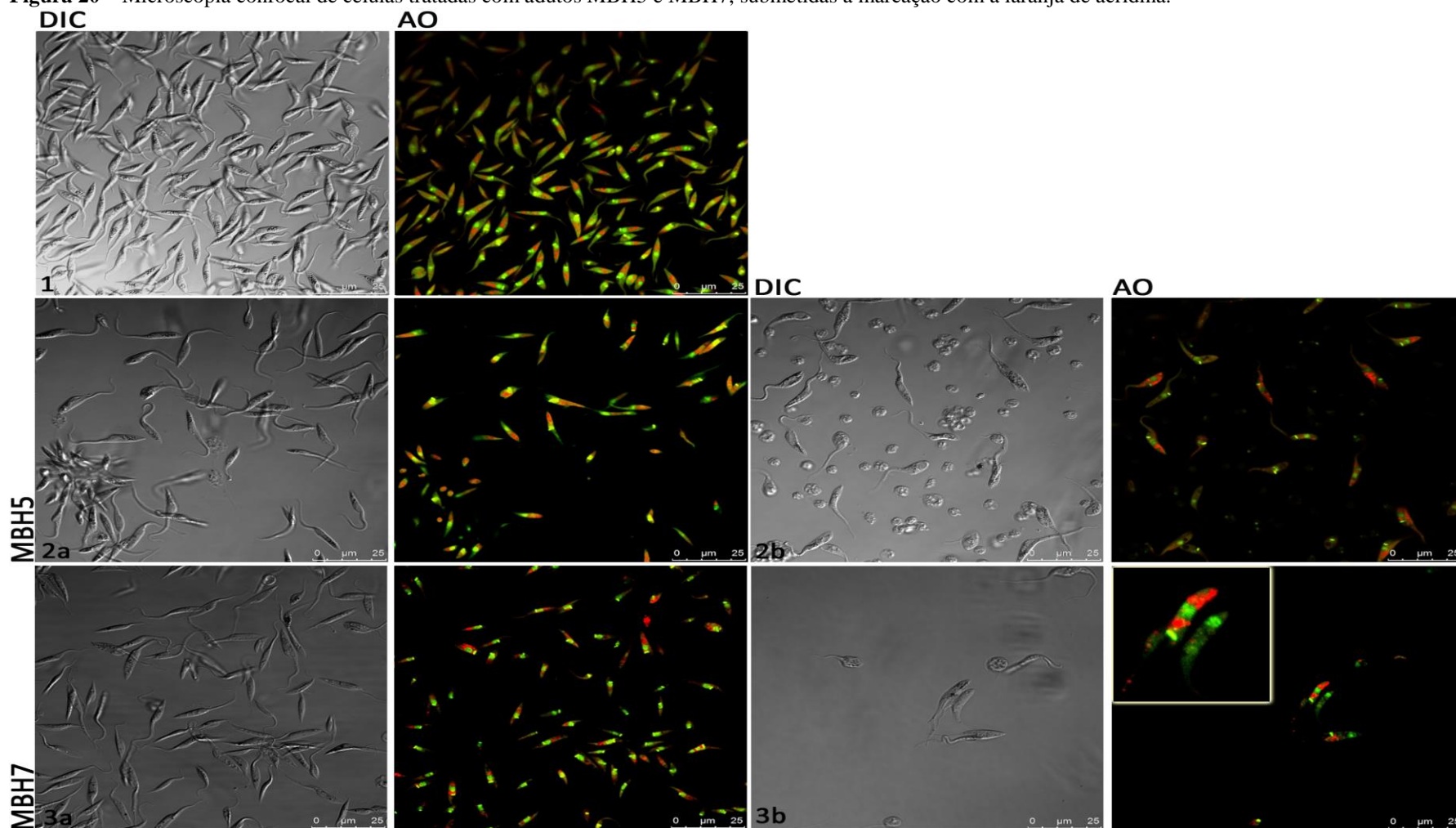
**Figura 19** – Microscopia confocal de células tratadas com adutos MBH1 e MBH2 após a marcação com a laranja de acridina.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1) Células controle; (2a) Células tratadas com  $1 \times IC_{50}$  de MBH1; (2b)  $2 \times IC_{50}$  de MBH1; (3a)  $1 \times IC_{50}$  de MBH2; (3b)  $2 \times IC_{50}$  de MBH2. Nota-se nos tratamentos com  $2 \times IC_{50}$  dos compostos a presença de células com morfologia alterada, evidente em 2b. **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **AO**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência da laranja de acridina.

**Figura 20** – Microscopia confocal de células tratadas com adutos MBH5 e MBH7, submetidas a marcação com a laranja de acridina.



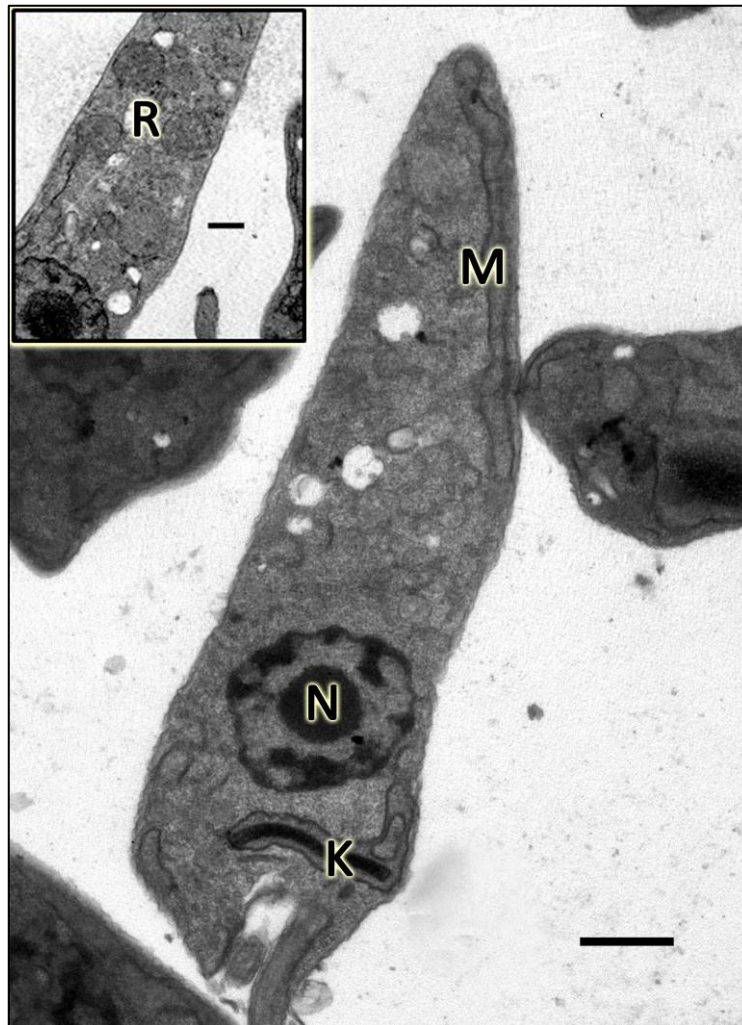
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (1) Células controle; (2a) Células tratadas com 1x IC<sub>50</sub> de MBH5; (2b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH5; (3a) 1x IC<sub>50</sub> de MBH7; (3b) 2x IC<sub>50</sub> de MBH7. Nota-se nos tratamentos com 2x IC<sub>50</sub> dos compostos a presença de células com morfologia alterada, evidente em 3b. **DIC**, imagem obtida através de contraste interferencial (Differential Interference Contrast); **AO**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência da laranja de acridina.

#### 4.7 Análise Ultraestrutural

A Figura 21 mostra a fotomicrografia de uma forma epimastigota controle apresentando uma morfologia característica para esta fase evolutiva: O citoplasma bastante granular e homogêneo, o núcleo arredondado bem preservado com cromatina e nucléolos evidentes pode ser observado na região central do parasita.. Perfis de mitocôndria também podem ser observados, com o cinetoplasto em forma de bastão localizado na porção anterior ao núcleo, na área onde o flagelo emerge. Em detalhe pode-se observar organelas com um formato esférico, delimitada por uma unidade de membrana e localizada na porção posterior do parasita, denominadas reservossomos.

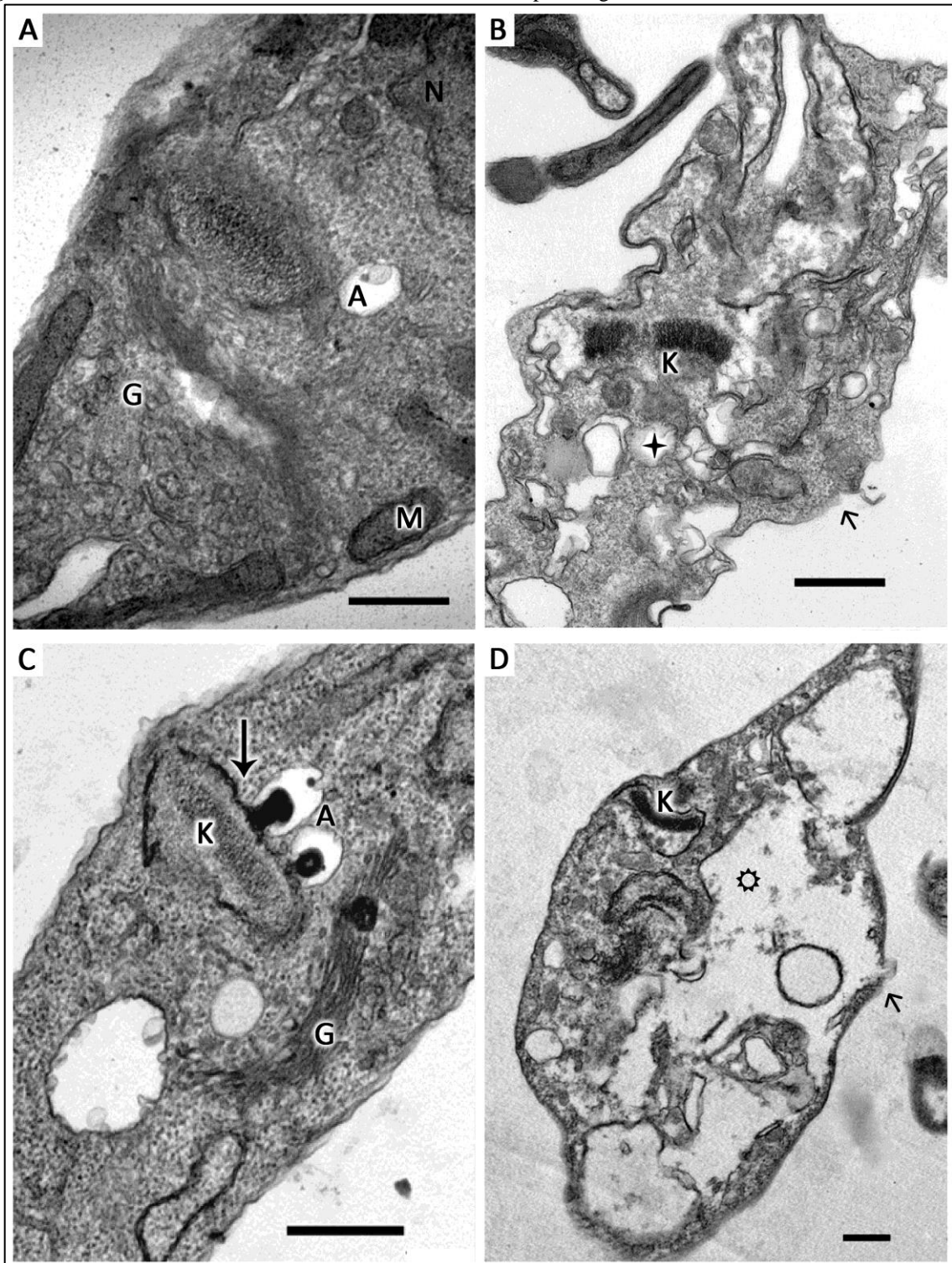
**Figura 21** - Fotomicrografia de *T. cruzi* – forma epimastigota



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

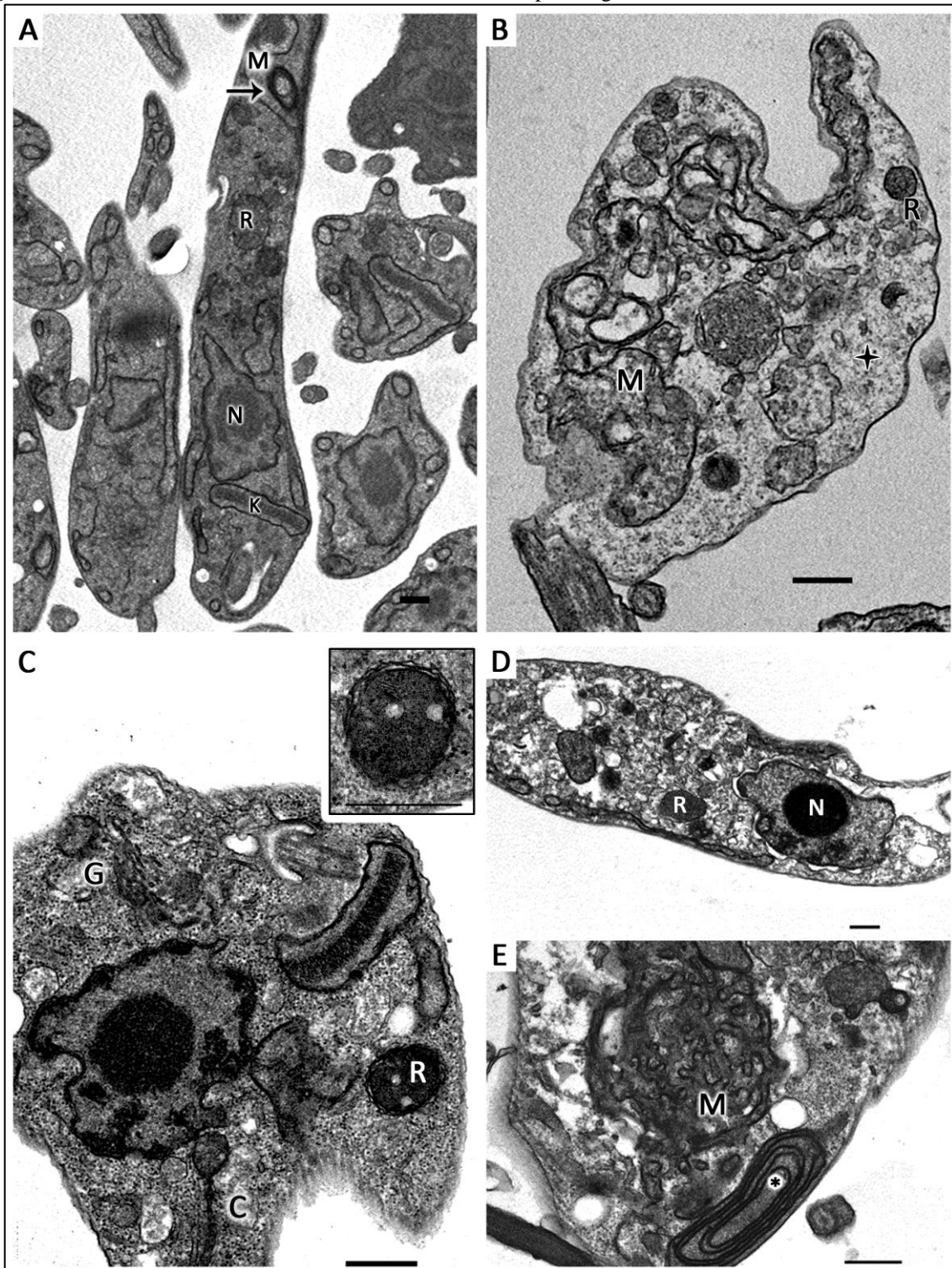
**Legenda:** Ultraestrutura de uma forma epimastigota de *T. cruzi* mostrando um corpo alongado, citoplasma homogêneo e mitocôndria (M) bem preservada. (N) Núcleo (K) Cinetoplasto. Detalhe: Reservossomos bem delimitados, por uma unidade de membrana (R) Barra – 500nm

Formas epimastigotas tratadas com  $1 \times IC_{50}$  dos adutos apresentaram poucas alterações em relação às células controles. No entanto, já é possível identificar mudanças em organelas como o Complexo de Golgi (**Figura 22A**) e mitocôndria (**Figura 23A**), as quais já apresentavam algum grau de desorganização. Um achado interessante foi a fusão de compartimentos semelhantes a acidocalcisomas com a membrana do cinetoplasto e liberação do seu conteúdo eletrondenso para espaço intermembranar em células tratadas com a  $IC_{50}$  do aduto MBH2. O tratamento das células com o dobro da concentração dos adutos, no entanto, levou a uma intensa desorganização celular, com vacuolização do citoplasma e perda de conteúdo citoplasmático levando ao aparecimento de grandes espaços eletrondensos, compatíveis com a perda da integridade da membrana e morte celular por necrose (**Figura 22B, 22D, 23B e 23D**). A mitocôndria dos parasitas foi a organela mais drasticamente afetada, sendo as alterações nesta estrutura já observada em células tratadas com  $1 \times IC_{50}$ . Aparecimento de figuras de mielina nesta organela, desorganização das cristas mitocondriais, com perda de material da matriz e aumento do volume e algumas vezes rupturas desta organela, foram os efeitos mais proeminentes dos adutos. Na maioria das células tratadas com ambas as concentrações do composto MBH7 pode-se observar a intensa fragmentação da mitocôndria como um efeito específico deste composto. Fenótipo consistente com processos autofágicos como o aumento de perfis de retículo endoplasmático circundando material parcialmente degradado ou organelas como resservossomos também foram comumente observadas nas células tratadas com os adutos

**Figura 22** - Efeito dos adutos MBH1 e MBH2 sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (A) IC<sub>50</sub> do MBH1: Célula apresentando poucas modificações em relação ao controle, com mitocôndrias integras e desorganização do Complexo de Golgi (G); (B) 2x IC<sub>50</sub> do MBH1: Intensa vacuolização e ruptura da mitocôndria com degradação do cinetoplasto pode ser observada (K), rompimento da membrana plasmática (seta) e a presença de retículos edoplasmático por todo citoplasma também são visualizados (+); (C) IC<sub>50</sub> do MBH2: Semelhante ao controle, entretanto apresenta uma estruturas semelhantes ao acidocalcissoma (A) em processo de fusão com o cinetoplasto (seta); (D) 2x IC<sub>50</sub> do MBH2: Alteração significativa na mitocôndria, com surgimento de espaços eletroluscentes dentro da organela (⊛) e rompimento da membrana plasmática (seta). (A) Acidocalcissoma (K) Cinetoplasto. Barra – 500nm.

**Figura 23** - Efeito dos adutos MBH5 e MBH7 sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Legenda:** (A) 1x IC<sub>50</sub> do MBH5: Inchaço mitocondrial (M), apresentando figuras mielínicas no seu interior (seta) e reservossomos atípicos (B) 2x IC<sub>50</sub> do MBH5: Alterações significativas na mitocôndria, com perda das cristas mitocondriais (M), surgimento de espaços eletrólucos (†), reservossomos mais eletrodensos (R) e perfis membranosos envolvendo organelas (C) IC<sub>50</sub> do MBH7: Célula apresentando um Complexo de Golgi bem preservado (G), reservossomos enrolados por perfis membranosos (R) e citóstoma contendo material eletrodenso (C) Detalhe: Reservossomo (R) apresentando inclusões lipídicas e envolvimento por membranas (D) 2x IC<sub>50</sub> do MBH7: Célula com núcleo retraído (N) e reservossomos na região perinuclear (R) (E) 2x IC<sub>50</sub> do MBH7: Parte de uma célula mostrando intensa fragmentação da mitocôndria (M) e surgimento de membranas concêntricas no interior desta organela (\*). Barra – 500nm

## 5 DISCUSSÃO

Doenças parasitárias, como a tripanossomíase americana, continuam sendo um enorme obstáculo para o desenvolvimento social e econômico em populações menos favorecidas, contribuindo para os altos índices de endemidade, morbidade e mortalidade associadas a esta doença. Atualmente, não existe uma vacina disponível para o tratamento e sua quimioterapia restringe-se a uma única droga, o benznidazol, que apresenta uma baixa eficácia na fase crônica, severos efeitos colaterais e casos de cepas resistentes ao tratamento (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). Além destes agravos, o descaso por parte das indústrias farmacêuticas na produção de novos quimioterápicos fortalece a presença da tripanossomíase americana no grupo de doenças tropicais negligenciadas. Dentro deste panorama a prospecção de novos agentes quimioterápicos ainda se faz necessária.

Os compostos oriundos da reação Morita-Baylis-Hillman têm despertado o interesse da química medicinal nos últimos anos devido a sua versatilidade e atividades biológicas contra diversos agentes patogênicos já reconhecidas na literatura (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). No presente trabalho nós avaliamos os efeitos de seis adutos Morita-Baylis-Hillman sobre as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* e sobre células de mamíferos.

Em geral, nossos resultados mostraram que as formas tripomastigotas foram um pouco mais susceptíveis ao tratamento quando comparado com as formas epimastigotas. Esta diferença de susceptibilidade entre as formas epimastigotas e tripomastigotas tem sido relatada na literatura para outras drogas, como produto de diferenças bioquímicas e da permeabilidade da membrana, o que pode resultar em uma maior resistência das formas epimastigotas ao tratamento com as drogas (DE SOUZA et al., 1999). No presente trabalho foi utilizado o aduto MBH3 (2-[Hydroxy(2-Nitrophenyl)Methyl]Acrylonitrile) como um controle-cego para nossas análises, resultando em valores de  $6.53 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$  e  $5.52 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$  para  $\text{IC}_{50/72\text{horas}}$  e  $\text{LC}_{50/24\text{horas}}$ , respectivamente. Os resultados encontrados estão em conformidade com os relatados na literatura para este composto, com uma  $\text{IC}_{50/72\text{horas}}$  de  $6.0 \mu\text{g/mL}$  e  $\text{LC}_{50/24\text{horas}}$  de  $5.36 \mu\text{g/mL}$  (SANDES et al. 2010), mostrando a reprodutibilidade e validade dos nossos experimentos

Ao relacionar as atividades biológicas dos adutos com suas fórmulas estruturais observamos que os compostos que contém um radical nitro ligado ao benzeno (MBH1, MBH2 e MBH3) são mais ativos frente ao protozoário que os que contém radical piridina (MBH4, MBH5 e MBH6). Consistentemente, a importância do radical nitro na eficácia de

compostos com atividade antiparasitária tem sido relatada na literatura, sendo esta atribuída a biorredução do NO<sub>2</sub>, com formação de radicais livres e conseqüente estresse oxidativo nos parasitas (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009). Além disso, foi possível observar que a posição destes grupos funcionais também influenciou de maneira significativa a eficácia destes compostos. Por exemplo, dentre os adutos que apresentavam o radical piridina, o MBH5 que continha o grupamento na posição meta apresentou uma atividade mais acentuada, em relação aos demais do mesmo grupo. Adicionalmente, a presença do radical halogênico bromo no aduto MBH7, substituindo o radical NO<sub>2</sub> no composto MBH1 causou uma pequena alteração na atividade desta molécula. Esses dados são consistentes com os relatados por de Souza et al. (2007) os quais relaram que a presença do radical bromo no composto 2-[Hydroxy(4-Bromophenyl)Methyl]Acrylonitrile resultou em uma atividade leishmanicida mais elevada quando comparada ao mesmo composto sem este grupo funcional. A importância do grupamento bromo em moléculas com atividade tripanocida tem sido relatada na literatura (PAGLIERO et al. 2010; SILES et al. 2006). Segundo o trabalho de Hernandez et al. (2010), uma das hipóteses mais populares na química medicinal é que a presença de radicais halogênicos, como o radical bromo no aduto MBH7, causam alterações volumétricas e conformacionais na estrutura química do composto, permitindo uma maior ligação com o seu sítio alvo e uma diferenciação na sua atividade.

Um dos requisitos para uma boa droga contra a doença de Chagas é a sua especificidade para o agente etiológico da doença com pouco ou nenhum efeito adverso para as células do hospedeiro. Nossos resultados demonstraram que todos os compostos apresentaram citotoxicidade tanto para as células Vero como para os macrófagos peritoneais. Contudo, quando se compara a citotoxicidade para estas células em relação aos parasitas observa-se claramente que os adutos são mais seletivos para o protozoário. Dentre os adutos analisados, apenas dois compostos (MBH4 e MBH6) apresentaram ISe < 3, valores considerados insatisfatórios para um possível quimioterápico, segundo Bézivin et al. (2003). Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por De Souza et al. (2007), os quais apontaram uma toxicidade considerável para alguns adutos ativos contra a *Leishmania amazonensis*, relacionando a toxicidade com a liberação da enzima lactato desidrogenase (indicadora do processo citotóxico em macrófagos murinos), sendo uma maior toxicidade em macrófagos atribuída aos compostos que continha um forte grupo elétron-retirador como o NO<sub>2</sub>, em adutos MBH1, MBH2 e MBH3 testados em nosso trabalho.

Avaliar a atividade hemolítica em hemácias humanas é uma prática recorrente nas pesquisas científicas envolvendo possíveis candidatos a quimioterápicos, inclusive para o



*Trypanosoma cruzi*, tornando-se um parâmetro auxiliar em testes citotóxicos (BARRETT et al., 2001; SANTOS et al., 2012; VALDEZ et al., 2009). Nossos resultados mostraram que os seis adutos Morita-Baylis-Hillman testados não causaram uma hemólise significativa em relação ao controle, contudo, em relação aos adutos, a ausência da atividade hemolítica não excluiu a possibilidade dos adutos atuarem em organelas intracelulares específicas, tais como mitocôndria e núcleo, ausentes nos eritrócitos (KLINKEN, 2002). Estes resultados, mostram que, a depender do tipo de célula, o efeito citotóxico também pode variar, mostrando a necessidade de se conduzir experimentos sobre a atividade destes compostos *in vivo*.

Formas amastigotas correspondem ao estágio evolutivo multiplicativo intracelular encontrado no hospedeiro vertebrado e intrinsecamente ligado ao desenvolvimento do parasitismo tissular, sendo de grande importância para o desenvolvimento da forma crônica da doença e na prospecção de um novo quimioterápico (CLAYTON, 2010; DE SOUZA, 2002a). Nossos resultados mostraram que estas formas foram mais susceptíveis à ação dos adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7, refletindo em menores índices de  $IC_{50/48\text{horas}}$  e maiores índices de ISe quando comparado as outras formas evolutivas. Novamente, o composto MBH7 apresentou uma maior atividade antiparasitária, seguido aos que contêm o radical nitro (MBH1 e MBH3) e por fim o que apresenta o radical piridina (MBH5), condizente com o que foi visto em artigos anteriores e semelhante aos demais testes realizados (DE SOUZA et al., 2007; PAGLIERO et al., 2007).

O NO é uma importante molécula para o sistema imune do hospedeiro, apresentando dentre várias funções a defesa contra microorganismos, parasitas e células tumorais de maneira citotóxica e citostática (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Após a ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ocorre a produção do óxido nítrico (NO), sendo mensurado pelo seus produtos oxidados nitrito ou nitrato no sobrenadante da cultura celular (KORHONEN et al., 2005; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; PINHO et al., 2011). Através desta molécula, os macrófagos eliminam parasitas como o *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium sp.* e *Schistosoma mansoni* (GUTIERREZ et al., 2009). Nossos resultados demonstraram que nenhum aduto testado foi capaz de induzir alterações significativas na produção deste radical em macrófagos, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que os efeitos observados nos adutos estejam relacionados a uma ação direta dos compostos sobre o parasita e não uma maior produção de NO pelos macrófagos. Por outro lado não se pode descartar a possibilidade de outros mediadores imunológicos como as interleucinas possam ser ativados ou inibidos pelos adutos.

De fato Amorim et al. (2013), demonstraram que a ação leishmanicida de um composto derivado da reação Morita-Baylis-Hillman era devida a uma redução das interleucinas IL6 e IL10, independente de NO. Estas interleucinas reduzem a ativação dos macrófagos pela produção de TNF- $\alpha$ , resultando na diminuição da carga parasitária.

Tendo em vista que os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 foram os compostos mais promissores dentre os experimentos realizados, isto é, apresentaram os menores índices de IC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> e os maiores índices de seletividade e CC<sub>50</sub>, foi realizada a análise em tempo real da viabilidade celular do parasita através de marcadores como a calceína e o homodímero de etídio presentes no kit Live/Dead<sup>®</sup>. Nossos resultados mostram uma perda na viabilidade celular e comprometimento da integridade da membrana plasmática, compatível com o fenótipo de morte celular por necrose, em todos os adutos testados de maneira dose dependente, como observado pela diminuição da fluorescência da calceína e aumento nas células EthD1 positivas. O marco deste tipo de morte celular envolve alterações dramáticas na mitocôndria incluindo a despolarização mitocondrial, a depleção de ATP, geração de ROS, bem como a vacuolização do citoplasma, perda da homeostase de cálcio e principalmente ruptura da membrana plasmática (ELMORE, 2007; MENNA-BARRETO et al, 2007). No entanto, a presença de células negativas para os dois marcadores, ou seja, células inviáveis sem comprometimento da integridade da membrana sugerem que outros tipos de morte celular podem estar envolvidos. De fato, estudos têm demonstrado que a necrose pode ocorrer simultaneamente com outras vias de MCP, como a apoptose e a autofagia, sobrepondo-se em diferentes momentos do tratamento ou em diferentes concentrações da droga (LÜDER et al., 2010; MENNA-BARRETO et al., 2009; SANDES et al., 2010).

Dentre as organelas encontradas no *Trypanosoma cruzi*, a mitocôndria pode ser classificada como uma das principais estruturas alvos para potenciais quimioterápicos, devido a suas características distintas em relação às encontradas em mamíferos superiores, além de se mostrar particularmente sensíveis a ação de compostos-testes (SHANG et al., 2009). Outra característica importante atribuída a esta organela é a sua função nos processos de morte celular, sendo sua alteração o ponto de partida para os processos como apoptose ou necrose (FIDALGO; GILLE, 2011; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Para verificar se os adutos Morita-Baylis-Hillman atuam nesta estrutura alterando o potencial da membrana mitocondrial foi utilizado a rodamina 123, um fluorocromo catiônico que é atraído pelo potencial da membrana mitocondrial de células metabolicamente ativas (HUANG et al., 2007). Nossos resultados mostraram que a exceção do composto MBH7, a incubação com os adutos causaram alterações no potencial mitocondrial, sendo observada uma aparente

despolarização nas células tratadas com a  $IC_{50}$  e uma marcação inespecífica e difusa com  $2x IC_{50}$ , resultante da intensa modificação morfológica causada pelo tratamento. Esta variação no potencial da membrana mitocondrial observado em nossos experimentos pode ser resultado da ação dos compostos através de diferentes mecanismos que comprometem o metabolismo energético do parasita, como a inibição da cadeia transportadora de elétrons, o aumento do bloqueio da enzima ATP-sintase, diminuição na estimulação de proteínas desacopladas ou diminuição na permeabilização da membrana interna desta organela (FIDALGO; GILLE, 2011). Estas alterações podem alterar a homeostase intracelular dos íons, causando uma disfunção mitocondrial e uma diminuição na produção de ATP levando a perfis de MCP, como a necrose (ZONG; THOMPSON, 2006).

Outro fator associado às alterações no potencial da membrana mitocondrial é a geração de espécies reativas de oxigênio, um produto comum a várias drogas tripanocidas que atuam nesta organela (KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; MENNA-BARRETO et al., 2009). O MitoSOX<sup>TM</sup>, uma sonda fluorescente permeável e seletiva à mitocôndria, é normalmente utilizada como uma sonda na detecção de ROS nestas organelas, exibindo um aumento na intensidade de fluorescência no canal correspondente ao vermelho (KUZNETSOV et al., 2011). A inexistência de marcação nos controles pode ser devida a baixa produção de ROS resultante de um pequeno número de elétrons advindos da cadeia respiratória que interagem com a molécula do oxigênio (BATANDIER, 2002; KUDIN et al., 2004). O aumento da fluorescência do MitoSox em células tratadas com  $2x IC_{50}$  dos pode ser resultado da diminuição do potencial mitocondrial como observada na marcação com a rodamina 123. Neste sentido, o mal funcionamento desta organela pode levar a um escape de elétrons da cadeia respiratória, não reduzíveis a água, levando a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio. O surgimento de espécies reativas de oxigênio oriundas da mitocôndria está associado à fase inicial da morte celular por apoptose, atuando como mediadores em diversas cascatas de sinalização, além de associar-se a autofagia, através da expressão de proteínas autofágicas ATG7 e ATG8 devido ao acúmulo ROS (PIACENZA et al., 2007; YU et al., 2006;).

A laranja de acridina (LA) é um fluorocromo bastante utilizado para avaliação em compartimentos ácidos, emitindo fluorescência na faixa do vermelho e também, por se intercalar com o DNA e RNA, como um marcador de alterações nucleares. Vários trabalhos tem utilizado a LA como marcador de compartimentos ácidos como os reservossomos e acidocalcissomas em *T. cruzi* (MENNA-BARRETO et al., 2005; PORTO-CARREIRO et al., 2000; MONTE-NETO et al., 2011). Adicionalmente tem se demonstrado que este composto é

capturado em compartimentos vesiculares acídicos como lisossomos e autofagosomos emitindo forte fluorescência na faixa do vermelho (NISHIKAWA et al, 2010). Tratamento com os adutos causou um intenso esmaecimento da fluorescência do citoplasma de forma dose-dependente, seguido pelo aumento na marcação de compartimentos acídicos tratados com a  $IC_{50}$  dos adutos. A presença de grandes compartimentos acídicos na região perinuclear e do cinetoplasto, pode ser resultante do aumento da atividade autofágica nestas regiões, na tentativa das células de subverter os efeitos da droga pela degradação das organelas não funcionais (ALVAREZ et al., 2007; KESSLER et al., 2013). Consistentemente, a análise através da microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de compartimentos semelhantes a acidocalcisoma se fundindo com cinetoplasto e liberando o seu conteúdo no espaço intermembranar desta organela. A diminuição na fluorescência, nas células tratadas com  $2x IC_{50}$  sugere a perda da integridade da membrana plasmática, levando a morte do parasita.

Para aprofundar as nossas análises no sentido de elucidar os mecanismos de ação dos adutos e identificar os alvos de ação do adutos, uma análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada. As análises mostraram que a maioria das alterações morfológicas observadas foram comuns a todos os adutos, sendo mais proeminentes no dobro da  $IC_{50}$ . Como observado pelo MET, parasitas incubados na presença da  $IC_{50}$  dos adutos não mostraram mudanças morfológicas consideráveis, entretanto alterações na mitocôndria podem ser observadas nas menores concentrações. Este dado corrobora com nossas observações da microscopia confocal mostrando que uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial, como revelado pelo Rho123, precede a morte celular dos parasitas. Grandes mudanças morfológicas compatíveis com a perda da viabilidade celular e morte celular por autofagia foram comumente observadas em células tratadas com  $2x IC_{50}$  dos adutos. Este fenótipo está de acordo com a diminuição da calceína e o aumento no número de células EthD-1 positivas como observada pós-marcação com o Live/Dead. Intenso inchaço com perda do material mitocondrial, ruptura do kDNA, desorganização da membrana interna da mitocôndria formando figuras mielínicas foram observadas em todas as células tratadas. Estes efeitos foram mais proeminentes em parasitos tratados com  $2x IC_{50}$  do MBH7.

Estudos prévios mostraram que os tipos de danos mitocondriais observados pós-tratamento, como o aumento dos espaços eletroluscentes na matrix e o inchaço da organela, além do surgimento de vesículas eletrodensas podem estar associados à diminuição dos níveis de ergosterol (LAZARDI et al., 1990; SANTA-RITA et al., 2004; MENEZES et al., 2006). De fato, Rodrigues et al. (2002) mostraram que a membrana mitocondrial, diferente da

membrana mitocondrial de mamíferos, possui uma grande quantidade de esteróis, necessárias para a viscosidade, estabilidade e atividades energéticas desta estrutura, se tornando uma organela frágil e propensa a ruptura quando se encontra deficiente em ergosterol (VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009).

Apesar dos avanços da ciência, especialmente no campo da química orgânica, terem criado maiores possibilidades para o desenvolvimento de novos fármacos, apenas 21 (1.3%) dos 1556 novos fármacos desenvolvidos entre os anos de 1975 e 2004 foram para o tratamento de doenças tropicais (CHIRAC; TORREELE, 2006). Desta forma, a busca por novas moléculas ainda é de grande interesse e os resultados aqui apresentados mostram o potencial da reação Morita-Baylis-Hillman como uma fonte promissora na busca de agentes tripanocidas, especialmente os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7, devido a sua seletividade e atividade significativa frente às três formas evolutivas do protozoário. Contudo, há a necessidade de testes *in vivo* e estudos complementares sobre o mecanismo de ação responsável por essa atividade antiparasitária.

## 6 CONCLUSÕES

- a) Os adutos Morita-Baylis-Hillman testados foram capazes de inibir o crescimento de formas epimastigotas e inviabilizar formas tripomastigotas, sendo os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7 mais promissores;
- b) Embora tenham se mostrado mais seletivos ao parasita do que as células de mamíferos, os adutos Morita-Baylis-Hillman apresentaram uma moderada toxicidade em relação aos macrófagos e células Vero;
- c) A baixa atividade hemolítica dos compostos sugere que a membrana plasmática das células hospedeiras não é o alvo preferencial de ação dos adutos;
- d) A maior susceptibilidade das formas amastigotas ao tratamento com os adutos sugere que os adutos possam apresentar uma maior eficácia na fase crônica da doença;
- e) Os compostos não foram capazes de induzir alteração na produção NO em macrófagos, sugerindo que os efeitos observados sejam relacionados a uma ação direta dos compostos ao parasita e não a uma ação relacionada a este radical em macrófagos;
- f) As análises de microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de transmissão apontam a mitocôndria como organela alvo para esta classe de compostos, e indica a necrose (para o MBH1 e MBH2) e a autofagia (para os adutos MBH1, MBH2, MBH5 e MBH7) como mecanismo de morte celular do parasita;
- g) Nossos dados são sugestivos para a utilização dos adutos Morita-Baylis-Hillman no tratamento da tripanossomíase americana. Contudo, estudos futuros ainda são necessários para melhor elucidação dos mecanismos de ação desta classe de compostos, assim como testes *in vivo*.

---

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, V. E. et al. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 283, p. 3454 - 3464, 2007.
- ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental parasitology**, Orlando, v.116, n.1, p. 44 – 52, 2007.
- AMORIM, F. M. et al. Morita-Baylis-Hillman adducts shows *in vitro* activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, London, v. 140, n. 1, p. 29 – 38, 2013.
- ANDRADE, P. P.; ANDRADE, C. R. Etiologia. In: MALTA, J. **Doença de Chagas**, 1. ed.. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 1 – 11.
- APT, W. B.; ZULANTAY, I. A. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 139, n. 2, p. 247 – 257, 2011.
- ARAS R. et al. Vectorial transmission of Chagas disease in Mulungo do Morro, Northeastern of Brazil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 359 – 363, 2003.
- AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 2034 - 2039, 2004.
- BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, p. 4250 - 4256, 2011.
- BARRET, D. et al. Synthesis and Biological Activity of novel Macrocyclic Antifungals: Acylated Conjugates of the Ornithine Moiety of Lipopeptidolactone FR901469. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 11. p. 479 – 482, 2001.
- BASAVAIHAH, D. et al. Recent advances in Baylis-Hillman reactions and applications. **Chemical Society Reviews**, London, v. 103, n. 3, p. 811 - 892, 2003.
- BASAVAIHAH, D.; RAO, K. V.; REDDY, R. J. The Baylis–Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, London, v. 36, p. 1581 – 1588, 2007.
- BASAVAIHAH, D. et al. Recent Contributions from the Baylis-Hillman Reaction to Organic Chemistry. **Chemical Reviews**. Washington, v. 110, p. 5447 – 5674, 2010.
- BASAVAIHAH, D.; VEERARAGHAVAIHAH G. The Baylis–Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry. **Chemical Society Reviews**, London, v. 41, p. 68 – 78, 2012.

BATANDIER, C. et al. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. **Journal of cellular and molecular medicine**, Bucharest, v. 6, n. 2, p. 175 – 187, 2002.

BELRAN, B. et al. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 26, 14602 – 14607. 2000.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 364, n. 26, p. 2527 - 2534, 2011.

BERNARDES, L. S. C. et al. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 7075 – 7082, 2006.

BERNSTEIN, R. E. Darwin's illness: Chagas disease resurges. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 77, p. 608 - 609, 1984.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, p. 499 – 503, 2003.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**. New York, v. 132, n. 2, p. 123 – 128, 2012.

BRAK, K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1763 - 1773, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas In: \_\_\_\_\_ **Doenças Infeciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**, 8. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010, p. 143 – 149.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de Doença de Chagas Aguda de 2000 a 2011**. Brasília, 2012. Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454)>.

Acesso em: 29 jan. 2013.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitrofuraldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquema de duração prolongada na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 43 – 49, 1961.

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

BRODSKYN, C. I. ;BARRAL-NETTO, M. Resposta imune humana na doença de Chagas. In: BRENER Z.; ANDRADE Z. A.; BARRAL-NETTO M. **Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.



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

CASTRO, D. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 2, p. 201 - 207, 2007.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, Basingstoke, v. 25, p. 471 - 479, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159 - 218, 1909.

CHIRAC, P.; TORREELE E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, London, v. 367, n. 9522, p. 1560 - 1561, 2006.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, Basingstoke, v. 465, n. 7301, p. S4 - S5, 2010.

COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Reação de Baylis-Hillman: uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 98 - 101, 2000.

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

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease- 100 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, suppl. 1, p. 31 - 40, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1-2, p. 5 - 13, 2010.

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

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, Londres, v. 465, n. 730, p. 6 - 7, 2010.

COUTINHO, M.; DIAS, J. C. P. A descoberta da Doença de Chagas **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. Brasília, v. 16, n. 2, p. 11 - 51, 1999.

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

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 42, n. 1, p. 99 -102, 2007.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 17 - 36, 1999.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 269 - 285, 2002a.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, n. 12, p. 1013 - 1025, 2002b.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 313 - 325, 2008.

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

DIAS J. C. P. et al. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 13 - 34, 2000.

DIAS J. C. P.; SILVEIRA A. C.; SCHOFIELD C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 603 – 612, 2002.

DIAS, J. C. P. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado de arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 2444 -2457, 2009.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 251 - 261, 2005.

DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O. Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*. **Medicina (Buenos Aires)**, Buenos Aires, v. 40, n. 1, p. 10 - 16, 1980.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G., Nitric Oxide Revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343 - 350, 2003.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 495 – 516, 2007.

ESCHENAZI, B. **Trypanosoma cruzi forms** - Job for a association Medecins Sans Frontieres. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:  
<<http://www.coroflot.com/eschenazi/scientific-and-medical>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

ESTEVA, M. I. et al. Benzophenone-based farnesyltransferase inhibitors with high activity against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 48, n. 23, p. 7186 - 7191, 2005.

FELTRIN, M. P.; ALMEIDA, W. P. A Synthesis of Captopril Through a Baylis-Hillman Reaction. **Synthetic Communications**, New York, v. 33, n. 7, p. 1141 - 1146, 2003.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n. 11, p. 2758 - 2770, 2011.

FIGUEIREDO, R. C., ROSA D. S., SOARES M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 6, p. 1213 - 1218, 2000.

FIGUEIREDO, R. C. et al. Reserosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology**, London, v. 129, n. 4, p. 431 - 438, 2004.

GARCIA, S. B. Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 249 - 251, 2009.

GALVÃO C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, Auckland, v. 202, p. 1 - 36, 2003.

GARZONI, L. R. et al. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 273 - 285, 2004.

GLUENZ, E.; SHAW, M. K.; GULL, K. Structural asymmetry and discrete nucleic acid subdomains in the *Trypanosoma brucei* kinetoplast. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 64, n. 6, p. 1529 - 1539, 2007.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 236 - 245, 2009.

HAUGLAND, R. P. et al. **Dual-Fluorescent Cell Viability Assay Using Ethidium Homodimer and Calcein AM**. US Patent 5314805 A, 24 maio 1994.

HERNANDES, M. Z. et al. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hint for the drugs design. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 11, n. 3, p. 303 - 314, 2010.

HOFFMAN, H. M. R.; RABE, J. Preparation of 2-(1-Hydroxyalkyl)acrylic Esters; Simple Three-Step Synthesis of Mikanecic Acid **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 22, n. 10, p. 795 - 796, 1983.

HUANG M. et al. Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v. 35, n. 7, p. 1276 - 1285, 2007.

HILL J. S.; ISAACS N. S. Mechanism of  $\alpha$ -substitution reactions of acrylic derivatives **Journal of Physical Organic Chemistry**, New York, v. 3, n. 5, p. 285 - 288, 1990.

- IZUMI, E. et al., Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 28, n. 4, p. 809 – 823, 2011.
- KESSLER, R. F. et al. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e55497, 2013.
- KLINKEN, S. P. Red blood cells **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1513 – 1518, 2002.
- KRIEGER, M. A. et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, p. 427 - 434, 1992.
- KOHN, L. K. et al. Antiproliferative effect of Baylis-Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 41, p. 738 - 744, 2006.
- KORHONEN, R. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, Hilversum, v. 4, p. 471 – 479, 2005.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**, Washington, v. 87, n. 1, p. 99 - 163, 2007.
- KUDIN, A. P. et al. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore. v. 279, p. 4127 – 4135, 2004.
- KUZNETSOV, A. V. et al. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 8, p. 2383 – 2390, 2011.
- KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2methylene-propionic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 9, p. 731 - 736, 1999.
- LANA, M. de; TAFURI W. L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 85 – 108.
- LANDFEAR S. M.; IGNATUSHCHENKO M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 115, p. 1 - 17, 2001.
- LAZARDI, K. et al. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 34, p. 2097 – 2105, 1990.
- LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 10, n. 8, p. 556 – 570, 2010.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS M. L. A. A. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 20, p. 3954 – 3971, 2012.

LÜDER, C. G. et al. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, London, v. 3, p. 116 - 127, 2010.

LUQUETTI, A. O.; SCMUNIS G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: TELLERIA J.; TIBAYRENC M. **American tripanosomiasis (Chagas disease) one hundred years of research**, E-book, Amsterdam: Elsevier, 2010, p. 743 - 792.

MACHADO, F. S. et al., Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. **Cardiology in Review**, Hagerstown, v. 20, p. 53 – 65, 2012.

MACMICKING, J.; XIE Q. W.; NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323 – 350, 1997.

MATEUS, C. R.; COELHO, F. An alternative approach to aminodiols from Baylis-Hillman adducts: stereoselective synthesis of chloramphenicol, fluoramphenicol and thiamphenicol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 3a, p. 386 – 396, 2005.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A - Molecular and Integrative Physiology**, New York, v. 146, n. 4, p. 601 – 620, 2007.

MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 263-269, 2009.

MENEZES, D. et al. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, p. 99 – 105, 2006.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Effect of a  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 56, p. 1034 – 1041, 2005.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. **Parasitology Research**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 895 – 905, 2007.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MICHELS, P. A. et al., Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1763, n. 12, p. 1463 – 1477, 2006.

MIRANDA, K. et al. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 86, p. 373 – 384, 2000.

MIRANDA, K. et al. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. **Protist**, Jena, v. 155, p. 395 – 405, 2004.

MONTE NETO, R. L. et al. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental parasitology**, New York, v. 127, p. 215 - 221, 2011.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. Control of transfusional transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 64 – 67, 2011.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 56, n. 3, p. 208 - 213, 2009.

MORITA, K. Japan patent 6803364. **Chemical Abstracts**, Washington, v. 69, p. 58828, 1968.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 65, n.1-2, p. 55 - 63, 1983.

MUÑOZ-SARAIVA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Review**, Norwell, v. 17, n. 1, p. 45 – 64, 2010.

NISHIKAWA et al., Inhibition of autophagy potentiates sulforaphane-induced apoptosis in human colon cancer. **Annals of Surgical Oncology**, New York, v. 17, n. 592 – 602, 2010

OKUDA, K. et al. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Experimental Parasitology**, New York, v. 92, n. 4, p. 223-231, 1999.

OLIVEIRA, R. B. et al. In vitro evaluation of the activity of aromatic nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 141 - 144, 2003.

OLIVEIRA, R. L. de; CONDURU, R. Nas frestas entre a ciência e a arte: uma série de ilustrações de barbeiros do Instituto Oswaldo Cruz. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 335 – 384, 2004.

OLIVIERI, B. P. et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal response in a murine model of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 36, p. 79 - 83, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of Chagas Diseases**. Geneve, 2005, Technical Report Series, n. 905, p. 1 – 109.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Chagas disease: Fact sheet**. Geneve, 2013, Technical Report Series, n. 304, p. 1 – 4.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurans compounds. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 38, p. 30 – 40, 1952.

PAGLIERO, R. J. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 142 – 150, 2010.

PAULA, R. F.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1013 - 1020, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 1, p. 92 - 100, 2011.

PEREIRA, V. R. A. et al. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 154 - 161, 2005.

PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 2, p. 441 - 446, 2009.

PIACENZA, L. et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, London, v. 403, p. 323 – 334. 2007.

PINHO, B. R. et al. Is Nitric Oxide Decrease Observed with Naphthoquinones in LPS Stimulated RAW 264.7 Macrophages a Beneficial Property? **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. 1 – 8, 2011.

PINTO, A. Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 25, p. 77 - 83, 2009.

PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 79, n. 11, p. 858 – 869, 2000.

RASSI Jr., A. et al. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 735, n. 9723, p. 1388 - 1402, 2010.

REVELLI, S. et al. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 118, n. 2, p. 271 - 277, 1999.

REY, L. Tripanossomiase por *Trypanosoma cruzi*: Doença de Chagas. In: REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 27 – 41.

RIBEIRO, V. Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < <http://miriamsalles.info/wp/wp-content/uploads/ciclotrypanosomacruz.jpg>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA M. M.; RIBEIRO A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 5, p. 727 - 743, 2007.

RODRIGUES, J. C. et al. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 46, p. 487–499, 2002.

ROMANHA, A. J., et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 6, p. 823 - 828, 2002.

SANDES, J. M. et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 38, p. 190 - 195, 2010.

SANT'ANNA, C. et al. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 71, n. 8, p. 599 – 605, 2008.

SANTA-RITA, R.M. et al. Effects of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmefosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 5 , p. 704 – 710, 2004

SANTOS, D. et al. Activity on *Trypanosoma cruzi*, erythrocytes lysis and biologically relevant physicochemical properties of Pd(II) and Pt(II) complexes of thiosemicarbazones derived from 1-indanones. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 117, n. 270 – 276. 2012.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 583 - 588, 2006.

SHANG, X. J. et al. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p.122 – 126, 2009.

SINGH, S. A.; BHAT, S. V. Antimicrobial potential of 3-hydroxy-2-methylene-3-phenylpropionic acid derivatives. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 61, n. 4, p. 447 – 455, 2011.

SILES, R. et al. Design synthesis and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.16, p. 4405 – 4409, 2006.

SOUZA, R. O. M. A. de et al. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 42, p. 99 - 102, 2007.



SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; HEUSER, J. E. Quick-freeze, deepetch Rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. **Journal of cell science**, London, v. 69, p. 167 – 168, 1984.

TEIXEIRA, A. R. L. et al., Chagas Disease. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v. 82, p. 788 – 798, 2007.

TOSO, M. A.; VIAL U. F.; GALANTI, N. Oral transmission of Chagas' disease. **Revista médica de Chile**, Santiago, v. 139, n. 2, p. 258 – 266, 2011.

TURRENS, J. F. et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 125 - 129, 1996.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 31, n. 5 – 6, p. 472 - 481, 2001.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 287 - 295, 2002.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 495 - 501, 2003.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 115, n. 1 – 2, p. 55 - 68, 2010.

VALDEZ, R. H. et al. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 110, p. 7 – 14. 2009

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 10, p. 246-260, 2009.

VASCONCELLOS, M. L. A. A. et al. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, p. 288 - 296, 2006.

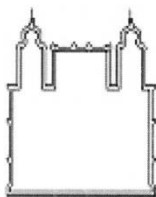
VERÇOSA, A. F. A. et al. Chagas' Disease: IgG Isotypes against Cytoplasmatic (CRA) and Flagellar (FRA) Recombinant Repetitive Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagasic Patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 21, p. 271 - 276, 2007.

YU, C. R. et al. Synthesis and bioactivity of novel (3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yloxy)phenyl containing acrylate and acrylonitrile derivatives **Journal of Fluorine Chemistry**, Lausanne, v. 127, n. 12, p. 1540 – 1546, 2006.

YU, L. et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 13, p. 4952 – 4957, 2006.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor NY. v. 20, p. 1 - 15, 2006.

## Anexo A – Parecer do CEUA/CPqAM



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

**CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o protocolo intitulado :

" *Estudo dos efeitos de compostos naturais e sintéticos sobre tripanosomatídeos.* "

número P-427/07, proposto por Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo, foi licenciado pelo Nº L-001/08.

Sua licença de Nº L-001/08 autoriza o uso anual de :

- 2 *Oryctolagus cuniculus*

- 400 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal ( COBEA ) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ( CEUA - FIOCRUZ ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 19 de fevereiro de 2012 .

Rio de Janeiro, 24/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe  
Coordenadora da CEUA  
FIOCRUZ